

# BIOTECNOLOGIA MARINHA

Organizadores

**Fabiano Thompson & Cristiane Thompson**



UFRJ



FURG  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE



PPG - Mar



SECIRM



Comissão Interministerial  
para os Recursos do Mar

MINISTÉRIO DA  
EDUCAÇÃO

MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA  
E INOVAÇÕES



PÁTRIA AMADA  
BRASIL  
GOVERNO FEDERAL



# BIOTECNOLOGIA MARINHA

Organizadores

**Fabiano Thompson & Cristiane Thompson**



Rio Grande  
2020

Organizadores

**Fabiano Thompson & Cristiane Thompson**

Colaboradores

**Adriana Fróes • Adriana Nascimento Santos Cartaxo • Alexandre José Macedo • Ana Carolina Maia Angelo • Ana Carolina Martins Magalhães • Ana Carolina Paulo Vicente • Ana Carolina Salles • Ana Paula Barbosa Moreira • Anderson Vilasboa • Andreimar M. Soares • Anelise Baptista da Silva • Ariane F. Bertonha • Carina Stefoni Böck • Carla Carvalho da Veiga • Carla Simone Vizzotto • Carlos Daniel Pérez • Carlos José Correia de Santana • Carolina B. G. Teles • Carolina Bettker Vasconcelos • Cintia Paula Jandre Rua • Cláudia S. de Oliveira • Cleópatra A. da S. Caldeira • Cynthia B. Silveira • Daiane Gracieli Faller • Daniela Batista • Darlon I. Bernardi • Debora Queiroz Cabral • Diego G. de Almeida • Diego V. Wilke • Diogo Tschoeke • Eduardo Infante • Eidy de Oliveira Santos • Eric de Lima Silva Marques • Érica Patrícia Lima • Eva Regina de Oliveira • Fernanda Ramlov • Fernando Siviero • Gabriela Calegario • Genivaldo Gueiros Z. Silva • Giovanna de Oliveira Fistarol • Giselle Cavalcanti • Gizele Duarte Garcia • Glaucia M. Machado-Santelli • Gustavo Bueno Gregoracci • Jairo I. Quintana Bulla • Jéssica Scherer • João Carlos Teixeira Dias • José Eduardo Arruda Gonçalves • Juliana P. Zuliani • Juliana R. Gubiani • Julie P. G. Rodriguez • Karen J. Nicácio • Laura Bahiense • Laura P. Ióca • Leonardo Broetto • Letícia V. Costa-Lotufu • Liany F. de A. Melo • Louisi de Oliveira • Luciana Angelo Loges • Luciana V. Granthom Costa • Luciana V. R. de Messano • Luciane A. C. Tonon • Luciane Alessandra Chimetto Tonon • Luiz Gadelha • Luiz Landau • Luiz Paulo de Freitas Assad • Marcelo Maraschin • Mariana de Souza Castro • Mariana Esteves Campeão • Mário Luiz Conte da Frota Júnior • Melissa Fontes Landell • Mirelle Takaki • Naiane Negri • Nicole Sartori Ribeiro • Ninive Aguiar Colonello • Osmindo Rodrigues Pires Júnior • Otilia Deusdênia L. Pessoa • Paula Braga Gomes • Paula C. Jimenez • Paulo A. S. Mourão • Paulo Cesar Abreu • Paulo Sergio Salomon • Pedro Milet Meirelles • Rachel Passos Rezende • Rafael de Sá Marques • Rafaela Diniz-Sousa • Ralf T. S. Cordeiro • Raquel Toste • Renato Crespo Pereira • Ricardo Coutinho • Ricardo Henrique Krüger • Roberto G. S. Berlinck • Rogério Valle • Ronaldo B. Francini-Filho • Samuel D. Araújo Júnior • Sharon Vieira dos Reis • Tainara M. R. da Silva • Thaynã Cavalcanti • Ulisses Pinheiro • Verônica Viana Vieira • Vitor F. Freire**

Revisão gramatical

**João Reguffe**

Diagramação e projeto gráfico

**Mariana Martins de Andrade**

B616 Biotecnologia marinha / organizadores Fabiano Thompson & Cristiane Thompson - Rio Grande: Ed. FURG, 2020.  
855 p.: il.

ISBN: 978-65-5754-013-8

1. Biotecnologia marinha 2. Organismos marinhos 3. Biodiversidade  
4. Ciências biológicas I. Thompson, Fabiano II. Thompson, Cristiane

CDU : 57:62

Catálogo na fonte: Bibliotecária Vanessa Dias Santiago – CRB10/1583



# BIOTECNOLOGIA MARINHA

Francesco Ungaro

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO À BIOTECNOLOGIA MARINHA</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 1: CARBOIDRATOS: CONCEITOS FUNDAMENTAIS E EXEMPLOS DE FUNÇÕES BIOLÓGICAS EM ORGANISMOS MARINHOS</b>	<b>27</b>
1. Aspectos históricos dos carboidratos	28
2. Estrutura química de carboidratos	28
3. A ligação glicosídica de carboidratos complexos	31
4. Carboidratos em organismos marinhos	34
4.1 Polissacarídeos sulfatados com função estrutural	34
4.2 Polissacarídeos sulfatados na fertilização	35
4.3 Polissacarídeos sulfatados na evolução de organismos multicelulares	37
5. Conclusão	39
<b>CAPÍTULO 2: ÁCIDOS GRAXOS E PIGMENTOS</b>	<b>43</b>
1. Ácidos graxos	44
1.1 Estrutura, diversidade e importância biológica	44
1.2 Aplicações biotecnológicas dos ácidos graxos	46
1.2.1 Saúde e nutrição humana	46
1.2.2 Fonte de energia renovável	47
1.2.3 Cosméticos e fármacos	47
2. Pigmentos	48
2.1 Estrutura, diversidade e importância biológica	48
2.2 Aplicações biotecnológicas	51
2.2.1 Corantes e pigmentantes	51
2.2.2 Fragrâncias e aromatizantes	52
2.2.3 Fluorocromos	52
2.2.4 Saúde e nutrição	53
3. Fontes marinhas de ácidos graxos e pigmentos	54
3.1 Macroalgas	54
3.2 Microalgas eucarióticas, cianobactérias e bactérias	55
3.3 Invertebrados e peixes	57
4. Conclusão	59
<b>CAPÍTULO 3: PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE ORGANISMOS MARINHOS: UM ENFOQUE ANTIMICROBIANO, ANTITUMORAL E ANTIVIRAL</b>	<b>67</b>
1. Cianobactéria	68

2. Poríferos	68
3. Cnidários	69
4. Moluscos	71
5. Anelídeos	72
6. Artrópodes	72
7. Equinodermatas	74
8. Tunicados	75
9. Vertebrados	76
10. Conclusão	77
<b>CAPÍTULO 4: METABÓLITOS SECUNDÁRIOS</b>	<b>87</b>
1. O que é metabolismo secundário	88
1.1 Definição	88
1.2 Histórico	88
1.3 Alguns exemplos de estudos fundamentais para a biotecnologia marinha	90
1.4 Diversidade dos metabólitos secundários marinhos	91
2. Biossíntese de metabólitos secundários	91
2.1 Policetídeos	93
2.2 Peptídeos não-ribossomais	94
2.3 Híbridos entre policetídeos e peptídeos não-ribossomais	95
2.4 Isoprenóides (terpenos)	95
3. Abordagens metodológicas	96
3.1 Isolamento de compostos ativos	97
3.2 Plataformas analíticas e análises de bioinformática para metabólitos secundários	100
3.3 antiSMASH	102
3.4 CASSIS-SMIPS	103
3.5 CLSEAN	103
3.6 CLUSTERFINDER	103
3.7 CLUSTSCAN	103
3.8 MIDDAS-M	103
3.9 SMURF	103
4. Aplicações dos metabólitos secundários oriundos da biotecnologia marinha	103
4.1 Fármacos	104
4.2 Cosmecêuticos	105
5. Conclusões	111
<b>CAPÍTULO 5: ÁCIDOS NUCLÉICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES</b>	<b>112</b>
1. Nucleotídeos, sondas e marcadores moleculares	112
1.1 Conceitos e definições	

1.2 Histórico	114
1.3 Análogos naturais de nucleosídeos de origem marinha com atividade biológica	115
<b>2. Marcadores e sondas moleculares: Abordagens metodológicas</b>	<b>116</b>
2.1 Aloximas	116
2.2 DNA mitocondrial ( <i>mtDNA</i> )	117
2.3 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP)	118
2.4 Minissatélites	119
2.5 Identificação de marcadores com base na técnica de PCR	119
2.5.1 Microsatélites	120
2.5.2 <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNP)	121
2.5.3 <i>DNA barcoding</i>	122
2.5.4 <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD)	122
2.5.5 <i>Amplified Fragment Length Polymorphisms</i> (AFLP)	123
2.6 Métodos alternativos para identificar marcadores moleculares	124
2.6.1 Sequenciamento	124
2.6.2 Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real ( <i>rt-qpcr</i> )	125
2.7 Genes marcadores para identificação de espécies	125
2.7.1 Gene 16S rRNA	125
2.7.2 Gene 18S rRNA	126
2.7.3 Gene 28S rRNA	126
2.8 Desenvolvimento de outras tecnologias	127
2.8.1 Hibridização <i>in situ</i> ou FISH	128
2.8.2 Microarranjo (em inglês, <i>microarray</i> )	128
2.8.3 Biossensores	129
<b>3. Conclusões</b>	<b>129</b>
<b>CAPÍTULO 6: BIODIVERSIDADE MICROBIANA: BACTÉRIAS, ARQUEIAS E VÍRUS</b>	<b>135</b>
<b>1. O que é biodiversidade</b>	<b>136</b>
1.1 Histórico	136
1.2 Definição	136
1.3 Alguns exemplos de estudos fundamentais para a biotecnologia marinha	137
<b>2. Abordagens metodológicas</b>	<b>137</b>
2.1 Coleta e preservação de amostras marinhas e associadas para microbiologia	137
2.2 Métodos clássicos para estudos microbiológicos	141
2.3 Abordagens contemporâneas (independentes de cultivo)	147
<b>3. Aplicações da biodiversidade microbiana na biotecnologia marinha</b>	<b>150</b>
3.1 Vírus como biorremediador	154
3.2 Vírus como produtores de cosméticos	154
3.3 Vírus como vacina em aquacultura	155

3.4 Vírus e seu potencial pouco explorado em nanotecnologia	<b>155</b>
3.5 Bactérias como solução para o lixo de plástico	<b>156</b>
3.6 Bactérias como produtoras de nanopartículas de ouro	<b>156</b>
<b>4. Conclusões</b>	<b>156</b>
4.1 Perspectivas	<b>157</b>
4.2 Oportunidades e desafios	<b>157</b>
<b>CAPÍTULO 7: BIODIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS EUCARIONTES</b>	<b>161</b>
<b>1. Biodiversidade e taxonomia de micro-organismos eucariontes</b>	<b>162</b>
1.1 Fungos	<b>163</b>
1.1.1 Fungos filamentosos marinhos	<b>164</b>
1.1.2 Leveduras marinhas	<b>165</b>
1.2 Microalgas	<b>166</b>
<b>2. Abordagens metodológicas para o estudo de micro-organismos eucariontes marinhos</b>	<b>167</b>
2.1 Métodos de coleta, isolamento e preservação	<b>168</b>
2.1.1 Coleta	<b>168</b>
2.1.2 Isolamento	<b>168</b>
2.1.3 Preservação	<b>170</b>
2.2 Identificação molecular de micro-organismos eucariontes	<b>172</b>
2.3 Amostragem molecular em ambiente marinho	<b>173</b>
<b>3. Aplicações da biodiversidade na biotecnologia marinha</b>	<b>174</b>
3.1 Produção de biomoléculas a partir de leveduras e microalgas marinhas	<b>175</b>
3.1.1 Produção de alimentos para a população humana	<b>176</b>
3.1.2 Pigmentos naturais	<b>176</b>
3.1.3 Vitaminas e suplementos alimentares	<b>178</b>
3.1.4 Produção de biocombustíveis – bioetanol	<b>178</b>
3.1.5 Produção de biocombustíveis – biodiesel	<b>178</b>
3.1.6 Enzimas de aplicação industrial	<b>179</b>
3.2 A engenharia genética como ferramenta na produção de biomoléculas oriundas do ambiente marinho	<b>181</b>
3.2.1 Elementos envolvidos em expressão heteróloga de proteínas	<b>181</b>
3.2.2 Produção de novos compostos por expressão heteróloga	<b>183</b>
3.2.3 Ferramentas moleculares para a clonagem e expressão heterólogas de vias em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>184</b>
3.3 Biomoléculas produzidas por micro-organismos eucariontes marinhos	<b>185</b>
4. Conclusões	<b>187</b>
5. Perspectivas, oportunidades e desafios	<b>187</b>
<b>CAPÍTULO 8: DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR PCR EM TEMPO REAL</b>	<b>193</b>
<b>1. O que é diagnóstico molecular por <i>real-time</i> PCR</b>	<b>194</b>

1.1 Definição	194
1.2 Histórico	195
1.3 Exemplos de estudos e aplicações na biotecnologia marinha	197
1.3.1 Autenticação de pescados e frutos do mar	197
1.3.2 Aquacultura: detecção de patógenos, diagnóstico	200
1.3.3 Florações marinhas tóxicas: identificação, detecção e controle	203
<b>2. Abordagens metodológicas</b>	<b>205</b>
2.1 RT-PCR ou QRT-PCR ( <i>reverse transcriptase chain reaction</i> )	206
2.2 QPCR do tipo multiplex	207
2.3 Terminologia da <i>real-time</i> PCR	207
2.4 Sistemas de detecção de fluorescência da <i>real-time</i> PCR	210
2.5 Coleta e preservação	211
2.6 Preparação de amostras	213
2.6.1 Extração de DNA	214
2.6.2 Extração de RNA	215
2.6.3 Avaliação da quantidade e qualidade do ácido nucleico obtido	215
2.7 Plataformas analíticas	216
<b>3. Conclusões</b>	<b>219</b>
<b>4. Perspectivas</b>	<b>220</b>
<b>5. Oportunidades e desafios</b>	<b>222</b>
<b>CAPÍTULO 9: BIODIVERSIDADE DE INVERTEBRADOS MARINHOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO</b>	<b>229</b>
1. Introdução	230
2. Os invertebrados e o ambiente marinho	231
3. Acessando a biodiversidade	233
3.1 Coleta e preservação	234
3.1.1 Material para estudos taxonômicos e ecológicos	237
3.1.2 Material para estudos biotecnológicos	240
4. Biotecnologia de invertebrados marinhos	243
5. Perspectivas, oportunidades e desafios	249
<b>CAPÍTULO 10: GENÉTICA DE POPULAÇÕES NA ERA DA GENÔMICA</b>	<b>255</b>
1. Introdução	256
2. Conceito de genética de populações	256
3. Diversidade genética e estudos populacionais	256
4. Biologia molecular e estudos populacionais	257
5. Estruturação e conectividade entre populações e a sua importância para a conservação	261
6. Delimitação de espécies	263
7. Genômica evolutiva	264
8. Considerações finais	264

<b>CAPÍTULO 11: GENÔMICA, METAGENÔMICA E FERRAMENTAS DE ANOTAÇÃO</b>	<b>271</b>
1. Introdução	<b>272</b>
1.1 Definições de gene, genoma e genômica	<b>272</b>
1.2 Breve histórico e importância da genômica	<b>273</b>
2. Sequenciamento de DNA	<b>274</b>
2.1 Primeira geração de tecnologias de sequenciamento	<b>274</b>
2.2 Segunda geração de tecnologias de sequenciamento	<b>274</b>
2.3 Terceira geração de tecnologias de sequenciamento	<b>278</b>
3. Estrutura e função de genomas	<b>279</b>
4. Metagenômica	<b>279</b>
4.1 Definição de metagenômica	<b>279</b>
4.2 Histórico e importância da metagenômica	<b>280</b>
4.2.1 Abordagem metagenômica	<b>280</b>
4.2.2 Anotação dos metagenomas	<b>281</b>
5. Ferramentas de bioinformática para a Anotação de genomas e metagenomas	<b>282</b>
6. Aplicações na biotecnologia marinha	<b>284</b>
<b>CAPÍTULO 12: TRANSCRIPTÔMICA E METATRANSCRIPTÔMICA</b>	<b>293</b>
1. O que é transcriptômica e metatranscriptômica	<b>294</b>
2. Abordagens metodológicas	<b>296</b>
2.1 Coleta e preservação	<b>296</b>
2.2 Preparação de amostras	<b>297</b>
2.2.1 Extração de RNA e isolamento	<b>297</b>
2.2.2 Quantificação de RNA e avaliação do grau de integridade e pureza	<b>298</b>
2.3 Plataformas analíticas	<b>300</b>
2.4 Análise de dados de RNAseq	<b>304</b>
2.4.1 Pré-processamento dos dados	<b>304</b>
2.4.2 Montagem e mapeamento das sequências	<b>304</b>
2.4.3 Normalização e análise da expressão diferencial	<b>306</b>
2.4.4 Anotação funcional dos transcritos	<b>308</b>
3. Aplicações da transcriptômica e metatranscriptômica na biotecnologia marinha	<b>308</b>
4. Conclusões	<b>311</b>
<b>CAPÍTULO 13: PROTEÔMICA E METAPROTEÔMICA</b>	<b>317</b>
1. Fundamentos de proteômica e metaproteômica	<b>318</b>
2. Abordagens metodológicas	<b>320</b>
2.1 Coleta e preservação	<b>320</b>
2.2 Extração de proteínas	<b>322</b>
2.3 Fracionamento da mistura de proteínas	<b>324</b>
2.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida	<b>325</b>
2.3.2 Cromatografia líquida	<b>327</b>

2.4 Plataformas analíticas de espectrometria de massas	<b>329</b>
2.4.1 Estratégias de espectrometria de massas para análise de proteínas	<b>333</b>
2.5 Interpretação dos dados	<b>335</b>
<b>3. Aplicações biotecnológicas de proteínas e derivados proteicos de origem marinha</b>	<b>335</b>
<b>4. Perspectivas: oportunidades e desafios</b>	<b>338</b>
<b>CAPÍTULO 14: METABOLÔMICA DE SISTEMAS MARINHOS</b>	<b>345</b>
<b>1. O que é metabolômica</b>	<b>346</b>
1.1 Conceito, histórico e aplicações	<b>346</b>
1.2 Abordagens ao estudo do metaboloma	<b>348</b>
1.3 Preparo da amostra e <i>quenching</i> metabólico	<b>349</b>
<b>2. Aplicações da metabolômica à biotecnologia marinha</b>	<b>351</b>
2.1 Macroalgas como fontes de compostos bioestimulantes em espécies de interesse agrícola	<b>351</b>
<b>3. Conclusões</b>	<b>354</b>
<b>CAPÍTULO 15: GESTÃO DE DADOS DE BIOTECNOLOGIA MARINHA</b>	<b>359</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>360</b>
<b>2. O que são bancos de dados</b>	<b>361</b>
2.1 Ciclo de vida de dados de biodiversidade	<b>362</b>
2.2 Planejamento	<b>363</b>
2.3 Tipos de dados de biodiversidade	<b>363</b>
2.4 Ocorrências de espécies	<b>363</b>
2.5 Listas de espécies	<b>364</b>
2.6 Dados de amostragens e observacionais	<b>364</b>
2.7 Ômicas	<b>365</b>
2.8 Literatura científica	<b>365</b>
2.9 Imagens e vídeos	<b>365</b>
2.10 Coleta	<b>365</b>
2.11 Certificação	<b>366</b>
2.12 Descrição	<b>366</b>
2.13 <i>Ecological metadata language (EML)</i>	<b>367</b>
2.14 Preservação	<b>368</b>
2.15 <i>Darwin core</i>	<b>368</b>
<b>3. Sistemas de informação em biodiversidade</b>	<b>371</b>
<b>3.1 Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr)</b>	<b>371</b>
3.2 Brazilian Marine Biodiversity Database (BaMBa)	<b>372</b>
3.3 Descoberta	<b>375</b>
3.4 Integração	<b>375</b>
3.5 Análise	<b>376</b>
<b>4. Conclusão</b>	<b>377</b>

<b>CAPÍTULO 16: FERRAMENTAS PARA ANÁLISE DE DADOS EM BIOTECNOLOGIA MARINHA</b>	<b>383</b>
1. Introdução	<b>384</b>
2. Coleta de dados	<b>384</b>
3. Tipos de dados	<b>385</b>
3.1 Dados categóricos	<b>385</b>
3.2 Dados numéricos	<b>385</b>
3.2.1 Dados contínuos	<b>385</b>
3.2.1 Dados discretos	<b>386</b>
4. Tipos de variáveis	<b>386</b>
5. Medidas de centralidade, dispersão e não normalidade	<b>387</b>
5.1 Medidas de centralidade	<b>387</b>
5.2 Medidas de dispersão	<b>387</b>
5.3 Medidas de não normalidade	<b>388</b>
5.3.1 Assimetria	<b>388</b>
5.3.2 Curtose	<b>389</b>
6. Gráficos para uma variável	<b>389</b>
6.1 Gráfico da função de distribuição acumulada	<b>389</b>
6.2 Histograma e gráfico de barras	<b>390</b>
6.3 Gráfico de caixa	<b>390</b>
7. Medidas de associação entre duas ou mais variáveis	<b>392</b>
7.1 Covariância	<b>392</b>
7.2 Coeficiente de correlação de Karl Pearson	<b>392</b>
8. Gráficos de associação entre duas ou mais variáveis	<b>393</b>
8.1 Gráfico de dispersão 2D	<b>393</b>
8.2 Quadrantes no gráfico de dispersão 2D	<b>394</b>
8.3 Gráfico de dispersão 3D	<b>395</b>
9. Transformações e padronizações de dados	<b>396</b>
9.1 Transformações de dados	<b>396</b>
9.1.1 Transformação binária	<b>396</b>
9.1.2 Transformação logarítmica	<b>396</b>
9.1.3 Arco-seno da raiz quadrada	<b>397</b>
9.2 Padronizações de dados	<b>397</b>
9.2.1 Padronização de linhas	<b>398</b>
9.2.2 Padronização de coluna	<b>398</b>
10. Análise de dados e aprendizado estatístico em biotecnologia marinha	<b>399</b>
10.1 Regressão linear – predição	<b>400</b>
10.1.1 Quando usar regressão linear	<b>402</b>
10.1.2 Aplicação de regressão linear simples à produção de salmão	<b>404</b>
10.1.3 Regressão linear × correlação	<b>405</b>
10.1.4 Regressão linear múltipla	<b>405</b>
10.1.5 Testes de hipótese	<b>406</b>
10.1.6 Quando usar a regressão linear múltipla	<b>406</b>

10.1.7	Correlação × causalidade	407
10.1.8	Limitações da regressão linear	408
10.2	Regressão logística – classificação	408
10.2.1	Regressão logística simples	409
10.2.2	Regressão logística múltipla	411
10.2.3	Limitações da regressão logística	412
10.3	Ordenamento e redução de dimensão	412
10.3.1	Análise de componentes principais (PCA)	413
10.3.2	Dimensionamento multidimensional não métrico (NMDS)	416
10.4	Agrupamento hierárquico	419
10.4.1	Dendograma	419
10.5	métodos baseados em árvores de decisão	422
10.5.1	Árvores de regressão	423
10.5.2	Árvores de classificação	425
10.5.3	Árvores ensacadas ( <i>bagging trees</i> )	427
10.5.4	Florestas aleatórias ( <i>random forests</i> )	427
10.5.5	Árvores de crescimento progressivo ( <i>boosting trees</i> )	428
11.	Conclusões	432
<b>CAPÍTULO 17:</b>	<b>PRODUÇÃO DE MICROALGAS MARINHAS E O CONCEITO DE BIORREFINARIA</b>	<b>435</b>
1.	Introdução	436
2.	Composição bioquímica das microalgas	437
3.	Biocombustíveis	438
4.	O conceito de biorrefinaria	441
5.	Bioelementos	444
5.1	Ácidos graxos	444
5.2	Proteínas e aminoácidos	445
5.3	Açúcares	445
5.4	Pigmentos	445
5.5	Vitaminas e minerais	445
6.	Conclusões	446
<b>CAPÍTULO 18:</b>	<b>MACROALGAS E TERPENÓIDES MARINHOS</b>	<b>449</b>
1.	Terpenos	450
1.1	Definição	450
1.2	Histórico de estudos	451
1.3	Estudos fundamentais para a biotecnologia marinha	454
2.	Abordagens metodológicas	456
2.1	Coleta e preservação	456
2.2	Preparação de amostras	457
2.3	Plataformas analíticas	457
2.4	Tipos de análises	458

3. Aplicações da biodiversidade na biotecnologia marinha	458
4. Conclusões	458
<b>CAPÍTULO 19: PRODUTOS NATURAIS MARINHOS</b>	<b>465</b>
1. O que são metabólitos secundários e como desvendar sua estrutura química	466
1.1 Definição	466
1.2 Histórico	467
1.3 Estudos fundamentais para a biotecnologia marinha	469
1.3.1 Estudos fundamentais para a biotecnologia marinha	469
1.3.2 Briozoários	473
1.3.3 Moluscos	477
1.3.4 Fungos marinhos	480
1.3.5 Bactérias marinhas	481
1.3.6 Esponjas marinhas	482
2. Abordagens metodológicas para a descoberta de metabólitos secundários de organismos marinhos	485
2.1 Coleta e preservação	485
2.2 Preparação de amostras	486
2.2.1 Extração	486
2.3 Análise de extratos	486
2.4 Abordagens para o isolamento de produtos naturais marinhos	486
2.5 Identificação de produtos naturais marinhos	486
3. Aplicações da biodiversidade na biotecnologia marinha	487
4. Conclusões	488
<b>CAPÍTULO 20: ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM MARINHA</b>	<b>497</b>
1. Introdução	498
2. Vertebrados	499
3. Invertebrados	500
3.1 Cnidários/Corais	500
3.2 Esponjas	503
4. Algas	503
5. Microbiomas	505
5.1 Fungos	506
5.2 Bactérias	507
5.3 Cianobactérias	509
6. Perspectivas	513
<b>CAPÍTULO 21: BIOTECNOLOGIA MARINHA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTICÂNCER</b>	<b>519</b>
1. O que são fármacos anticâncer	520
1.1 Definição	520

1.2 Histórico	<b>522</b>
1.3 Alguns exemplos de estudos fundamentais para a biotecnologia marinha	<b>524</b>
1.3.1 Citarabina	<b>524</b>
1.3.2 Trabectedina	<b>526</b>
1.3.3 Halicondrina B	<b>527</b>
1.3.4 Dolastatinas	<b>528</b>
1.3.5 Plitidepsina	<b>530</b>
1.3.6 Salinosporamida A	<b>531</b>
<b>2. Abordagens metodológicas</b>	<b>533</b>
2.1 Coleta e preservação	<b>533</b>
2.2 Métodos para processamento de amostras para cultivo de actinomicetos	<b>535</b>
2.3 Métodos de preparo de extratos e isolamento de substâncias do metabolismo secundário	<b>536</b>
2.4 Avaliação da atividade biológica	<b>543</b>
<b>3. Aplicações da biodiversidade na biotecnologia marinha</b>	<b>545</b>
<b>4. Conclusões</b>	<b>547</b>
4.1 Perspectivas	<b>547</b>
4.2 Oportunidades e desafios	<b>547</b>
<b>CAPÍTULO 22: FÁRMACOS CONTRA DOENÇAS TROPICAIS E PARASITOS</b>	<b>555</b>
<b>1. Doenças tropicais</b>	<b>556</b>
1.1 Trypanossoma e outros parasitos	<b>556</b>
<b>2. Acidentes por animais peçonhentos</b>	<b>558</b>
2.1 Aracnídeos	<b>559</b>
2.2 Bothrops e outros ofídios	<b>561</b>
<b>3. Biodiversidade marinha como fonte de potenciais fármacos</b>	<b>562</b>
3.1 Algas, esponjas, corais e outros organismos marinhos como fonte de anti-parasíticos	<b>563</b>
3.2 Considerações finais e perspectivas	<b>568</b>
<b>CAPÍTULO 23: BIOINCRUSTAÇÃO E BIOINVASÃO SOB A PERSPECTIVA DA BIOTECNOLOGIA MARINHA</b>	<b>575</b>
<b>1. Introdução e conceitos</b>	<b>576</b>
<b>2. A bioincrustação como um problema: estruturas submersas feitas pelo homem, navios, plataformas</b>	<b>577</b>
<b>3. Metodologia de estudos da bioincrustação</b>	<b>580</b>
3.1 Coleta e preservação das espécies incrustantes em navios, plataformas, píeres etc.	<b>580</b>
3.2 Monitoramento da bioincrustação	<b>584</b>
<b>4. A bioincrustação como vetor de espécies exóticas em navios e plataformas</b>	<b>586</b>

5. Estratégias de controle da bioincrustação usando a biotecnologia marinha	<b>590</b>
6. Prevenção, erradicação e controle da bioinvasão por bioincrustação usando biotecnologia marinha	<b>593</b>
6.1 Prevenção e controle	<b>594</b>
6.2 Erradicação e controle	<b>595</b>
7. Perspectivas futuras	<b>596</b>
<b>CAPÍTULO 24: BIORREMEDIAÇÃO</b>	<b>601</b>
1. Formação do petróleo	<b>602</b>
2. Composição do petróleo	<b>602</b>
3. Água produzida do petróleo	<b>604</b>
4. Microbiota das formações geológicas do petróleo	<b>604</b>
5. Diversidade de biodegradadores de óleo	<b>605</b>
5.1 Bactérias	<b>605</b>
5.1.1. Principais gêneros degradadores de óleo	<b>605</b>
5.2 Arquéias	<b>612</b>
5.3 Fungos	<b>615</b>
6. Vazamentos, dispersante e biodegradação	<b>616</b>
<b>CAPÍTULO 25: MEDIÇÃO E MONITORAMENTO EM OCEANOGRAFIA</b>	<b>625</b>
1. Processos físicos no oceano	<b>626</b>
2. O que são a medição e o monitoramento oceanográfico	<b>630</b>
2.1 Histórico	<b>631</b>
2.2 Alguns exemplos de estudos fundamentais para a biotecnologia marinha	<b>632</b>
2.3 Abordagens metodológicas	<b>633</b>
2.3.1 Medição remota	<b>634</b>
2.3.2 Medição <i>in situ</i>	<b>636</b>
2.3.3 Monitoramento dos oceanos	<b>638</b>
2.4 Aplicações da medição e do monitoramento oceanográfico na biotecnologia marinha	<b>639</b>
3. Conclusões	<b>640</b>
<b>CAPÍTULO 26: POLUIÇÃO MARINHA</b>	<b>645</b>
1. O que é poluição marinha	<b>646</b>
1.1 Classificação da poluição	<b>646</b>
1.1.1 Fontes de poluição	<b>646</b>
1.1.2 Tipos de contaminantes	<b>648</b>
1.2 Principais tipos de poluição	<b>649</b>
1.2.1 Poluição por nutrientes inorgânicos	<b>649</b>
1.2.2 Poluição por metais	<b>649</b>
1.2.3 Poluição por pesticidas organoclorados	<b>650</b>

1.3 Histórico	651
1.4 Exemplos de estudos fundamentais para a biotecnologia marinha	653
<b>2. Abordagens metodológicas</b>	<b>654</b>
2.1 Análises toxicológicas	655
2.1.1 Toxicologia	657
<b>3. Aplicações da biotecnologia marinha</b>	<b>658</b>
<b>4. Conclusões</b>	<b>660</b>
<b>CAPÍTULO 27: IMPORTÂNCIA DE ÁREAS MARINHAS PROTEGIDAS PARA CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE E DO PATRIMÔNIO BIOTECNOLÓGICO BRASILEIRO</b>	<b>663</b>
1. O que são Áreas Marinhas Protegidas	664
2. Áreas Marinhas Protegidas no Brasil	666
3. Áreas Marinhas Protegidas e biotecnologia	667
4. Abordagens metodológicas	668
4.1 Monitoramento de Áreas Marinhas Protegidas	669
4.2 Tipos de análises e bancos de dados	669
5. Conclusões	669
<b>CAPÍTULO 28: A GESTÃO DO USO ECONÔMICO DA BIODIVERSIDADE COMO GARANTIA DE RECURSOS PARA A CONSERVAÇÃO AMBIENTAL</b>	<b>675</b>
1. Introdução	676
1.1 O Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) e o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN)	677
2. Conclusões	679
<b>CAPÍTULO 29: DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ORIUNDOS DA BIOTECNOLOGIA MARINHA</b>	<b>683</b>
1. Introdução	684
2. Fármacos de origem marinha em circulação no mercado	684
3. Competências e interesses para a saúde	688
3.1 Competências finalísticas do Ministério da Saúde	689
3.2 Pesquisa, desenvolvimento e inovação na saúde	692
4. Ações do Ministério da Saúde com a biotecnologia marinha	695
4.1 Pesquisas fomentadas pelo ministério da saúde em biotecnologia Marinha	695
4.2 O Ministério da Saúde no Comitê Executivo de Biotecnologia Marinha	695
4.3 Recentes ações realizadas pelo ministério da saúde em biotecnologia Marinha	698
4.4 Perspectivas futuras em biotecnologia marinha em saúde	699
5. Conclusões	699

<b>CAPÍTULO 30: COLEÇÃO MICROBIOLÓGICA: DEFINIÇÃO, CARACTERÍSTICAS, PAPEL BIOTECNOLÓGICO E A CRIAÇÃO DA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DA AMAZÔNIA AZUL</b>	<b>703</b>
1. Histórico	<b>704</b>
2. O que são coleções biológicas	<b>704</b>
3. O que fazem as coleções biológicas / atividades das coleções biológicas	<b>705</b>
4. Metodologias de preservação de coleções microbiológicas	<b>707</b>
5. Taxonomia	<b>707</b>
6. Áreas de aplicação das coleções biológicas	<b>708</b>
6.1 Exemplos de estudos fundamentais para a biotecnologia marinha: criação da coleção de bactérias da Amazônia Azul	<b>709</b>
6.2 Aplicações da biodiversidade na biotecnologia marinha	<b>710</b>
7. Coleções biológicas e centros de recursos biológicos	<b>710</b>
8. Conclusões	<b>712</b>
<b>CAPÍTULO 31: LEIS E HISTÓRICO DE PATENTES NO BRASIL</b>	<b>717</b>
1. Introdução	<b>718</b>
2. Patentes de biotecnologia	<b>719</b>
3. Biotecnologia: motor para o desenvolvimento tecnológico	<b>720</b>
4. A importância da proteção intelectual: patentes	<b>722</b>
4.1 Patentes em biotecnologia marinha	<b>723</b>
4.2 Redes de pesquisa e patentes em biotecnologia marinha no Brasil	<b>726</b>
<b>CAPÍTULO 32: DESENVOLVIMENTO DE NEGÓCIOS EM BIOTECNOLOGIA MARINHA</b>	<b>729</b>
1. Biotecnologia marinha e o desenvolvimento de novos produtos	<b>730</b>
2. Biotecnologia marinha e o desenvolvimento de produtos sustentáveis	<b>731</b>
3. A estrutura jurídica brasileira e os modelos de negócios para desenvolvimento de produtos sustentáveis	<b>732</b>
3.1 <i>Spinoffs</i>	<b>733</b>
3.2 <i>Startups</i>	<b>734</b>
3.3 Inventores	<b>735</b>
3.4 Acordos de licenciamento e transferência de tecnologia	<b>736</b>
3.5 Acordos de desenvolvimento de tecnologia	<b>737</b>
3.6 Acordos de cooperação para desenvolvimento	<b>737</b>
3.7 Empresa privada	<b>738</b>
4. Processos de desenvolvimento de produtos em biotecnologia marinha	<b>738</b>
5. O processo de desenvolvimento de produtos sustentáveis (PDPS) para a biotecnologia marinha	<b>741</b>
5.1 Planejamento do projeto de desenvolvimento	<b>742</b>
5.2 Avaliação da viabilidade mercadológica	<b>743</b>
5.3 Planejamento e avaliação da viabilidade do negócio	<b>743</b>

5.4 Planejamento operacional do produto sustentável	744
5.5 Planejamento, negociação e monitoramento de contratos	745
5.6 Governança do processo	745
5.7 Planejamento da descontinuidade do produto sustentável	746
5.8 Aderência do PDPS aos modelos de negócio de biotecnologia marinha	746
<b>CAPÍTULO 33: AVALIAÇÃO DO CICLO DE VIDA</b>	<b>755</b>
1. O que é ACV?	756
2. Histórico e importância da ACV	757
3. Metodologia de ACV	758
3.1 Definição de objetivo e escopo	758
3.1.1 Fronteira do sistema e sistema de produto	759
3.1.2 Função, unidade funcional e fluxo de referência	760
3.1.3 Tratamento dos processos multifuncionais	761
3.1.4 Categorias de impacto e método de avaliação de impacto	764
3.1.5 Requisitos de qualidade dos dados	764
3.2 Fase 2 – Análise de inventário do ciclo de vida	764
3.3 Fase 3 – Avaliação de impacto do ciclo de vida	764
3.4 Fase 4 – Interpretação	765
4. Softwares	766
5. ACV & Biotecnologia marinha	766
5.1 Exemplos de aplicação da ACV	766
5.1.1 Com enfoque energético	767
5.1.2 Com enfoque no sistema produtivo	769
5.1.3 Com enfoque em bioproduto	774
5.1.4 Com enfoque em gestão de resíduos	776
6. Considerações finais	778
<b>CAPÍTULO 34: TOMADA DE DECISÃO MULTICRITÉRIO</b>	<b>781</b>
1. Tomada de decisão multicritério	782
1.1 Visão geral sobre tomada de decisão multicritério	782
1.1.1 Atores do processo decisório	783
1.1.2 Problemáticas de referência	784
1.2 Conceitos básicos	784
1.2.1 Critério	784
1.2.2 Relação de dominância	785
1.2.3 Informação intracritério e intercritério	785
1.3 Importância da análise multicritério	786
1.4 Especificidades e objetivos	787
1.5 Princípios e processos para a tomada de decisão multicritério	789
1.5.1 A matriz de desempenho: alternativas, critérios e indicadores	791
1.5.2 Modelagem multicritério: princípios básicos	792

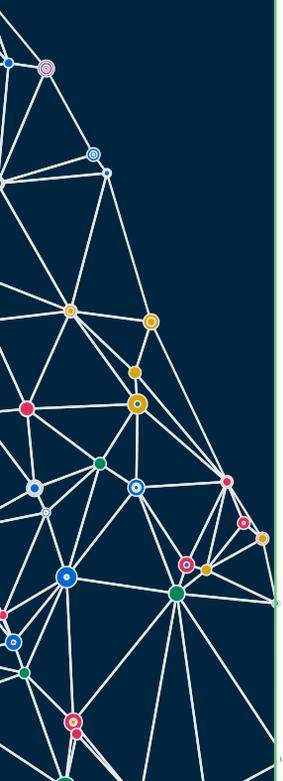
1.6 Principais métodos multicritério de apoio à decisão	<b>793</b>
1.6.1 Abordagem do critério único de síntese	<b>793</b>
1.6.2 Abordagem de sobreclassificação ( <i>outranking</i> ou <i>surclassement</i> )	<b>796</b>
<b>2. Multicritério e biotecnologia marinha</b>	<b>807</b>
2.1 Biotecnologia marinha e auxílio multicritério à decisão: objetivos e aplicações	<b>808</b>
<b>3. Conclusão</b>	<b>810</b>
<b>CAPÍTULO 35: BIOTECNOLOGIA MARINHA E GERAÇÃO DE PATENTES</b>	<b>813</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>814</b>
1.1 Patentes em metagenômica de amostras marinhas e adjacentes	<b>814</b>
1.2 Exemplos de patentes de produtos de micro-organismos marinhos	<b>815</b>
1.3 Exemplos de patentes a partir de produtos obtidos de esponjas marinhas	<b>816</b>
1.4 Exemplos de patentes a partir de produtos obtidos de tunicados	<b>818</b>
1.5 Exemplos de patentes a partir de produtos obtidos de moluscos	<b>818</b>
1.6 Exemplos de patentes a partir de produtos obtidos de equinodermos	<b>819</b>
1.7 Exemplos de patentes a partir de produtos obtidos de algas	<b>819</b>
1.8 Exemplos de patentes a partir de produtos obtidos de crustáceos e briozoários	<b>821</b>
<b>2. Conclusões</b>	<b>821</b>
<b>CAPÍTULO 36: COMO COMEÇAR A SUA STARTUP</b>	<b>825</b>
<b>1. O que é uma startup?</b>	<b>826</b>
<b>2. Identificando a oportunidade</b>	<b>827</b>
<b>3. Capacitação empreendedora</b>	<b>828</b>
<b>4. Modelo de negócio</b>	<b>830</b>
4.1 Análise de mercado	<b>831</b>
4.1.1 Faça uma boa análise do seu setor	<b>832</b>
4.1.2 Identifique seus clientes	<b>832</b>
4.1.3 Estude seus concorrentes	<b>832</b>
<b>5. Alô, investidor!</b>	<b>833</b>
<b>6. Incube a sua ideia</b>	<b>833</b>
<b>7. Conclusões e perspectivas</b>	<b>835</b>



# INTRODUÇÃO À BIOTECNOLOGIA MARINHA

Ronaldo Oliveira Cavalli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande



A biotecnologia pode ser definida simplesmente como o uso de organismos pelo ser humano. De forma mais elaborada, pode também ser definida como o conjunto de conhecimentos que permite a utilização de agentes biológicos, sejam eles organismos, células, organelas ou moléculas, para obter bens, estabelecer processos ou assegurar serviços de interesse social e econômico em setores estratégicos como a saúde e o bem-estar humano e animal, a agropecuária e o meio ambiente. É considerada uma área do conhecimento estratégica para elevar tanto a quantidade como a qualidade dos alimentos, produtos e serviços colocados à disposição da sociedade. No seu sentido mais amplo, portanto, a biotecnologia compreende a manipulação de micro-organismos, plantas e animais, com o objetivo de obter processos e produtos de interesse econômico. Já no sentido mais restrito, a biotecnologia está associada ao emprego de técnicas modernas, de natureza variada, que envolvem uma base científica comum, e que requerem o constante aporte de conhecimento científico e tecnológico oriundo dos mais diferentes campos do conhecimento. A Organização das Nações Unidas – ONU, por meio da Convenção sobre Diversidade Biológica, expande a definição de biotecnologia como sendo “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica”.

A biotecnologia marinha, às vezes também chamada de “biotecnologia azul”, é uma disciplina emergente baseada no uso de organismos marinhos, seus genomas ou produtos derivados, para o benefício do homem. Por se tratar de uma disciplina relativamente jovem e em constante desenvolvimento, sua definição e subáreas também estão em constante evolução. Nos últimos anos, rápidos avanços nas aplicações científica e comercial da biotecnologia marinha vêm sendo observados. Isso tem ocorrido particularmente em relação ao desenvolvimento de produtos naturais e de fármacos, em que se destaca a elaboração de antibióticos e de drogas anticâncer, antivirais e antitrombóticas. A produção de nutracêuticos, cosmeceúticos e cosméticos, e de energia, especialmente biocombustíveis, a aquicultura, a genômica, a tecnologia transgênica, a recombinação genética, fusão celular, entre outras, também tem grande destaque (Cavalli, 2015; Cavalli et al., 2019; Thompson et al., 2017).

A grande vantagem da biotecnologia marinha em relação à biotecnologia “terrestre” se deve à gigantesca biodiversidade encontrada nos mares. Os oceanos são reconhecidos como o ambiente onde a vida surgiu e a partir do qual ela se disseminou pela Terra. Nos mais de 3,8 bilhões de anos de história da evolução da vida, apenas algumas formas de vida marinha tiveram sucesso ao invadir o ambiente terrestre. Os organismos que se adaptaram a esse novo ambiente representavam apenas uma pequena fração de todas as espécies marinhas e, portanto, inúmeras outras permaneceram nos mares e continuam evoluindo de forma independente até os dias de hoje. Como os oceanos cobrem mais de dois terços do planeta, é natural que a maior biodiversidade esteja exatamente nos oceanos. Estima-se que cerca de 80% das espécies descritas até hoje, algo próximo de 230.000 espécies, habitem o ambiente marinho. Quase a totalidade dos grupos de organismos vivos tem representantes nos oceanos. Como muitos ecossistemas (p. ex., recifes e oceano profundo) ainda são em grande parte inexplorados, pou-

co estudados e certamente subutilizados, muitas espécies ainda não foram sequer estudadas ou são totalmente desconhecidas. Algumas espécies marinhas vivem em condições extremas, - como em ambientes com diferentes níveis de temperatura, pressão e/ou luminosidade. Considerando a existência de condições tão extremas, os seres vivos que aí habitam devem, sem dúvida, possuir mecanismos distintos que permitam a sua sobrevivência. Em muitos casos, essas espécies contêm compostos únicos, não produzidos por organismos terrestres, e que podem ser explorados de inúmeras maneiras. É inclusive bastante provável que sejam encontrados usos inteiramente novos em áreas muito distantes dos oceanos. Esse é o caso, por exemplo, de *Pyrococcus abyssi*, micro-organismo descoberto na década de 1990 nas profundezas abissais do Oceano Pacífico. Com capacidade de tolerar altas temperaturas e pressão, sua enzima DNA polimerase é utilizada em testes por metodologia da reação da polimerase em cadeia (em inglês, *polymerase chain reaction* - PCR). Uma das diversas aplicações dessa enzima consiste na multiplicação de porções específicas do genoma da SARS-Cov-2, o que possibilita a detecção da presença desse vírus em amostras clínicas ou ambientais.

Outros organismos marinhos, não necessariamente expostos a condições ambientais extremas, também contam com substâncias que são produto do seu metabolismo secundário. Pesquisas sobre as relações ecológicas entre micro-organismos marinhos, corais e outros invertebrados, assim como com algas, demais plantas marinhas e vertebrados, fornecem muitos exemplos das complexas interações químicas entre organismos que compartilham o mesmo habitat. Na maioria dos casos, essas interações incluem sistemas de sinalização ou comunicação infra e intraespecífica, defesa contra competidores e predadores/demarcção territorial, regulação da homeostase e reprodução. Ao se estudar a composição desses organismos, uma variedade de toxinas e substâncias químicas vem sendo descritas, muitas das quais provaram ter valor farmacêutico. O exemplo clássico é o desenvolvimento do AZT (azidotimidina ou zidovudina), a primeira droga aprovada para o tratamento do HIV/AIDS. O AZT foi desenvolvido graças ao isolamento de moléculas encontradas em uma espécie de esponja marinha até então desconhecida. Por sua condição sésil, as esponjas são propensas a infecções microbianas. Como não contam com o complexo sistema imunológico da maioria das espécies animais, as esponjas tiveram que desenvolver meios celulares e moleculares para protegê-las contra patógenos. Tendo isso em mente, o químico orgânico Werner Bergmann coletou, em 1945, uma espécie de esponja no Mar do Caribe que foi inicialmente classificada como *Cryptotethya crypta* e posteriormente renomeada *Tectitethya crypta*. No laboratório, dois nucleosídeos, denominados espongotimidina e espongouridina, foram isolados e posteriormente usados como modelos para o desenvolvimento de várias drogas. Coletivamente, essas drogas tiveram um profundo impacto na saúde global. A citarabina (Ara-C), por exemplo, é um componente essencial na terapia do câncer para leucemias e linfomas agudos, enquanto o aciclovir (ACV) trata herpes, varicela e herpes-zoster. Ambas fazem parte da seleta lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde - OMS.

Vários outros compostos de origem marinha com potencial de uso na saúde humana

foram testados clinicamente nas últimas décadas. Esse campo de pesquisa e desenvolvimento vem crescendo significativamente, graças aos avanços nos métodos de coleta em águas profundas, nas técnicas de extração dos componentes e na produção em escala compatível às demandas do mercado, particularmente através da aquicultura e da síntese química. Entretanto, estima-se que um número relativamente pequeno de compostos químicos potencialmente úteis dos organismos marinhos tenha sido isolado e identificado. Acredita-se, por exemplo, que uma parcela ínfima das espécies de bactérias e fungos tenha sido investigada até agora. Sem medo de errar, os compostos que ainda serão descobertos representam um dos nossos maiores tesouros e certamente terão um impacto ainda maior na nossa qualidade de vida.

As aplicações da biotecnologia marinha vão muito além da bioprospecção, a qual é provavelmente a sua faceta mais conhecida pelo público em geral. Muito além da obtenção de drogas anticâncer e antivirais, a biodiversidade marinha pode ser fonte de uma infinidade de outras substâncias de igual interesse, como compostos com valor nutricional ou nutracêutico (p. ex., peptídeos, pigmentos e ácidos graxos), compostos antiprotozoários e com propriedades anti-incrustantes. Nesse sentido, o aprimoramento da aquicultura de espécies marinhas, ou maricultura, também pode ser a solução no fornecimento de quantidades adequadas de moléculas para os estudos clínicos e eventual comercialização, o que, em muitos casos, é considerado um dos principais gargalos na utilização dessas substâncias. A briostatina 1, molécula utilizada como adjuvante na terapia do câncer e em enfermidades com comprometimento do sistema imunológico, poderia ser obtida pela captura do briozoário *Bugula neritina* diretamente no seu ambiente natural. Entretanto, além dos impactos ambientais decorrentes dessa captura, o baixo rendimento no processo de extração não seria capaz de atender a demanda do mercado, o que inviabilizaria sua utilização como fármaco. A saída, portanto, foi a produção de *B. neritina* pela aquicultura. Apesar do custo relativamente elevado, a produção em sistemas extensivos no mar demonstrou ser economicamente viável e possibilitaria a obtenção de briostatina 1 em volumes compatíveis com as necessidades do mercado, ao mesmo tempo em que os impactos ambientais seriam minimizados. Outro exemplo relevante é o cultivo de pepinos-do-mar, visando à produção de análogos de heparina para aplicação contra trombose e outras doenças humanas.

A aquicultura também desempenha, cada vez mais, um papel vital na produção de alimentos. Com a estagnação do volume da pesca de captura, o crescimento da população mundial e a divulgação dos benefícios do pescado como alimento saudável, a aquicultura deixou de ser uma atividade artesanal e cresceu fortemente a partir da década de 1990, tendo se transformado no setor de produção primária com o maior crescimento em todo o mundo. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura – FAO/ONU estima que 82 milhões de toneladas de pescado tenham sido produzidas pela aquicultura em 2018, o que corresponde a 250 bilhões de dólares. Portanto, o crescimento mundial do consumo *per capita* de pescado – de 9,0kg em 1961 para 20,5kg em 2018 – tem sido sustentado pela aquicultura.

Não há dúvida de que o Brasil subutiliza o potencial de sua área marinha para produzir alimentos (Bezerra et al., 2016; Cavalli et al., 2011). As abordagens clássicas utilizadas pela aquicultura são limitadas ao rendimento máximo. No entanto, a produtividade pode ser incrementada com a aplicação da engenharia genética, como, por exemplo, a tecnologia transgênica. Embora os benefícios dessa tecnologia possam parecer positivos, particularmente por causa do maior crescimento a um custo menor, a produção de organismos geneticamente modificados provoca calorosas discussões a respeito dos impactos ambientais, bem como enfrenta rejeição por uma parcela significativa dos consumidores. Por isso, estudos a médio e longo prazo sobre os impactos ecológicos e socioeconômicos ainda se fazem necessários para avaliar com exatidão os riscos e os benefícios envolvidos.

Outra área da biotecnologia marinha com grande potencial é a biorremediação, processo pelo qual micro-organismos, fungos, plantas, algas ou suas enzimas são utilizados para degradar, reduzir, remover ou alterar compostos orgânicos tóxicos em outros não nocivos ao meio ambiente e ao homem e, dessa forma, melhorando a condição de ambientes marinhos contaminados. Uma das áreas mais estudadas considera o uso de micro-organismos na degradação de contaminantes, particularmente os hidrocarbonetos do petróleo e gasolina. Embora sua aplicação comercial ainda não seja uma realidade no tratamento de contaminações em áreas estuarinas, costeiras ou no mar aberto, pode ser uma solução em áreas com derramamentos pontuais de óleo ou em estações de tratamento de rejeitos. Assim, embora muito ainda precise ser feito antes que processos de biorremediação confiáveis, seguros e eficazes estejam prontos para uso em larga escala, é certo que o aprimoramento dessa tecnologia beneficiará áreas onde a contaminação ambiental tenha atingido grandes proporções.

A rápida evolução, tanto em termos tecnológicos quanto conceituais, das ditas ciências "ômicas" (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica), assim como na manipulação e análise de grandes quantidades de dados ("*Big data*") por ferramentas de bioinformática, revolucionaram a forma como a biotecnologia marinha vem sendo desenvolvida. O desenvolvimento dessas novas tecnologias permitiu, por exemplo, acessar a variabilidade da molécula de DNA dos organismos de forma direta ou indireta, ampliando o conhecimento sobre diversidade e ômicas de populações. Por sua vez, o avanço da bioprospecção genômica e da metagenômica, com o essencial apoio da bioinformática, facilitou enormemente o processo de identificação de genes com potencial biotecnológico. Em vista disso, as ômicas certamente se farão cada vez mais presentes e necessárias nos estudos relacionados à biotecnologia marinha, bem como das áreas correlatas.

Apesar do inequívoco potencial que a biotecnologia marinha nos oferece, ela depende umbilicalmente da manutenção da biodiversidade. Infelizmente, nas últimas décadas temos observado perdas irreparáveis de ambientes ecologicamente sensíveis, como manguezais e marismas. Isso tem afetado diretamente a vida marinha, seja pela redução do número de espécies ou pela menor abundância de outras. Em um cenário de mudança climática, menor abun-

dância significa menor variabilidade genética das populações e, conseqüentemente, menor capacidade de adaptação dessas espécies. Assim, para que as futuras gerações possam usufruir de todas as possibilidades que a biotecnologia marinha nos oferece, é imperativa a proteção dos oceanos, de sua biodiversidade e da maior parcela do nosso patrimônio biotecnológico.

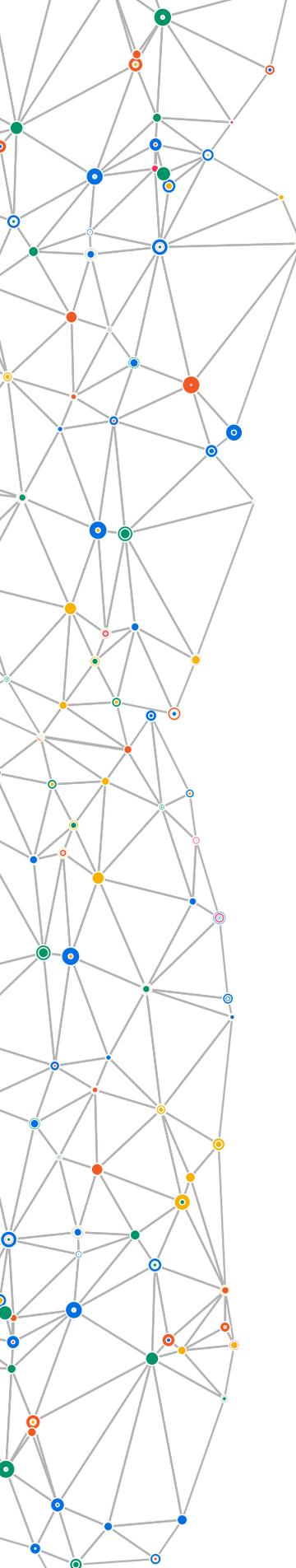
No Brasil, a biotecnologia marinha é um campo do conhecimento em pleno desenvolvimento e que tem um futuro promissor, em vista das excepcionais condições de que dispomos (Emerenciano et al., 2012; Thompson et al., 2018). Além de um extenso litoral, com aproximadamente 8,7 mil quilômetros, possuímos um mar territorial e Zona Econômica Exclusiva (ZEE) de duzentas milhas ( $\approx$  5,7 milhões de quilômetros quadrados), também denominada Amazônia Azul, e mais de 2,5 milhões de hectares de áreas estuarinas. Como a maior parte dessas áreas se encontra na porção tropical do nosso território, usufruímos de uma extraordinária diversidade biológica endêmica, ou seja, que ocorre apenas em região brasileira. Contamos também com um grande número de grupos de pesquisa qualificados que atuam nas mais diversas áreas das ciências marinhas, o que é uma grande vantagem para toda e qualquer iniciativa de pesquisa, desenvolvimento e inovação (P, D & I). Nos últimos anos, as principais linhas de pesquisa e desenvolvimento em nosso país incluem a exploração de produtos microbianos, isolamento de compostos biologicamente ativos, ômicas, desenvolvimento de compostos naturais com propriedades anti-incrustantes e a aquicultura, incluindo a investigação de patologias em invertebrados causadas por micróbios potencialmente patogênicos.

Este livro, em seus 36 capítulos, apresenta conhecimentos básicos e aplicados das áreas de atuação específica de cada um desses grupos. Ao mesmo tempo em que contém conceitos básicos de biotecnologia marinha, o livro apresenta ao leitor uma síntese dos conhecimentos sobre essa temática, sendo descritas e discutidas diferentes visões e propostas sobre a biotecnologia marinha e seus possíveis papéis na exploração dos recursos marinhos como forma de melhorar a qualidade de vida e contribuir para o desenvolvimento sustentável. Os editores e autores fazem parte de um seleto grupo de profissionais que, nos últimos anos, estudaram, pesquisaram e ensinaram a biotecnologia marinha sob os seus mais diferentes ângulos e possibilidades. Em comum, e em conjunto, eles têm a noção das muitas oportunidades que a biodiversidade dos oceanos pode oferecer à sociedade. Seus pontos de vista são importantes para o futuro da biotecnologia marinha e conservação da biodiversidade no Brasil. Embora destinado prioritariamente a estudantes de graduação e pós-graduação, a expectativa é de que o livro atinja também os demais interessados nessa temática, em especial a comunidade empresarial e demais formadores de opinião. Biotecnologia marinha pode ter grande impacto socioeconômico, gerando divisas para as diversas regiões do nosso país. Espera-se, portanto, que as noções e ideias aqui apresentadas contribuam para a melhoria da formação de recursos humanos neste domínio do conhecimento, além de auxiliar no esforço em se desenvolver, ainda mais, as iniciativas de P, D & I em biotecnologia marinha no Brasil. O sucesso dessas iniciativas é considerado fundamental tanto para atender as necessidades de uma população cada vez maior, como para a conservação dos ambientes marinhos e, conseqüentemente, para a própria sustentabilidade dos bens e serviços prestados pelos sistemas marinhos.

## REFERÊNCIAS

- Bezerra, T.R.Q.; Domingues, E.C.; Maia Filho, L.F.; Rombenso, A.N.; Hamilton, S.; Cavalli, R.O. (2016) Economic analysis of cobia (*Rachycentron canadum*) cage culture in large- and small-scale production systems in Brazil. **Aquaculture International**, 24:609-622.
- Cavalli, R.O.; Domingues, E.C.; Hamilton, S. (2011) Desenvolvimento da produção de peixes marinhos em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **Revista Brasileira de Zootecnia** (online). 40: 155-164.
- Cavalli, R.O.; Hamilton, S. (2019) Maricultura. In: CEMBRA – Centro de Excelência para o Mar Brasileiro (Org.). **O Brasil e o mar no Século XXI**. Relatório aos tomadores de decisão do país. Reved. Rio de Janeiro, RJ: CEMBRA. 149-161.
- Cavalli, R.O. (2015) Maricultura. In: Castello, J.P.; Krug, L.C. (org.). **Introdução às Ciências do Mar**. Pelotas: Ed. Textos. 408-444.
- Emerenciano, M.; Ballester, E.L.C.; Cavalli, R.O.; Wasielesky, W. (2012) Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). **Aquaculture Research** (Print). 43: 447-457.
- Thompson, F.; Krüger, R.; Thompson, C.C.; Berlinck, R.G.S.; Coutinho, R.; Landell, M.F.; Pavão, M.; Mourão, P.A.S.; Salles, A.; Negri, N.; Lopes, F.A.C.; Freire, V.; Macedo, A.J.; Maraschin, M.; Pérez, C.D.; Pereira, R.C.; Radis-Baptista, G.; Rezende, R.P.; Valenti, W.C.; Abreu, P.C., and BioTecMar Network. (2018) Marine Biotechnology in Brazil: Recent Developments and Its Potential for Innovation. **Front. Mar. Sci.** | <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00236>
- Thompson, C.C.; Kruger, R.H.; Thompson, F.L. (2017) Unlocking Marine Biotechnology in the Developing World. **Trends Biotechnol.** 35(12): 1119-1121. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.08.005. Epub 2017 Sep 7.





# CARBOIDRATOS: CONCEITOS FUNDAMENTAIS E EXEMPLOS DE FUNÇÕES BIOLÓGICAS EM ORGANISMOS MARINHOS

Paulo A. S. Mourão<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## RESUMO

Os carboidratos são as moléculas mais abundantes na natureza. Como exemplo podemos citar a parede celular dos vegetais e o exoesqueleto dos insetos, constituídos respectivamente dos carboidratos celulose e quitina. O amido e o glicogênio são exemplos de polissacarídeos de reserva energética que ocorrem em grande abundância em plantas e animais, somados à expressiva quantidade de carboidratos na natureza. Apesar da sua ampla ocorrência como um composto estrutural e energético, a estrutura e as funções biológicas dos carboidratos são menos conhecidas quando comparadas com os ácidos nucleicos, as proteínas e os lipídeos. Contudo, nas últimas décadas o desenvolvimento de novas técnicas nessa área de conhecimento vem enfrentando essa defasagem, revelando que carboidratos são responsáveis por regular complexos mecanismos biológicos. Esta revisão tem o objetivo de revelar diferentes aspectos do estudo de carboidratos, abordando desde o histórico de sua descoberta, à sua complexidade estrutural e a resultante atividade biológica. Dentro desse aspecto serão levantadas as dificuldades para os estudos da estrutura e da função dos carboidratos; mas também serão apresentados os recentes avanços metodológicos, usando como exemplo o avanço no estudo da estrutura e função biológica de carboidratos de organismos marinhos. Por fim, serão apontados os desafios a se enfrentar para acelerar o desenvolvimento das pesquisas sobre os carboidratos.

## 1 ASPECTOS HISTÓRICOS DOS CARBOIDRATOS

Em geral associamos o termo carboidrato com a palavra açúcar ou substância com sabor doce. Entretanto, essa característica não é uma propriedade que nos permita definir esse conjunto de substâncias: basta lembrarmos que o leite, um alimento rico em lactose, não é doce; e as frutas, ricas em frutose, geralmente o são. Assim, a lactose e a frutose diferem significativamente na sua doçura relativa (15 vs. 173, respectivamente). Além disso, outras substâncias com sabor adocicado possuem estruturas muito distintas dos carboidratos.

Ademais, é costume associar carboidratos com substâncias que resultam no aumento de peso. Porém, nem todos os carboidratos são utilizados no metabolismo; outras substâncias, como os lipídeos, possuem maior potencial energético que os carboidratos.

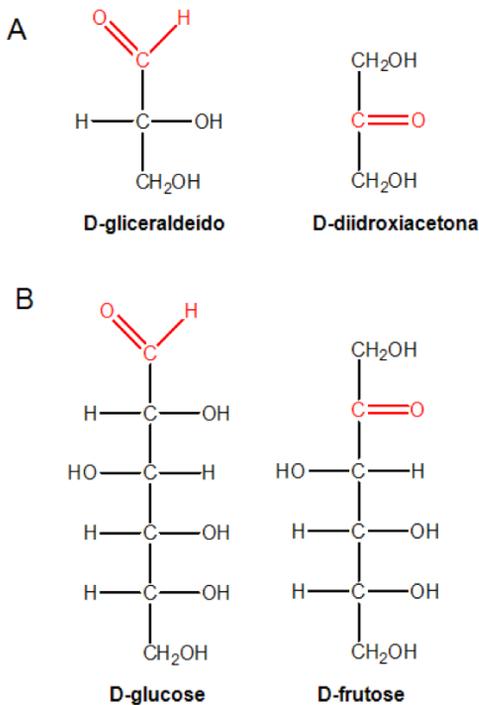
Certamente o primeiro adoçante utilizado pelo homem foi o mel. Contudo, foi Alexandre, o Grande, que levou a sacarose para a Europa, trazida do Oriente Médio. O fato da sacarose ter a propriedade de ser facilmente cristalizada lhe garante uma vantagem quanto ao processo de estocagem, comercialização e o seu uso na alimentação. Porém sua obtenção na Europa era difícil, devido à impossibilidade do cultivo da cana de açúcar. Como alternativa, a beterraba foi usada como fonte de produção de açúcar, embora esse vegetal contenha maior quantidade de glucose, mais difícil de cristalizar.

Se o sabor não é uma propriedade característica de carboidratos, como então podemos definir essas moléculas"?

## 2 ESTRUTURA QUÍMICA DE CARBOIDRATOS

Os carboidratos são caracterizados como moléculas que contêm um grupamento aldeídico ou cetônico e múltiplas hidroxilas – número mínimo de dois grupamentos. Portanto, os dois carboidratos mais simples possíveis são: o gliceraldeído e a di-hidroxiketona (Figura 1A). A partir dessas duas moléculas deriva-se uma ampla série de outras contendo entre três a seis hidroxilas. A Figura 1B mostra os dois derivados mais conhecidos do gliceraldeído e di-hidroxiketona: glucose e frutose, respectivamente.

A glucose é o carboidrato mais conhecido. Foi cristalizada por Maggrat (1747) e a sua fórmula empírica  $\text{CH}_2\text{O}$  deu origem ao termo hidratos de carbono, depois modificado para carboidratos. Seu peso molecular de 180 Da foi determinado por Tollens e Mayer (1888), permitindo estabelecer sua fórmula verdadeira como  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ . Franchimont (1879) mostrou que possuem cinco grupos hidroxilas, e Kiliani (1886), que possuem um grupamento aldeídico e seis átomos de carbono em arranjo linear. Essas observações permitiram estabelecer a estrutura da glucose como a conhecemos atualmente (Figura 1B).



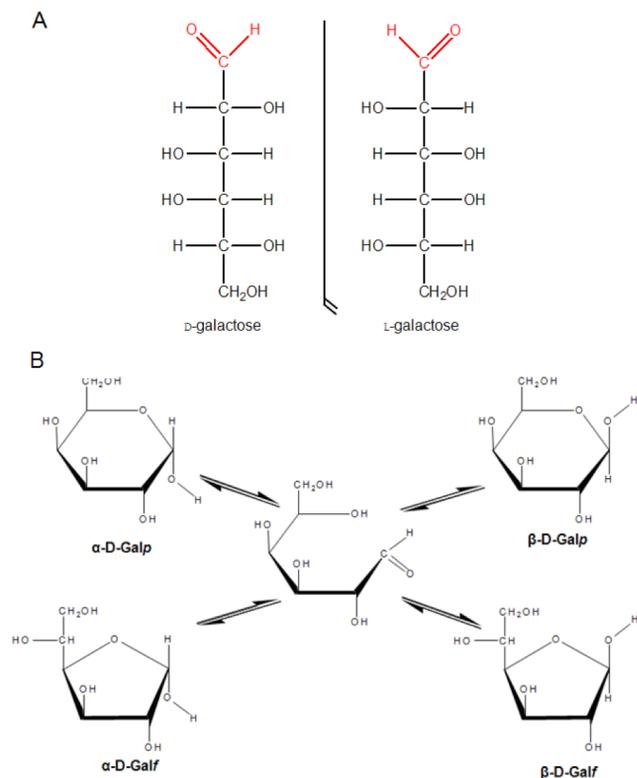
**Figura 1.** Estrutura do D-gliceraldeído e da D-hidroxiacetona (Painel A), os dois carboidratos com as estruturas mais simples. Destes dois compostos derivam os outros carboidratos com maior número de hidroxilas, exemplificado para a D-glucose e D-frutose no Painel B.

Todavia, essa estrutura básica e simples apresenta outros aspectos mais complexos em comparação com as estruturas das outras moléculas biológicas. Muitos autores de livros-textos de bioquímica costumam omitir referências à estrutura dos carboidratos, temerosos de que a aparente complexidade desestimule a leitura. Com finalidade didática abordaremos alguns conceitos de maneira clara e objetiva.

Fundamentalmente, três aspectos são importantes para a compreensão da estrutura dos carboidratos e serão apresentados usando como exemplo a galactose: os estereoisômeros D e L; a formação dos anéis de piranose e de furanose; e os isômeros  $\alpha$  e  $\beta$ .

Desse modo, quanto à estrutura do gliceraldeído (Figura 1A), notamos a presença de um carbono assimétrico. Naturalmente disso resulta a ocorrência dos estereoisômeros D e L, inclusive nas séries de carboidratos deles derivados. Exemplificamos, na Figura 2A, esse aspecto para a galactose. A maioria dos carboidratos encontrados na natureza pertencem à série D, mas também encontramos o isômero L. Essa é outra diferença em relação aos aminoácidos que ocorrem nas proteínas exclusivamente como o isômero L.

Outro aspecto peculiar da estrutura dos carboidratos é que eles formam anéis cíclicos devido a uma reação de condensação intramolecular. Dois tipos de anéis podem ser formados: um contendo quatro e outro cinco átomos de carbono, denominados respectivamente como furanose e piranose, por analogia com o furano e o pirano. A Figura 2B ilustra essas estruturas para a galactose. Mas ao formar os anéis cíclicos a molécula apresenta um novo tipo de isomeria, representada pelas hidroxilas acima e abaixo do plano. O  $\alpha$ -isômero é aquele no qual o próton



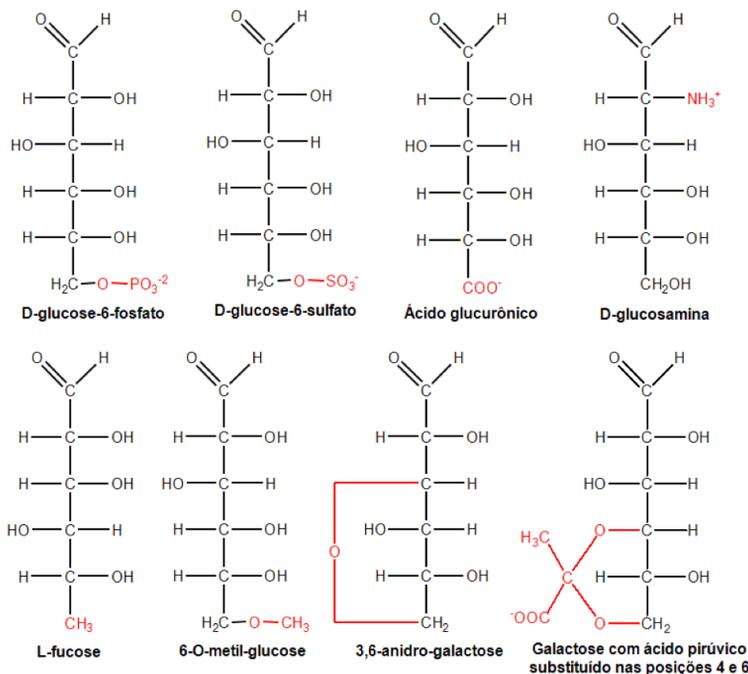
**Figura 2.** Estrutura dos dois estereoisômeros da galactose (Painel A) e as formas  $\alpha/\beta$ , furanose e piranose do isômero D em solução, em equilíbrio através do intermediário acíclico (Painel B).

anomérico e a hidroxila da posição 6 estão em planos opostos do anel. Ao contrário, no  $\beta$ -isômero o próton anomérico e a hidroxila da posição 6 compartilham o mesmo plano do anel.

Naturalmente os estereoisômeros D e L não são interconversíveis. Já as formas  $\alpha/\beta$  e furanose/piranose dos açúcares livres se interconvertem, conforme mostrado no esquema da Figura 2B, formando os anéis de piranose ou de furanose, cada um deles nas formas anoméricas  $\alpha$  ou  $\beta$ . Essas formas estão em equilíbrio pela mediação do intermediário acíclico.

Outro aspecto importante são os grupamentos substituídos na estrutura dos carboidratos. Destacamos a ocorrência de grupamentos sulfato, fosfato, amino e éster metil, como mostra a Figura 3. Também pode ocorrer a presença de grupamentos carboxílicos, como no caso dos ácidos hexurônicos. Outros carboidratos comuns na natureza são os deoxi-açúcares, como a fucose, contendo um grupamento metil em substituição ao  $\text{CH}_2\text{OH}$ , na posição 6. Os carboidratos também podem conter estruturas cíclicas, como o 3,6-anidro galactose ou conter anéis de ácido pirúvico, com substituições nas posições 4 e 6 (ou 3 e 4) do açúcar, como mostrado na Figura 3. Naturalmente a ocorrência desses grupamentos nas estruturas dos carboidratos irá impactar nas suas propriedades físico-químicas e nos seus efeitos biológicos, por meio da interação com outras moléculas.

Os carboidratos encontrados nos organismos marinhos são singulares por particularmente apresentarem expressiva ocorrência desses diferentes grupamentos, como veremos posteriormente.



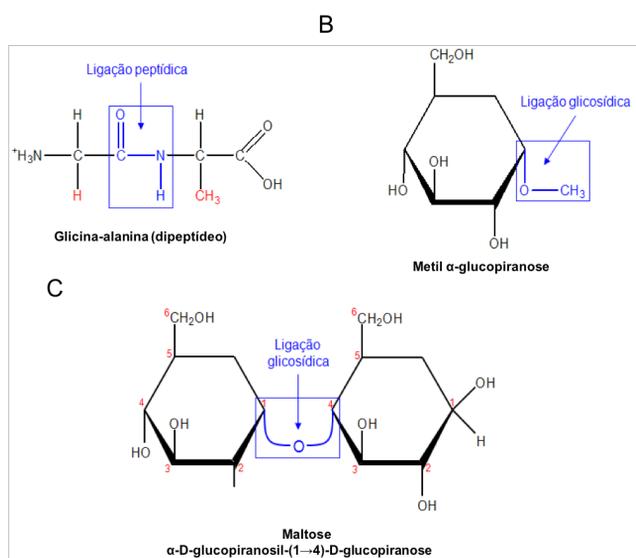
**Figura 3.** Exemplos de diferentes grupamentos que podem estar substituídos em carboidratos, como fosfato, sulfato e éter O-metil ou carboidratos contendo grupamento amino ou carboxílico ou ainda deoxi-açúcares, com a substituição de um grupamento  $\text{CH}_2\text{OH}$  por  $\text{CH}_3$ .

### 3 | A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA DE CARBOIDRATOS COMPLEXOS

Descrevemos algumas das principais características estruturais e físico-químicas das unidades monossacarídicas de carboidratos encontrados nos organismos vivos. Mas a próxima questão é a de como essas unidades se unem para constituir estruturas mais complexas. Podemos traçar uma analogia com a formação das proteínas a partir dos aminoácidos. Eles se unem por meio da ligação peptídica entre um  $\alpha$ -amino-grupo e uma  $\alpha$ -carboxila da outra unidade (Figura 4A). No caso dos carboidratos, estes se unem através da ligação glicosídica formada entre o grupamento aldeídico ou cetônico e a hidroxila de um álcool. A Figura 4B mostra a formação da ligação glicosídica entre a glucose e o álcool metílico.

Os carboidratos possuem múltiplos grupamentos hidroxilas, o que lhes facultava formar uma grande variedade de ligação entre o grupamento anomérico e as hidroxilas das diferentes posições. A Figura 4C mostra a formação da ligação glicosídica entre duas gluceses, pela ligação com a hidroxila da posição 4. Mas essa mesma ligação poderia ocorrer com as hidroxilas das posições 2, 3, 5 e 6. Em decorrência, podemos formar uma grande variedade de derivados a partir de somente dois açúcares, enquanto que com dois aminoácidos, apenas um tipo de dipeptídeo.

Em síntese, podemos formar 11 tipos de dissacarídeos a partir de duas gluceses, considerando apenas estruturas com isômero D e na forma de piranose. Com três gluceses podemos formar 176 tipos de isômeros. Basta usar um cálculo combinatório para compreendermos essas



**Figura 4.** Comparação entre a ligação peptídica e glicosídica. A ligação peptídica é formada entre um  $\alpha$ -amino grupo de um aminoácido e  $\alpha$ -carboxila de outro (Painel A). A ligação glicosídica é entre o grupo aldeído ou cetônico e a hidroxila de um álcool. O Painel B ilustra a formação da ligação glicosídica entre a D-glucose e a hidroxila do metanol, o álcool mais simples. Os carboidratos estão repletos de grupamentos hidroxilas e a ligação glicosídica pode ser formada com qualquer um deles, resultando numa ampla variedade estrutural em comparação com os peptídeos. O Painel C ilustra a ligação glicosídica formada entre uma D-glucose e a hidroxila da posição 4 de outra D-glucose.

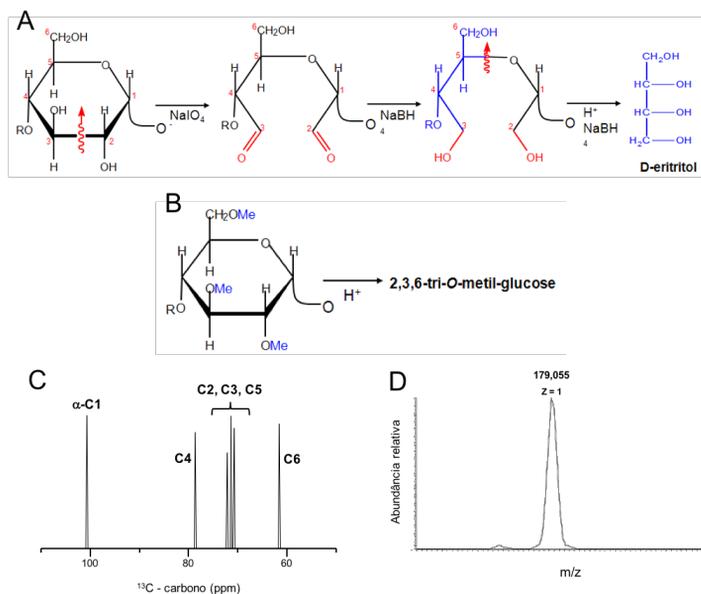
possibilidades. Assim, com um mesmo tipo de aminoácido podemos formar apenas um dipeptídeo ou um tripeptídeo.

Tamãha variedade de combinações estruturais cria um dos problemas mais complexos para a determinação da estrutura de carboidratos, ou seja, a questão desafiadora de qual é afinal a posição da ligação glicosídica. Esse tipo de questão pode ser resolvido por três tipos de metodologias: oxidação com periodato; reação de metilação; e ressonância magnética nuclear (RMN), como apresentado esquematicamente na Figura 5 para uma unidade de  $\alpha$ -glucose unida por ligações 1  $\rightarrow$  4.

O ácido periódico quebra ligações C-C com hidroxilas vicinais. O único sítio de quebra na estrutura da Figura 5 é a ligação C-C entre as posições 2 e 3. O produto formado contém quatro átomos de carbono e é denominado eritritol (Figura 5A). Se a ligação fosse na posição 3 não ocorreria oxidação pelo periodato; nas posições 2 e 3 geraria glicerol. Historicamente esse foi o primeiro tipo de metodologia empregada para identificar a posição das ligações glicosídicas, mas atualmente está em desuso em face de outros métodos mais efetivos.

Outro método envolve a reação de metilação, quando grupamentos metil são introduzidos em todas as hidroxilas livres da molécula. Naturalmente o produto formado para uma glucose unida por ligações  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) é o derivado 2,3,6-tri-O-metil (Figura 5B). A posição envolvida na ligação glicosídica não será metilada.

Por fim, o método mais empregado atualmente envolve o uso de RMN. Essa metodologia permite assinalar todos os carbonos ( $^{13}\text{C}$ ) ou prótons ( $^1\text{H}$ ) encontrados no carboidrato. O car-



**Figura 5.** Metodologias que podem ser empregadas para determinar a posição da ligação glicosídica num glicoconjugado. O Painel A ilustra a estrutura de uma unidade de glucose na estrutura de um glicoconjugado, unida por ligação  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4). A posição da ligação pode ser determinada usando oxidação com ácido periódico ( $\text{IO}_4^-$ ), seguida da redução com boridreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) e hidrólise ácida, seguida de nova redução. O produto formado será eritritol se a substituição for na posição 4. Outra opção metodológica é a reação de metilação, com a substituição das hidroxilas livres por grupamento metil. A posterior hidrólise ácida da amostra resulta na formação de 2,3,6-tri-O-metil-glucose (Painel B). Outra metodologia é o uso da espectrometria de ressonância nuclear magnética (RMN), ilustrada no Painel C. O  $^{13}\text{C}$ -carbono do sítio de substituição (C4) é deslocado para campo baixo (para a esquerda) do espectro em comparação com os demais carbonos do anel. O carbono anomérico (C1) e o C6 estão deslocados em campos opostos. Espectrometria de massa (eletrospray) também vem sendo utilizada para a caracterização de carboidratos, especialmente com massa molecular reduzida. O Painel D mostra esse tipo de espectro obtido com a glucose.

bono envolvido na ligação glicosídica está caracteristicamente deslocado para campo baixo (para a esquerda) em comparação com os demais componentes do anel (Figura 5C). Outro aspecto claramente indicado pelo espectro de RMN é a configuração da ligação glicosídica. Os  $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -anoméricos estão mais deslocados para campo baixo em comparação com os carbonos  $\beta$ -anoméricos. Essa é a metodologia mais apropriada para estabelecer a configuração da ligação glicosídica ( $\alpha$  ou  $\beta$ ).

Uma outra variedade de métodos está disponível para a determinação da estrutura dos carboidratos. Em particular destacamos a espectrometria de massa (*eletrospray*), muito útil para estabelecermos a estrutura de carboidratos com massa molecular mais reduzida (Figura 5D). Atualmente, podemos estabelecer um conjunto de estruturas num curto período de tempo. Esse avanço vislumbra a era dos glicomas, facilitando a determinação da estrutura do conjunto de carboidratos encontrados numa determinada estrutura ou organismo.

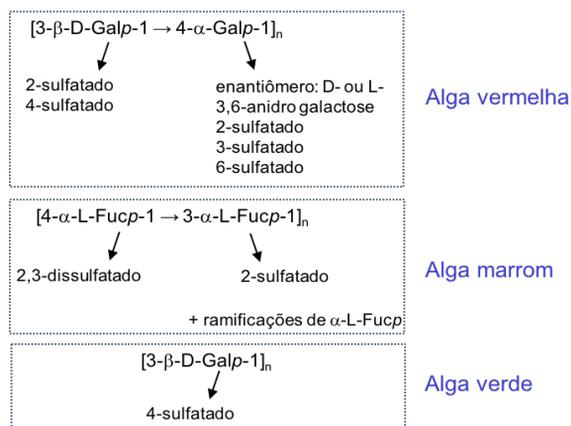
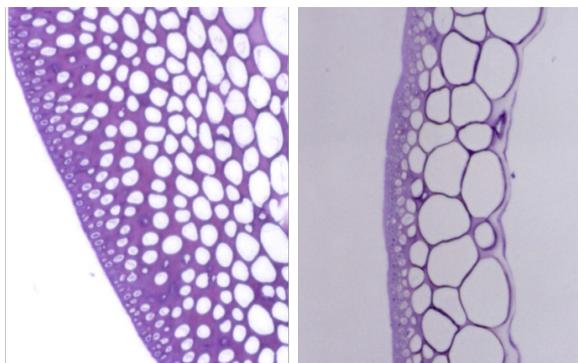
# 4 CARBOIDRATOS EM ORGANISMOS MARINHOS

Os carboidratos são encontrados em grande quantidade e com muita variedade estrutural nos organismos marinhos. Dos vegetais marinhos, as algas são os que possuem concentrações mais elevadas de carboidratos. Muitas estimativas sugerem que os polissacarídeos de algas marinhas são as moléculas biológicas mais abundantes na natureza.

É muito difícil uma descrição completa da variedade das moléculas de carboidratos encontradas nesses organismos. Com o objetivo de fornecer uma descrição didática, que estimule a curiosidade do leitor no aprofundamento no tema, escolhemos três tipos de situações biológicas em organismos marinhos: componentes da parede celular de algas marinhas; regulação da fertilização em ouriços-do-mar; e moléculas que asseguram a espécie-especificidade na interação entre células de esponjas-do-mar.

## 4.1 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS COM FUNÇÃO ESTRUTURAL

Polissacarídeos sulfatados são encontrados em altas concentrações nas algas marinhas como componentes da parede celular de algas vermelhas, marrons e verdes. A Figura 6A



**Figura 6.** Polissacarídeos sulfatados encontrados na parede celular das algas marinhas. Painei A: detecção de polissacarídeos sulfatados na parede celular da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* usando o corante azul de toluidina. Os polissacarídeos são observados com a típica coloração roxa com o uso desse corante. O Painei B mostra as estruturas das galactanas sulfatadas (carragenanas) encontradas nas algas vermelhas, das fucanas sulfatadas (fucoidam) nas algas marrons e das galactanas sulfatadas nas algas verdes. Ver Pomin VH e Mourão PAS (Glycobiology 18:1012-1027,2008).

mostra um exemplo da distribuição desses polissacarídeos na parede celular de uma espécie de alga vermelha estudada em nosso laboratório (*Botryocladia occidentalis*). A parede celular da alga foi corada com azul de toluidina e apresentou a coloração roxa, devido ao fenômeno chamado metacromasia, que ocorre quando o corante entra em contato com polissacarídeos sulfatados. Podemos observar a alta concentração e a extensa distribuição dos polissacarídeos sulfatados na parede da alga. Isso permite que suas células se organizem, se mantenham integradas e protegidas.

As algas vermelhas possuem polissacarídeos sulfatados formados por unidades alternadas de galactose unidas por ligações  $\alpha$  e  $\beta$ . Embora essa seja a estrutura básica, extensas modificações ocorrem nesses dois componentes dependendo da espécie de alga vermelha (Figura 6). As unidades de  $\beta$ -galactose podem estar sulfatadas nas posições 2 ou 4. Por sua vez, as unidades de  $\alpha$ -galactose podem estar sulfatadas nas posições 2, 3 ou 6. Podem ocorrer também na forma dos estereoisômeros D ou L (ver essas estruturas na Figura 2A). Podem ainda formar um anel cíclico denominado 3,6-anidro-galactose (ver Figura 3).

Quimicamente esses polissacarídeos encontrados nas algas vermelhas deveriam ser denominados como galactanas sulfatadas. Entretanto são chamados de carragenanas. A origem dessa denominação é histórica. Decorreu do fato de terem sido primeiramente isoladas da alga *Chondrus crispus*, coletada numa pequena vila nas costas da Irlanda chamada Carragheen.

O fato é que cada espécie de alga vermelha possui uma carragenana com composição particular. Esses diferentes componentes estruturais modificam significativamente as propriedades físico-químicas das carragenanas, tais como: viscosidade, solubilidade em água, capacidade para formar géis, etc. Esses polissacarídeos são amplamente utilizados na indústria de alimentos como gelificante. As algas que contêm os polissacarídeos mais adequados para esse fim comercial são as escolhidas para cultivo. Ainda não conhecemos o significado biológico dessas alterações estruturais, tampouco o seu sentido evolutivo para as algas vermelhas.

As algas marrons possuem na sua parede celular polissacarídeos constituídos principalmente por L-fucose sulfatada. Foram inicialmente descritos por Killing, em 1913, e denominados como fucoidam. Esses compostos possuem uma estrutura muito heterogênea e poucas foram integralmente decifradas. Em geral possuem unidades alternadas de  $\alpha$ -fucose, unidas por ligações  $1 \rightarrow 4$  e  $1 \rightarrow 3$ , com sulfatações nas posições 2 e/ou 3. Muitas espécies possuem estruturas com fucoses não sulfatadas em ramificações da molécula (Figura 6)

As algas verdes possuem polissacarídeos sulfatados com estruturas mais variáveis na sua parede celular. Esse grupo é ainda muito pouco estudado. Em geral possuem galactanas sulfatadas formadas por unidades de  $\beta$ -galactose 4 sulfatadas e unidas por ligações  $1 \rightarrow 3$  (Figura 6).

#### **4.2 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS NA FERTILIZAÇÃO**

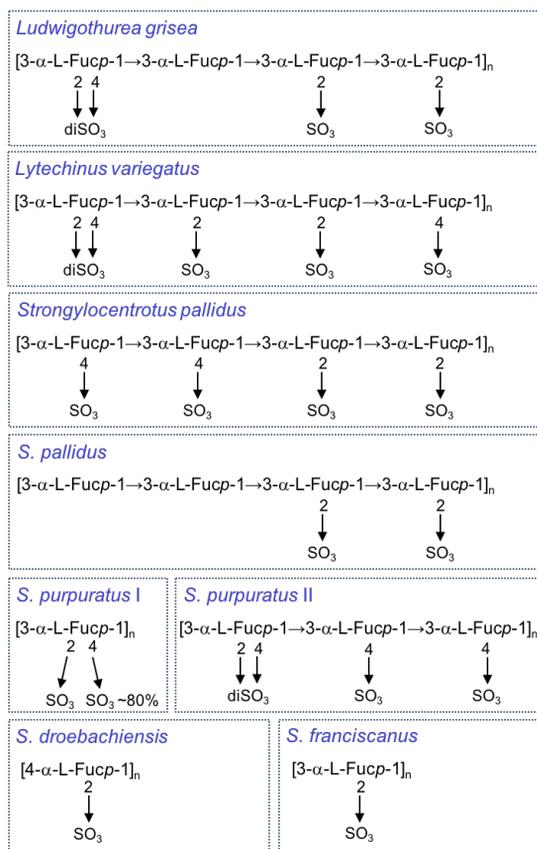
Outro grupo de organismos marinhos que possui fucanas sulfatadas são os ouriços-do-mar. Mas nesse caso os polissacarídeos sulfatados são encontrados no gel que envolve os óvulos. As fucanas sulfatadas dos equinodermas possuem estruturas muito regulares, definidas exclusivamente pelo padrão de sulfatação das unidades. Ainda mais singular, cada espécie de

ouriço-do-mar possui uma fucana sulfatada com estrutura particular, como mostra a Figura 7. Essas observações foram estabelecidas pelo trabalho do nosso laboratório realizado no período de 1998-2002.

Essas fucanas sulfatadas são constituídas por unidades repetitivas formadas por um, dois, três ou quatro açúcares. A posição da ligação glicosídica é sempre a mesma para cada espécie, mas o padrão de sulfatação varia (Figura 7). Algumas espécies possuem polissacarídeos formados por unidade de D- ou L-galactose, com ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  ou  $\beta$ .

A localização particular dessas fucanas sulfatadas e as estruturas regulares repetitivas, associadas à observação da variação espécie-específica, sugeriram função biológica mais refinada. Realmente os estudos do nosso laboratório mostraram que essas fucanas sulfatadas são indutoras espécie-específicas da reação acrossômica em ouriços-do-mar. A reação acrossômica é um evento essencial para a fertilização. Nos ouriços-do-mar envolve a excitose da vesícula acrossomal e a polimerização da actina, formando o denominado processo acrossomal, projetando-se na cabeça do espermatozoide, com aproximadamente 1  $\mu$ m de comprimento. A Figura 8A mostra o processo acrossomal formado após a incubação do espermatozoide do ouriço-do-mar com a fucana sulfatada isolada do gel que envolve o óvulo da mesma espécie.

Essas observações mostram um dos raros casos relatados na literatura de um car-



**Figura 7.** Estruturas das fucanas sulfatadas encontradas no gel que envolve os óvulos dos ouriços-do-mar. Esses polissacarídeos são constituídos por unidades regulares definidas exclusivamente pelo padrão de sulfatação. Cada espécie de ouriço-do-mar possui fucana sulfatada com uma estrutura particular. Ver Vilela-Silva e col. (J. Biol. Chem. 277:379-387,2002).

boidrato puro induzindo a transdução de sinal em célula animal num evento diretamente relacionado com a diferenciação das espécies em equinodermas. Dois tipos de eventos regulam a espécie-especificidade na fertilização dos ouriços-do-mar. Um deles é baseado na especificidade do reconhecimento da bindina; o outro depende da indução da reação acrosômica pelos polissacarídeos sulfatados (Figura 8B). Esses dois mecanismos conjugados são responsáveis pela diferenciação das espécies de ouriços-do-mar, ora atuando em conjunto, ora cada um deles em particular, assegurando a especiação em outros casos (Figura 8C).

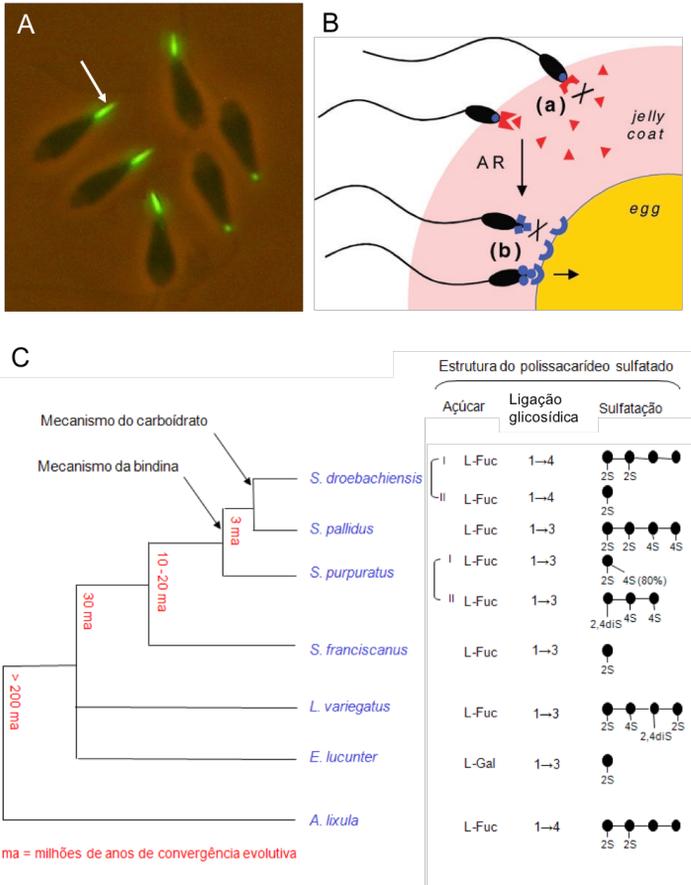
Certamente o maior desafio no estudo dessas fucanas sulfatadas dos ouriços-do-mar é o de identificar as enzimas responsáveis pela biossíntese dessas estruturas particulares, assim como os genes que regulam sua expressão. Essa é uma questão muito atraente sob o ponto de vista dos carboidratos, mas também pode identificar em nível molecular os mecanismos de diferenciação de espécies entre os equinodermas, abrindo perspectivas para expansão para outros grupos de animais.

### **4.3 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS NA EVOLUÇÃO DE ORGANISMOS MULTICELULARES**

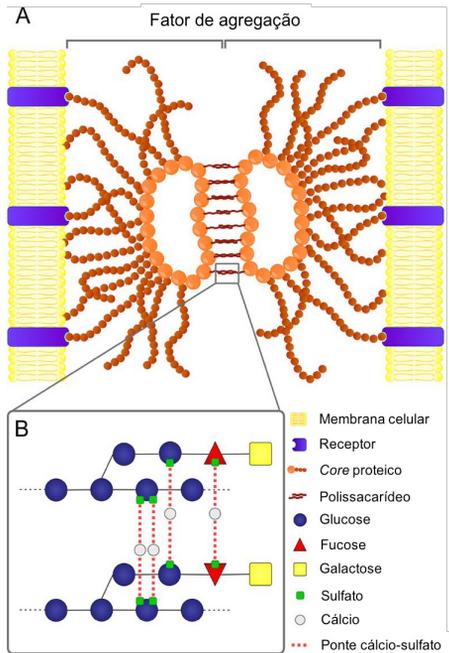
As esponjas marinhas foram os primeiros organismos utilizados como modelo para o estudo da agregação celular. Os estudos pioneiros foram realizados por Wilson em 1907. Os seus experimentos mostraram que podia remover as células do corpo do animal adulto e as células dissociadas eram capazes de gerar um novo animal adulto. Em seguida Wilson pretendeu agregar células de espécies distintas de esponjas visando gerar um organismo com as características das duas espécies. Infelizmente, para sua decepção inicial, observou que as células de esponja agregavam apenas de forma espécie-específica. Esses resultados tornaram-se clássicos e são descritos atualmente na maioria dos livros de biologia.

A próxima etapa foi a da caracterização da molécula encontrada nas esponjas responsável pela agregação espécie-específica. Os estudos realizados na década de 80 levaram à caracterização de uma molécula denominada como “fator de agregação”, por ser responsável por esse evento. Também ficou caracterizado que polissacarídeos encontrados nesse fator eram os componentes responsáveis pela agregação, um evento mediado por cálcio.

A elevada complexidade dos polissacarídeos encontrados no fator de agregação limitou a determinação da sua estrutura. Só recentemente conseguimos estabelecer a estrutura do carboidrato do fator de agregação da espécie *Desmapsamma anchorata* usando RMN. O polissacarídeo possui uma cadeia central de unidade de glucose, unida por ligações 1 → 3, algumas sulfatadas nas posições 2 e 4. Esse polissacarídeo também possui ramificações com unidades de fucose 2-sulfatada e de galactose contendo anéis de piruvato (ver essa estrutura na Figura 3). A Figura 9 mostra essa estrutura e a representação esquemática da interação da molécula mediada por cálcio. Esse é outro exemplo impactante da importância dos carboidratos para um evento biológico fundamental na geração dos animais multicelulares.



**Figura 8.** Importância das fucanas sulfatadas, encontradas no gel que envolve os óvulos dos ouriços-do-mar, na indução espécie-específica da reação acrossômica nos espermatozoides. O Painel A mostra espermatozoides da espécie *Strongylocentrotus purpuratus* que sofreram reação acrossômica (indicada pela seta) após a incubação com a fucana sulfatada homóloga, revelados pelo anticorpo anti-actina. Painel B: representação esquemática dos dois passos hierárquicos de reconhecimento de gametas nos ouriços-do-mar. (a) Mecanismo baseado nos polissacarídeos sulfatados: a reação acrossômica é induzida quando um receptor correto do espermatozoide reconhece o polissacarídeo sulfatado do gel que envolve o óvulo (triângulos). Essa reação expõe a proteína bindina (quadrados e círculos). (b) Mecanismo baseado na bindina. A proteína bindina é exposta pela reação acrossômica e reconhece um receptor encontrado na membrana do óvulo da própria espécie. Ver Biermann e col. (Evolution and Development, 6:353-361,2004). Painel C: Relações filogenéticas e tempos de divergência de espécies de ouriços-do-mar e um resumo da estrutura dos polissacarídeos encontrados no gel que envolve seus óvulos. O mecanismo mediado por polissacarídeos sulfatados para o reconhecimento dos gametas desempenhou um papel importante na separação entre *S. droebachiensis* e *S. pallidus*. O mecanismo mediado pela bindina desempenhou um papel importante na separação entre o ancestral comum dessas duas espécies e *S. purpuratus*. Myr = milhões de anos de divergência evolutiva. Dados de Biermann e col. (Evolution and Development, 6:353-361,2004).



**Figura 9.** Modelo representativo do mecanismo molecular de adesão entre as células de esponja, mediado por polissacarídeos sulfatados. O Painel A mostra dois fatores de agregação ligados a duas células adjacentes de esponja marinha. O Painel B mostra a interação entre os polissacarídeos sulfatados, componentes do fator de agregação. Essa interação entre os ésteres sulfato do polissacarídeo é mediada por cálcio. Dados de Vilanova e col. (J. Biol. Chem. 291:9425-9437,2016).

## 5 | CONCLUSÃO

Os carboidratos são moléculas essenciais aos seres vivos, exercendo uma grande variedade de funções biológicas. Os carboidratos exerceram um papel central durante os mais de três bilhões de anos de evolução da vida sobre a terra, regulando diversos eventos biológicos cruciais e exercendo funções estruturais, de reserva energética e no aumento de complexidade de organismos multicelulares, entre outras. Devido à sua alta complexidade estrutural considera-se que o estudo de carboidratos no passado ficou aquém das descobertas feitas com proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Porém, recentes avanços de técnicas analíticas vêm demonstrando crescentemente uma série de funções biológicas para carboidratos, que são reguladas especificamente por elementos estruturais destas moléculas. O próximo desafio para o estudo da função dos carboidratos deverá focar nos ainda muitas vezes desconhecidos processos de biossíntese e sua regulação em diferentes eventos biológicos, utilizando uma estratégia metodológica ampla. A partir de agora será necessária uma abordagem multidisciplinar para o estudo da função detalhada dos carboidratos em diferentes organismos, combinando metodologias de biológica molecular, enzimologia, metabolismo, entre outras. Neste capítulo mostramos alguns conceitos básicos sobre os carboidratos, ressaltando sua importância biológica com exemplos de organismos marinhos. Esperamos que o texto tenha desempenhado um estímulo para despertar maior interesse para os estudos de carboidratos, assim ajudando a enfrentar os futuros desafios dessa promissora linha de pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

Os trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Tecido Conjuntivo da UFRJ receberam apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Agradecemos a contribuição de Rafael S. Aquino, Paulo A. G. Soares e Eduardo Vilanova na revisão do texto.

## **REFERÊNCIAS**

Publicações que podem ser consultadas para um aprofundamento do tema:

Bierman et al. (2004) **Evolution and Development** 6: 353-361.

Mourão et al. (2018) **Current Opinion in Structural Biology** 50: 33-41.

Pomin e Mourão (2008) **Glycobiology** 18: 1012-1027.

Vilanova et al. (2016) **Journal of Biological Chemistry** 291: 9425-9437.

Vilela-Silva et al. (2002) **Journal of Biological Chemistry** 277: 379-387.





# ÁCIDOS GRAXOS E PIGMENTOS

Paulo Sergio Salomon<sup>a</sup>  
Giovana de Oliveira Fistarol<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

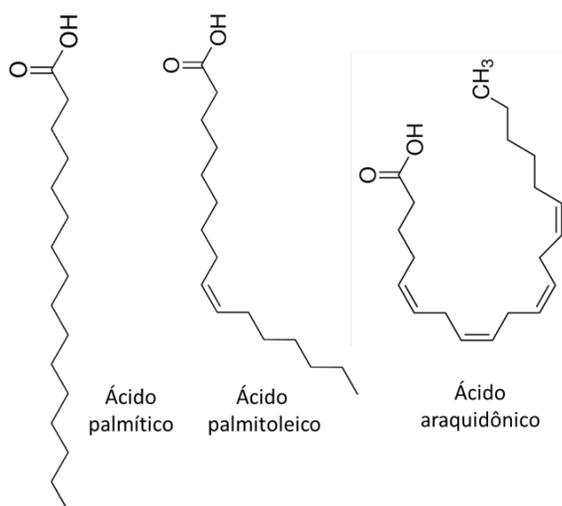
## RESUMO

Ácidos graxos desempenham funções vitais em animais, que não necessariamente possuem a capacidade de síntese de muitos desses compostos, sendo necessária a aquisição por meio de dieta alimentar. Na última década, tem aumentado muito o interesse em óleos de origem marinha como fonte de ácidos graxos poliênicos essenciais da família ômega-3. O suprimento de ácido eicosapentanoico (EPA) e ácido docosaexanoico (DHA) de origem marinha tem profundas implicações para a saúde da população mundial, pois estes são precursores para a síntese de importantes eicosanóides e docosanoídeos. EPA e DHA são fundamentais para o desenvolvimento do sistema neurológico em fetos e nos primeiros meses de vida da criança. São diversas as fontes marinhas desses compostos que podem suprir demandas de um mercado crescente. Esponjas marinhas apresentam uma das maiores diversidades conhecidas de ácidos graxos em animais, representando uma fonte ainda inexplorada de compostos com alto poder bioativo no mar. Ácidos graxos são moléculas altamente energéticas, podendo ser transformados em biodiesel. Biodiesel produzido a partir de lipídeos de origem marinha, ricos em triglicerídeos, possui as melhores características desejadas pela indústria na substituição do diesel de petróleo. Pigmentos naturais encontrados no mar incluem clorofilas, ficobiliproteínas e carotenóides, produzidos por diversos organismos fotossintetizantes. Além da função natural de captar energia luminosa, de proteger contra fotooxidação e de conferir cor aos organismos, uma característica comum desses pigmentos é seu alto poder antioxidante, motivo pelo qual encontram inúmeras aplicações como nutracêuticos no combate e prevenção de doenças como câncer. Carotenóides como o betacaroteno são precursores de vitamina A, essencial para o processo de visão em animais. Outros, como a fucoxantina, abundante em algas pardas e diatomáceas marinhas, têm se mostrado eficientes no combate à obesidade e outros males. Diversos pigmentos naturais e alguns derivados são usados como corantes na formulação de alimentos e bebidas ou como pigmentantes para melhorar o aspecto de produtos de origem animal. Neste capítulo são apresentadas as principais características e aplicações biotecnológicas de ácidos graxos, clorofilas, ficobiliproteínas e carotenóides e as potenciais fontes marinhas desses compostos.

# 1 | ÁCIDOS GRAXOS

## 1.1 ESTRUTURA, DIVERSIDADE E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

Ácidos graxos (AGs) são ácidos monocarboxílicos de cadeia normal que apresentam o grupo carboxila ( $-\text{COOH}$ ) ligado a uma cadeia alquílica. A síntese de ácidos graxos, seja por animais ou plantas, se dá pela combinação de acetilcoenzima A. Por isso, a estrutura dessas moléculas contém, na grande maioria dos casos, números pares de átomos de carbono, entre 4 e 28. AGs com número ímpar de átomos de carbono são raros (Nelson e Cox 2012). Os AGs são classificados como saturados, quando apresentam apenas ligações simples entre os átomos de carbono; monoinsaturados, quando apresentam uma única ligação dupla entre átomos de C, ou poli-insaturados, quando contêm duas ou mais ligações duplas entre os átomos de carbono da cadeia alquílica. Nos AGs insaturados, os dois átomos de C adjacentes à ligação dupla podem se apresentar nas configurações isoméricas *cis* ou *trans* (Figura 1). AGs naturais são encontrados majoritariamente na configuração *cis*. A configuração *trans* é normalmente produto de transformação (transesterificação) pela ação humana. O comprimento e geometria da cadeia alquílica, o número de insaturações (ligações  $\text{C}=\text{C}$ ) e a isomeria (*cis* ou *trans*) determinam as principais propriedades químicas dos ácidos graxos e suas funções em processos biológicos e na constituição de estruturas celulares (Nelson e Cox 2012). O nome do ácido graxo é determinado pelo número de átomos de carbono, o número e posição das insaturações e a isomeria (veja exemplos na Figura 1 e Tabela 1). Os AGs podem se associar a outras moléculas, como glicerol, açúcares e grupamentos fosfato, formando uma grande variedade de lipídeos saponificáveis presentes em micro-organismos, animais e plantas, nos quais desempenham funções metabólicas, estruturais, protetoras e de reserva energética (Tabela 2).



**Figura 1.** Estrutura química de alguns AGs comuns na natureza. Neste exemplo são mostrados AGs de cadeia insaturada, somente com ligações simples entre os átomos de C (ácido palmítico,  $\text{C}_{16:0}$ ); monoinsaturada, com uma ligação dupla na posição *cis* (ácido palmítoleico,  $9\text{c-}16:1$ ); e poli-insaturada, com mais de uma ligação dupla entre os átomos de C da cadeia alquílica, neste caso 4 ligações duplas na posição *cis* (ácido araquidônico,  $20:4\text{n-}6$ ).

**Tabela 1.** Alguns exemplos de AGs comuns em alimentos e de grande importância na dieta alimentar.

	<b>NOME COMUM</b>	<b>NOMENCLATURA QUÍMICA E ABRE-VIAÇÃO</b>	<b>FONTE COMUM</b>
Saturados	Ácido butírico	Ácido butanoico, C4:0	Derivados de leite, especialmente manteiga
	Ácido caprílico	Ácido octanoico, C8:0	Gorduras vegetais como gordura de coco e óleo de palma
	Ácido láurico	Ácido dodecanoico, C12:0	Leite de coco, óleo de semente de palma
	Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico, C16:0	Óleo de palma, derivados de leite, carne bovina
Monoinsaturados	Ácido palmíticooleico (ômega 7)	Ácido cis-9-hexadecênico, 9c-16:1z	Óleos de origem marinha, óleo de macadâmia, maioria dos óleos vegetais e animais
	Ácido oleico	Ácido cis-9-octadecênico, 9c-18:1	Todas as gorduras e óleos, especialmente azeite de oliva, canola e girassol
	Ácido gadoleico	Ácido cis-9-eicosenoico, 9c-20:1 Ácido cis-11-eicosenoico, 11c-20:1	Óleos de origem marinha
	Ácido nervônico	Ácido cis-15-tetracosenoico	
Poli-insaturados	Ácido linoleico (ômega-6)	Ácido cis-9,cis-12-octadecadienoico, 18:2n-6	Maioria dos óleos vegetais
	Ácido araquidônico - AA (ômega-6)	Ácido cis-5,cis-8,cis-11, cis14-eicosatetraenoico, 20:4n-6	Gorduras animais, fígado, ovos, peixes
	Ácido eicosapentaenoico EPA (ômega-3)	Ácido cis-5, cis-8,cis-11,cis-14,cis-17- eicosapentaenoico	Peixe, especialmente os oleosos como salmão, arenque, anchova e cavala
	Ácido docosaexanoico DHA (ômega-3)	Ácido cis-4,cis-7,cis-10,cis-13,cis-16,cis-19- docosaexaenoico, 22:6n-3	

**Tabela 2.** Tipos de lipídeos que contêm AGs na composição, sua importância biológica e exemplos.

<b>LIPÍDEO</b>	<b>COMPOSIÇÃO</b>	<b>FUNÇÃO</b>	<b>EXEMPLO</b>
Glicerídeos (Acilgliceróis)	Um a três AGs este-reficados ao glicerol, (mono, di ou triglicerídeos)	-Reserva energética -Isolamento térmico	Oleína (principal componente do óleo de palma)
Fosfolipídeos	Uma molécula de glicerol ligada a duas (ou uma) cadeias de AGs e um (ou dois) grupo fosfato	-Estrutura e seletividade de membranas	Fosfatidilcolina (lecitina, abundante na soja)
Glicolipídeos	Ácido graxo ligado ao glicerol e um açúcar (glicero-glicolipídeos) ou Ácido graxo ligado a esfingosina (esfingolipídeos)	-Estrutura e estabilidade de membranas -Sinalização e reconhecimento celular -Sinalização e reconhecimento celular -Resposta imunológica	Esfingomielina (componente importante da membrana celular de neurônios)
Ceras	AGs com 16 a 30 átomos de C ligados a álcool mono-hidroxílico de 18 a 30 átomos de C	-Proteção -Estrutura	Palmitato de cetila (espermacete de cetáceos)

## 1.2 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DOS ÁCIDOS GRAXOS

### 1.2.1 SAÚDE E NUTRIÇÃO HUMANA

Lípideos contendo AGs são uma das principais fontes de energia e blocos de construção fundamentais na formação de membranas celulares e tecidos vivos, além de funções metabólicas especializadas. Mamíferos não sintetizam certos AGs poli-insaturados, portanto essas moléculas precisam ser adquiridas pela dieta alimentar. Estes são chamados AGs essenciais e participam em diversos processos metabólicos. Os AGs poli-insaturados abrangem as famílias de AGs ômega-3 e ômega-6 (n-3 e n-6 na denominação mais usada em estudos dos aspectos nutricionais de AGs), que apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, sendo a primeira insaturação no sexto e terceiro carbono, respectivamente, enumerado a partir do grupo metil terminal. A deficiência dietária de AGs essenciais pode levar a diversas complicações fisiológicas. Estudos controlados com seres humanos demonstram que a ingestão de ca. 250mg/dia dos AGs da família ômega-3 eicosapentanoico (EPA) e docosaexanoico (DHA) é benéfica para a regulação da pressão sanguínea, taxa de batimentos cardíacos e níveis de triglicerídeo, ajudando também em processos inflamatórios, funções endoteliais, além de evidências na redução de incidência de doenças coronária fatais (Mozaffarian e Rimm 2006, Yokoyama et al. 2007). DHA desempenha papel fundamental na formação do cérebro e da retina durante o desenvolvimento fetal e nos dois primeiros anos de vida (Cetin e Koletzko 2008, Helland et al. 2008). A ingestão de DHA no início da vida da criança evita problemas de retardo no crescimento e subnutrição, reduz taxas de mortalidade e a incidência, na vida adulta, de doenças como obesidade e problemas de comunicação. O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo essencial constituinte normal de membranas celulares e abundante no cérebro (juntamente com DHA). AA tem ação no desenvolvimento neurológico na formação do feto e durante os primeiros meses de vida do ser humano. O ácido araquidônico é abundante no leite materno, sendo também adicionado, juntamente com DHA, como complemento a fórmulas de leite em pó para lactantes, em concentrações similares ao leite materno, conforme recomendações de especialistas (FAO 1994, Brenna et al. 2007). Além disso, AA é comumente comercializado como suplemento para ganho de massa corpórea na formulação de diversos produtos. A ingestão de 1,5g/dia de AA por atletas de alta performance mostrou-se eficiente no aumento de massa corpórea, melhora na resistência física e na capacidade anaeróbica (Roberts et al. 2007). Pela ação da enzima cicloxigenase o AA sofre ciclização e recebe insaturações, produzindo prostaglandina (PG). PGs participam de inúmeras funções metabólicas e fisiológicas, como vasodilatação e vasoconstricção, contração ou relaxamento da musculatura brônquica e uterina, hipotensão, ovulação, entre muitas outras (Nelson e Cox 2012).

Mudanças de hábitos alimentares e o estilo de vida atual têm tornado cada vez mais difícil a obtenção de certos AGs essenciais pela dieta humana. Por essa razão, um dos principais interesses biotecnológicos na exploração de AGs é na área de nutrição e saúde humana. Nesse contexto, as fontes marinhas são altamente visadas, pois diversos organismos marinhos contêm altos teores de AGs poli-insaturados essenciais. A complementação da dieta de animais para consumo humano direto (bovinos, caprinos, aves) e seus derivados com óleos ricos em

AGs poli-insaturados, principalmente óleo de peixe, é uma prática difundida com o intuito de aumentar os teores desses AGs no produto final (Latscha 1990). Porém, o uso de óleo de peixe em quantidades excessivas pode conferir odor indesejável a carne, leite ou ovos. Fontes marinhas alternativas aos óleos de peixe e ricas em AGs poli-insaturados aparecem como uma alternativa promissora, principalmente os biocompostos produzidos por micro- e macroalgas (Kim et al. 2011, Raposo et al. 2015).

### 1.2.2 FONTE DE ENERGIA RENOVÁVEL

As previsões de escassez de combustíveis fósseis em um futuro próximo continuam estimulando a busca por fontes renováveis de energia. A produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras animais e vegetais é vista como uma alternativa para a substituição, ao menos parcial, do diesel de petróleo. A principal condição para que um óleo ou gordura natural possa ser transformado em biodiesel é o mesmo ser composto inicialmente por triglicerídeos (três moléculas de AGs ligadas ao glicerol, como visto acima) (VanGerpen 2005). O biodiesel é produzido pela transesterificação de triglicerídeos, que consiste na separação da glicerina, liberando os AGs. A glicerina da composição dos triglicerídeos é o que torna o óleo mais denso e viscoso. A remoção da glicerina no processo de transesterificação deixa o óleo mais fino e menos viscoso, mais apropriado para o uso em motores a combustão interna. AGs saturados (sem ligações duplas entre os átomos de carbono) fornecem biodiesel com boa estabilidade oxidativa e baixas emissões de NO<sub>x</sub>, porém com alto ponto de fusão, o que pode ser problemático em climas frios, pois o combustível solidifica à temperatura ambiente. A presença de saturações nos AGs torna o biodiesel mais propenso a oxidação, porém com menor ponto de fusão e consequentemente melhor desempenho em regiões de clima frio (Knothe 2005). São muitas as fontes naturais de óleos ricos em triglicerídeos com potencial para a produção economicamente viável de biodiesel. Óleo de coco e palma são exemplos de biomassas ricas em AGs saturados que têm sido utilizadas com sucesso na produção de biodiesel. Óleos de canola e de oliva, ricos em AGs monoinsaturados, fornecem biodiesel com pouca tendência a oxidação, com a vantagem de apresentarem baixo ponto de fusão, portanto apropriados para climas frios. Óleos de soja, milho, girassol, mamona, entre outros, são ricos em gorduras poli-insaturadas, por isso o biodiesel produzido a partir dessas biomassas necessita da adição de antioxidantes (Dunn 2005, Cao et al. 2014). Todas essas biomassas têm a desvantagem de competirem com terras agriculturáveis e muitas vezes diretamente no mercado de alimentos. Microalgas eucariontes são consideradas promissoras como fonte de lipídeos para biodiesel, tanto pela qualidade e teor celular de AGs produzidos por esses micro-organismos, quanto pelo fato de não competirem com terras agriculturáveis para produção de biomassa (Francisco et al. 2010). Microalgas marinhas têm a vantagem adicional de não competir por água potável. Diatomáceas marinhas são consideradas as microalgas com maior potencial para produção comercial de biodiesel (d'Ippolito et al. 2015).

### 1.2.3 COSMÉTICOS E FÁRMACOS

AGs têm grande aplicação na indústria cosmética e farmacêutica, onde são usados nos processos de fabricação, como excipientes na assimilação e mesmo como fármacos ativos. Uma das principais razões do uso de AGs na indústria de cosméticos é o poder de adesão desses compostos. Os ácidos esteárico, láurico, palmítico e misístico são comumente usados na formulação de sabões, cremes e pastas. Têm função importante como veículos para aplicação de fármacos na pele (Johnson 1978, Hui 1996). Sais metálicos de AGs, como o ácido esteárico combinado a Mg, são usados há décadas como lubrificantes de comprimidos, para facilitar a ingestão de fármacos, e novas formulações com outros AGs continuam sendo testadas para esse fim (Nakamura et al. 2017). Os ácidos oleico e esteárico são utilizados no revestimento de comprimidos para medicamentos com efeitos de liberação retardada, como em pH baixo no trato digestivo. Outras aplicações de AGs incluem a fabricação de pomadas e supositórios e como auxiliar na absorção de ferro e vitamina B12 (Gross et al. 1953, Wissler et al. 1954). AGs com alta atividade biológica têm mostrado alta eficiência contra malária (*Plasmodium*), micobactérias e fungos (Carballeira et al. 2006, Carballeira 2008) e como bactericidas (Knapp e Melly 1996).

## 2 | PIGMENTOS

### 2.1 ESTRUTURA, DIVERSIDADE E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

Ao contrário dos AGs descritos acima, a classe de compostos que chamamos de “pigmentos” não constitui um grupo químico definido. Pigmentos dão cor às plantas, algas e diversos micro-organismos aquáticos e terrestres. Os principais pigmentos naturais de interesse biotecnológico são as clorofilas, ficobilinas e carotenoides (Tabela 3). Uma das principais funções dos pigmentos na natureza é a captação de luz para geração de energia no processo fotossintético. A clorofila é o principal pigmento fotossintetizante, estando presente em todos os organismos que desempenham fotossíntese oxigênica, o que inclui cianobactérias, protistas com cloroplastos (microalgas eucarióticas), macroalgas e todas as plantas terrestres (Taiz e Zeiger 2010). Além das clorofilas de cianobactérias e eucariotos fotossintetizantes, diversas bacterioclorofilas produzidas por procariontes desempenham fotossíntese anoxigênica (Chew e Bryant 2007, Vogl et al. 2012). Os fotossintetizantes oxigênicos também apresentam diversos pigmentos acessórios, os principais sendo carotenoides e ficobiliproteínas. Esses pigmentos atuam de forma complementar na captação de energia solar em comprimentos de onda onde as clorofilas não são eficientes. Pigmentos acessórios canalizam energia para os centros de reação da clorofila. Alguns pigmentos acessórios do grupo dos carotenoides também recebem energia da clorofila, protegendo os centros de reação da fotossíntese contra foto-oxidação em situações de excessiva luminosidade (Bartley e Scolnik 1995, Choudhury e Behera 2001).

As clorofilas são pigmentos clorínicos do grupo das porfirinas, o mesmo dos grupos heme da hemoglobina do sangue, composto por quatro anéis pirrólicos contendo no centro um íon de magnésio,  $Mg^{2+}$ , ligado covalentemente (Figura 2). São conhecidas seis va-

**Tabela 3.** Pigmentos naturais, suas principais aplicações biotecnológicas, fontes naturais e benefícios à saúde.

PIGMENTO	APLICAÇÃO	FONTES MARINHAS	BENEFÍCIOS À SAÚDE E OUTRAS VANTAGENS
Carotenoides: betacaroteno, astaxantina, luteína	Corantes alimentícios, nutracêuticos, pigmentação de salmão em cultivo	Microalgas. Exemplo: <i>Dunaliella salina</i>	Precusores de vitamina A, antioxidantes, anticarcinogênicos, anti-inflamatórios, fontes naturais de pigmentos para alimentos e cosméticos, aromatizantes naturais
Carotenoides: fucoxantina	Estimulante da proteína UCP-1, resultando em termogênese metabólica	Algas pardas, diatomáceas. Exemplo: <i>Undaria pinnatifida</i> , <i>Chaetoceros calcitrans</i>	Antiobesidade, anticancerígeno, redução de diabetes tipo II
Ficobilinas: ficoeritrina, ficocianina	Corantes alimentícios, fluorocromos	Algas vermelhas e cianobactérias. Exemplos: <i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Anabaena marina</i>	Fonte natural de pigmentos, fluorocromos diagnóstico clínico e pesquisa
Clorofilas	Corantes alimentícios e de bebidas, nutracêuticos	Plantas aquáticas, algas e cianobactérias	Atividade anticancerígena, antienvelhecimento, fontes naturais de pigmentos

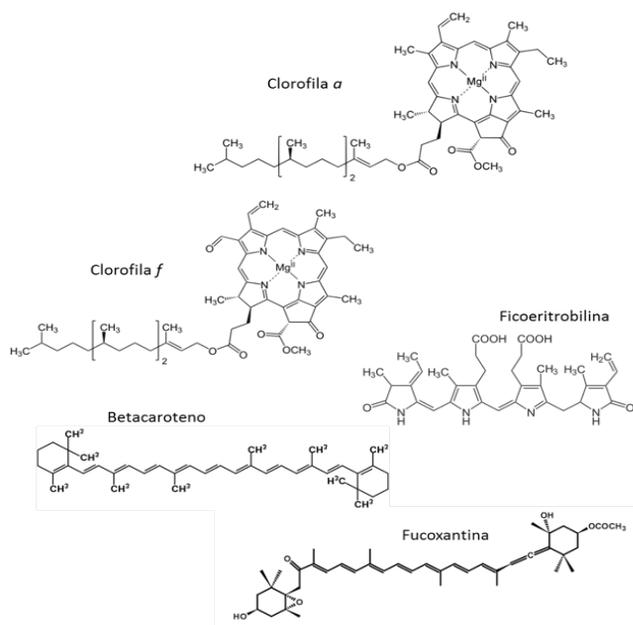
riantes estruturais de clorofila que ocorrem naturalmente (clorofilas *a*, *b*, *c1*, *c2*, *d* e *f*) sendo a clorofila *a* de presença universal nos fotossintetizantes oxigênicos (Graham et al. 2009). A maioria das clorofilas (*a*, *b*, *c1* e *c2*) absorvem luz com maior eficiência na faixa do azul, entre 400 e 500nm, e na região do vermelho, em torno de 650nm. Novas variantes de clorofilas descobertas recentemente (clorofilas *d* e *f*), produzidas por cianobactérias (*Acaryochloris marina* e *Halo-micronema hongdechloris*), possuem características distintas, absorvendo luz eficientemente na faixa do azul como as demais clorofilas, mas também no infravermelho, entre 700 e 750nm (Chen et al. 2010, Chen e Blankenship 2011, Tomo et al. 2014).

Os pigmentos acessórios ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) são complexos hidrofílicos formados por uma parte proteica covalentemente ligada a ficobilinas, a parte cromófora do complexo que efetivamente capta a energia luminosa. Ficobilinas (Figura 2) são moléculas altamente eficientes na captura de luz nos comprimentos de onda verde, amarelo, laranja e vermelho, faixas onde a maioria das clorofilas (incluindo a clorofila *a* presente em todos os clorofilados) não é muito eficiente (Glazer 1985). Existem quatro tipos de ficobilinas que formam as ficobiliproteínas e conferem cores variadas aos organismos: ficoeritrobilina (vermelha), ficourobilina (alaranjada), ficoviobilina (violeta) e ficocianobilina (azul).

Nas ficoeritrinas, uma família de ficobiliproteínas de grande importância biotecnológica, o cromóforo ligado à cadeia peptídica é normalmente a ficoeritrobilina e em alguns casos a ficourobilina (Sidler 1994). As ficoeritrinas são divididas em R-ficoeritrina, B-ficoeritrina e C-ficoeritrina, dependendo do espectro de absorção de luz (Marsac 2003). A regulação do teor de ficobiliproteínas nas células permite aos organismos fotossintetizantes que as produzem adaptar-se a diferentes regimes de qualidade de luz. Essa habilidade é especialmente relevante em ambientes aquáticos, onde a radiação solar é seletivamente alterada quando penetra na água, sendo alguns comprimentos de onda, como vermelho, absorvidos mais na superfície, enquanto

outros, como o azul e o verde, atingindo maiores profundidades (Lee 2008). Algas vermelhas e cianobactérias são os principais produtores de ficobiliproteínas encontrados na natureza.

Os carotenoides são terpenoides muito comuns na natureza. Formam uma categoria de pigmentos tetraterpenoides derivados de uma cadeia poliênica de 40 carbonos, conferindo características estruturais típicas a essas moléculas (Figura 2). São os pigmentos mais diversos e abundantes na natureza, com intensa coloração amarela, alaranjada, vermelha ou púrpura (Namitha e Negi 2010). Processos de hidrogenação e desidrogenação, posição e número de ligações duplas, variações no comprimento da cadeia poliênica, isomerização, ciclização e introdução de funções com oxigênio resultam na enorme diversidade estrutural e funcional conhecida dos carotenoides (Rodrigues-Amaya 1999). Carotenoides compostos somente de carbono e hidrogênio são denominados carotenos. Carotenoides oxidados são chamados xantofilas e apresentam na cadeia poliênica grupos substituintes contendo oxigênio. As xantofilas são classificadas em função da natureza do oxigênio – por exemplo, luteína (oxigênio presente como -OH) e astaxantina (oxigênio como -OH e grupos oxi) (Fraser e Bramley 2004). Carotenoides são os pigmentos com maior diversidade de variantes e maior amplitude de ocorrência na natureza; estão presentes em organismos de todos os grandes grupos taxonômicos existentes. O tom castanho de algas marrons, o alaranjado da cenoura, o tom róseo da carne de salmão, a cor púrpura de algumas bactérias e mesmo a tonalidade de penas de aves e da pele de répteis são alguns exemplos de carotenoides na natureza. A coloração de animais e plantas possui muitas funções ecológicas, entre elas o reconhecimento de indivíduos e acasalamento, proteção contra predação (cor como alerta para predadores) ou atração de mutualistas (flores e insetos polinizadores), entre muitas outras (Vershinin 1999). Além de conferir cor, carotenoides servem a uma grande variedade de funções biológicas. Carotenoides têm papel mecânico-estrutural,



**Figura 2.** Estrutura química de pigmentos comumente encontrados na natureza. De cima para baixo: clorofila a, o principal pigmento de cianobactérias, algas e plantas que desempenham fotossíntese oxigênica; clorofila f, um tipo de clorofila encontrado em cianobactérias que absorve radiação solar na faixa do azul, vermelho e, diferentemente da maioria das clorofilas, também na faixa do infravermelho; ficoeritrobilina, um cromóforo que forma ficobiliproteínas em algas vermelhas e cianobactérias; betacaroteno, um carotenoide precursor de vitamina A; fucoxantina, uma xantofila (carotenoide contendo oxigênio) abundante em algas pardas com propriedades antiobesidade.

que se acredita tenha evoluído de arqueias, conferindo rigidez e reduzindo fluidez de membranas celulares em micro-organismos e animais (Rohmer et al. 1979).

Carotenoides se associam a proteínas, compondo estruturas rígidas como a cutícula de crustáceos. Atuam como pigmentos fotossintetizantes acessórios e fotoprotetores e são a base dos processos de percepção visual em animais através do derivado retinal. Retinal, quando associado a diferentes tipos de proteínas (opsinas), absorve luz em diferentes comprimentos de onda, formando a base para a visão em cores em mamíferos. Outros derivados de carotenoides, como o ácido retinoico (parte oxidada do betacaroteno) e ácido abscísico (derivado de neoxantina), atuam como hormônios em animais e plantas, respectivamente (Vershinin 1999).

## **2.2 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

### **2.2.1 CORANTES E PIGMENTANTES**

Pigmentos naturais conferem cor a animais e plantas. Essa característica básica é um grande atrativo em aplicações biotecnológicas para adicionar cor a diversos produtos, tornando-os mais atrativos ao consumo sem comprometer a saúde dos consumidores. A cor dos alimentos é uma propriedade organoléptica tão importante quando o sabor.

Clorofilas e alguns de seus derivados são usados como aditivo para dar cor verde a alimentos e bebidas, como pastas e absinto, e também em produtos de higiene pessoal como creme dental e sabões, além de cosméticos. Como as clorofilas não são solúveis em água, precisam ser primeiro misturadas com óleos vegetais para então poderem ser utilizadas nos processos de coloração. Uma das limitações do uso de clorofilas como corante é sua baixa estabilidade, levando a alteração indesejável da cor dos produtos. Isto se deve à perda relativamente fácil e irreversível do átomo de magnésio do centro da molécula e sua transformação em feofitina, que não possui a cor verde típica da clorofila intacta. Um pigmento semissintético mais estável, a clorofilina cúprica, conhecido como verde natural e pelo código E141, é produzido a partir da clorofila natural extraída de plantas por um processo de substituição do átomo de magnésio por um de cobre (Jones et al. 1977). Esse composto, porém, tem uso restrito como corante alimentício, por causar riscos à saúde humana, não sendo permitida na maioria dos países a sua adição em óleos e gorduras.

Carotenoides, em função da sua vasta distribuição na natureza e diversidade estrutural, são os pigmentos mais largamente utilizados como corantes pela indústria alimentícia e na pecuária como aditivo de ração (Mortensen 2006). Os carotenoides utilizados na indústria como corantes são sintetizados quimicamente ou extraídos de plantas e algas. A maior parte dos carotenoides consumidos atualmente são sintéticos, porém há crescente preocupação e demanda por alimentos livres de aditivos químicos, o que tem impulsionado o interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos. Além do apelo de ser um produto natural, carotenoides produzidos organicamente, principalmente por micro-organismos, apresentam qualidades desejáveis para o setor produtivo. Micro-organismos podem ser obtidos praticamente continuamente, em curto prazo e em qualquer época do ano, melhorando a logística da produção. Uma das aplicações comuns para carotenoides como corantes é o seu

uso na alimentação de animais para conferir cores atraentes ao produto final. Na avicultura, por exemplo, carotenoides são adicionados à ração para melhorar a pigmentação da pele e da gema dos ovos, especialmente quando o milho (rico em carotenoides) é substituído por outros tipos de ração. Similarmente, na aquicultura o uso de carotenoides vermelhos, rosa e amarelos na alimentação de peixes é importante para tornar a carne dos animais com aspecto mais atrativo (Mortensen 2006).

Dentre as ficobiliproteínas, R-ficoeritrina e C-ficocianina são as mais amplamente usadas como corantes em alimentícios e cosméticos, conferindo, respectivamente, coloração vermelha e azul aos produtos (Le Jeune et al. 2003, Albertsson 2003, Kuddus et al. 2013).

### **2.2.2 FRAGRÂNCIAS E AROMATIZANTES**

Compostos derivados de carotenoides encontram aplicação como fragrâncias e aromatizantes. São exemplos a betaionona, alfaionona, di-hidroactinidiolida, damascenol e betaciclocitral (Weeks 1986). Diversos desses compostos foram inicialmente isolados de plantas e sua produção sintética revolucionou a indústria de perfumes. Na natureza, esses derivados voláteis funcionam como fungicidas, agentes anti-herbivoria e na atração de polinizadores (Mortensen 2006). A produção de compostos com aroma a partir de carotenoides é feita por clivagem enzimática (dioxigenases), fotoxigenação, oxidação ou degradação térmica e posterior conversão de precursores não voláteis nas formas ativas dos compostos de aromas utilizados pela indústria (Weeks 1986).

### **2.2.3 FLUOROCROMOS**

Possivelmente uma das mais sofisticadas aplicações de pigmentos naturais é seu uso como fluorocromos conjugados em tecnologias de ponta na área de diagnóstico e pesquisas clínicas. As ficobilinas que constituem as ficobiliproteínas ficoeritrina (PE) e aloficocianina (APC) são moléculas com alto brilho de fluorescência. As formas de PE (R-PE e B-PE) são os pigmentos com maior eficiência quântica identificados até hoje (Mason 1999). Por essa razão as ficobiliproteínas desempenham papel fundamental como antenas de captação de luz nos organismos fotossintetizantes que as produzem. Essa qualidade como um excelente fluorocromo é também aproveitada em diversas aplicações de diagnóstico clínico e pesquisa científica, desde biologia celular e imunologia até ciências ambientais. Ficoeritrina e aloficocianina têm a vantagem de ser solúveis em água, facilitando sua aplicação. Esses compostos são usualmente conjugados a anticorpos e sondas de ácidos nucleicos para revelar a presença de grupos celulares em misturas complexas e tecidos biológicos, estruturas celulares, ou genes em cromossomos (Araoz et al. 2003, Kronik 1986). Técnicas modernas de análise de células baseadas em fluorescência, como citometria de fluxo multiparamétrica e microscopia de epifluorescência, utilizam esses pigmentos como fluorocromos tanto nos marcadores celulares quanto em insumos de uso rotineiro como, por exemplo, materiais para calibração dos instrumentos e validação das análises (Wilson et al. 1991). A ficoeritrina é muito utilizada para essas finalidades por absorver luz de forma muito eficiente nos comprimentos de onda da faixa do azul, cor típica da maioria

dos lasers que equipam citômetros de fluxo. Além das ficobiliproteínas, um conjugado de clorofila com o carotenoide peridina e proteínas (PerCP, peridinin-chlorophyll-protein) também encontra aplicação como fluorocromo. O conjugado PerCP é um dos fluorocromos com maior desvio de Stokes (diferença em nanômetros entre os picos do espectro de excitação e emissão), com alta excitação na faixa do azul e verde e emissão acima de 650nm, na região do vermelho, o que torna sua utilização bastante atraente em aplicações de imunologia com múltiplas cores junto com fluoresceína, PE e APC (Telford et al. 2001). Ficobiliproteínas com alto grau de pureza para uso em diagnósticos clínicos e pesquisa científica são comercializados a valores bem mais elevados quando comparados com corantes naturais para alimentos – por exemplo, 1mg de R-ficoeritrina de alto grau de pureza custa em torno de U\$250 no mercado varejista especializado. O processo de purificação das ficobiliproteínas requer técnicas sofisticadas e caras, como cromatografia de troca iônica, sendo esse aspecto um foco de muitas pesquisas na busca do barateamento do processo produtivo de obtenção desses pigmentos para fins biotecnológicos (Kawsar et al. 2011).

#### **2.2.4 SAÚDE E NUTRIÇÃO**

O grupo de pigmentos com mais efeitos benéficos para a saúde humana é sem dúvida o dos carotenóides. Nos últimos anos no Brasil se tornou comum ver produtos ricos em carotenóides nas prateleiras de supermercados e lojas especializadas em nutracêuticos. É notável a diversidade de funções biológicas desempenhadas por esse grupo de compostos (ver item acima), o que explica sua importância como nutracêuticos. Carotenóides são produzidos naturalmente por plantas, algas eucarióticas, fungos, cianobactérias e diversos procariontes, mas não pela grande maioria dos animais, que precisam adquiri-los por meio da dieta (Schroeder e Johnson 1995). Os únicos animais conhecidos como produtores de carotenóides são espécies de afídeos (pulgões ou piolho de plantas) e ácaros, que adquiriram a capacidade através de transferência gênica de fungos (Altincicek et al. 2011). Uma das funções fisiológicas mais conhecidas dos carotenóides é sua ação como pró-vitamina A, por isso são importantes na dieta animal. O principal carotenoide precursor de vitamina A é o betacaroteno, obtido de diversos tipos de vegetais – cenoura, frutas amarelas e vermelhas, grãos, entre outros. Alfacaroteno e betacriptoxantina também são convertidos em vitamina A no metabolismo dos animais. Vitamina A é essencial nos animais para os processos de visão, resposta imune, reprodução e comunicação celular. Uma série de outros efeitos fisiológicos benéficos são atribuídos aos carotenóides, apesar de alguns estudos epidemiológicos recentes ainda indicarem resultados inconclusivos para alguns desses benefícios (Soares et al. 2015). O alto poder antioxidante e atividade modulatória do sistema imune apresentada pelos carotenóides os colocam como potenciais agentes na prevenção e cura de diversas doenças que são diretamente relacionadas a estresse oxidativo e processos inflamatórios crônicos, como câncer, doenças cardiovasculares, disfunções da visão, artrite reumática e doenças degenerativas do sistema neurológico (Vilchez et al. 2011). O licopeno é um dos carotenóides com maior poder antioxidante (capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio) e com potencial de interferir no processo de divisão celular em células tumorais e, portanto, muito estudado na prevenção de câncer (Kim e Kim 2015). Asta-

xantina, abundante em peixes como salmão e em outros frutos do mar, atua na prevenção de câncer de próstata e fígado (Zhang e Wang 2015). Fucoxantina, uma xantofila encontrada em abundância em algas pardas e diatomáceas marinhas, tem mostrado resultados promissores no tratamento da obesidade e controle do peso corpóreo, além de atividade antitumoral (Miyashita et al. 2011, Thamaraiselvan et al. 2014). Estudos em animais mostram que uma dieta rica em fucoxantina aumenta a expressão da proteína termogenina, promovendo a oxidação de gorduras em células do tecido adiposo branco (Maeda et al. 2005). Luteína, um caroteno altamente polar e de grande poder antioxidante, atua na prevenção de complicações da visão comuns no envelhecimento, como catarata e degeneração macular (Mares-Perlman et al. 2002). Esses são alguns exemplos dos potenciais benefícios conhecidos dos carotenoides na saúde humana. Diversas companhias comercializam nutracêuticos ricos em carotenoides na forma de pílulas ou cápsulas feitas a partir de microalgas eucarióticas como *Chlorella*, *Dunaliella* e cianobactérias como *Spirulina* e *Aphanizomenon*. Essas formas de biomassa são preferidas em relação ao tradicional óleo de peixe como fonte de carotenoides, pois não apresentam o odor deste último. A grande quantidade de pesquisas em andamento sobre a atividade dos carotenoides no metabolismo, além de estudos epidemiológicos, provavelmente revelará muitas outras qualidades desses compostos.

Os pigmentos do grupo das ficobiliproteínas, assim como clorofilas e seus derivados, também apresentam propriedades antioxidantes elevadas e têm sido estudados como nutracêuticos. Experimentos com nematodos mostram que esses pigmentos retardam o envelhecimento e prolongam a vida dos animais (Sonania et al. 2014, Wang e Wink 2016). Esses compostos têm potencial de aplicação na prevenção de câncer e em cosméticos com propriedades antienvhecimento. Clorofilina, um derivado semissintético e hidrossolúvel da clorofila, liga-se facilmente a agentes mutagênicos do ambiente como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, atuando na prevenção de câncer (Castro et al. 2009).

## 3 | FONTES MARINHAS DE ÁCIDOS GRAXOS E PIGMENTOS

Organismos marinhos são ricos em AGs poli-insaturados de interesse biotecnológico, além de uma variedade de pigmentos como clorofila, ficobiliproteínas e carotenoides. Os principais produtores desses compostos são os seres fotossintetizantes, tanto macro quanto micro-organismos (Bergé e Barnathan 2005, Maoka et al. 2011). Carotenoides são inicialmente produzidos por algas eucarióticas, cianobactérias, bactérias e fungos. Animais adquirem esses compostos por meio da dieta e os incorporam diretamente ou após transformações no metabolismo (Figura 3). A seguir são apresentados exemplos de organismos marinhos que se destacam como fontes já exploradas ou com potencial para exploração futura de AGs e pigmentos.

### 3.1 MACROALGAS



**Figura 3.** Produção, acúmulo e biotransformação de carotenoides em organismos marinhos. Adaptado de Maoka et al. (2011).

Macroalgas bentônicas são importantes produtores primários em zonas marinhas costeiras, sendo ricas em pigmentos fotossintetizantes e uma das maiores fontes desses compostos para diversos usos pelo homem. Pertencem a três grandes grupos com características pigmentares distintas: as algas verdes (filo Chlorophyta) possuem clorofilas a e b e carotenoides; as vermelhas (filo Rhodophyta) apresentam clorofilas a e c, as ficobiliproteínas R-ficoeritrina e R-ficocianina, e normalmente grandes quantidades dos carotenoides betacaroteno, luteína e zeaxantina; por fim as algas pardas (filo Heterokontophyta, classe Phaeophyceae) possuem, como as vermelhas, clorofilas a e c e carotenoides, com predominância de fucoxantina, que lhes confere a cor marrom típica (Pereira 2015).

Algas vermelhas apresentam níveis elevados de AGs poli-insaturados de 20 carbonos, primariamente EPA (até 37%) e AA (até 29%). Algas pardas produzem mais AGs de 18 carbonos, mas contêm EPA entre os AGs mais abundantes. Algas verdes apresentam os mais altos teores de AGs de 18C e os menores teores das cadeias poliênicas de 20 carbonos (Li et al. 2002, Khotimchenko et al. 2002).

Macroalgas marinhas são uma fonte importante de carotenoides na alimentação e saúde humana, seja pelo consumo direto ou na forma de pílulas ou tabletes de biomassa seca (Mise et al. 2011). No Oriente, macroalgas são consumidas regularmente há milhares de anos. A alga vermelha *Porphyra tenera* (classe Bangiophyceae), uma das mais populares algas comestíveis do Japão (Asakusa-nori), contém uma série de metabólitos de carotenoides. Os teores de luteína e zeaxantina podem chegar a mais de 95% do total de carotenoides nas algas vermelhas, além de alfa e betacaroteno e outros carotenoides em menos quantidade. Membros da família Corallinaceae (ordem Corallinales) distinguem-se por conter anteraxantina no lugar de luteína (Schubert e García-Mendoza 2006). As recentes descobertas de propriedades antiobesidade da fucoxantina têm aumentado o interesse na produção de algas pardas para uso medicinal. A fucoxantina já foi isolada para estudos de bioatividade de pelo menos 20 espécies de algas pardas dos gêneros *Alaria*, *Cladosiphon*, *Cystoseira*, *Eisenia*, *Fucus*, *Hijikia*, *Ishige*, *Kjellmaniella*, *Laminaria*, *Myagropsis*, *Padina*, *Petalonia*, *Sargassum* e *Undaria* (Peng et al. 2011). O gênero *Laminaria* (kombu) é também muito utilizado na culinária asiática e uma importante fonte natural de fucoxantina para a população.

### 3.2 MICROALGAS EUCARIÓTICAS, CIANOBACTÉRIAS E BACTÉRIAS

Devido a sua grande diversidade e possibilidade de cultivo em massa, microalgas euca-

rióticas e cianobactérias marinhas apresentam grande potencial biotecnológico. Diatomáceas produzem clorofila a e c como pigmentos principais e altas quantidades de fucoxantina como seu principal carotenoide, competindo com algas pardas como fonte desse importante composto (Peng et al. 2011). A maioria das diatomáceas também contém altos teores de EPA (n-3), como espécies de *Phaeodactylum tricoratum* e *Nitzschia laevis*, o que contribui para viabilidade econômica da produção desses compostos em cultivos intensivos (Dunstan et al. 1994, Lebeau e Robert 2003a, 2003b). Diatomáceas produzem e acumulam gotículas lipídicas como produto de reserva durante o crescimento vegetativo em quantidades atraentes para exploração biotecnológica, especialmente em cultivos manipulados com limitação por nitrogênio. Teores de óleos ricos em triglicerídeos em diatomáceas compõem normalmente 20 a 35% da biomassa seca, mas podem chegar a mais de 70% (Hu et al. 2008). Além disso, apresentam um perfil de AGs com composição ideal para produção de biodiesel de ótima qualidade (Hildebrand et al. 2012). Diversas microalgas marinhas produzem EPA e DHA em níveis elevados e são potenciais fontes primárias desses compostos. As microalgas *Nannochloropsis* spp., *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricoratum* e *Chaetoceros calcitrans* foram consideradas boas produtoras de EPA. *Isochrysis galbana*, *Cryptocodinium* spp. e *Schyzotrichium* spp. são fontes promissoras de DHA. Além dessas, *Pavlova lutheri* e *Thalassiosira pseudonana* foram identificadas como fonte para ambos, EPA e DHA (Hymaia e Kim 2015). Engenharia metabólica vem sendo usada para melhorar o teor lipídico de diatomáceas marinhas e.g. através do aumento da expressão da enzima CoA-carboxilase que catalisa a carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA, substrato da síntese de AGs (Lu et al. 2011). Haptófitas contêm muitas espécies marinhas típicas de ambientes tropicais. Entre aquelas com potencial biotecnológico destacam-se as espécies *Isochrysis galbana* e *Pavlova lutheri*, ricas em AGs poli-insaturados como DHA e EPA (Burgess et al. 1993, Wen e Chen 2003).

Cianobactérias marinhas são importantes como potenciais fontes das ficobiliproteínas usadas como corantes, nutracêuticos e fluorocromos. Gêneros como *Synechococcus*, uma das cianobactérias unicelulares mais abundantes nos oceanos, produzem R-ficoeritrina, enquanto espécies filamentosas como *Anabaena marina* são ricas em C-ficocianina (Lee 2008, Sekar e Chandramohan 2008).

Bactérias heterotróficas marinhas produzem AGs, apesar de essa característica ter sido ignorada por muito tempo. AGs de bactérias são predominantemente saturados e monoin-saturados de 10 a 20 carbonos, sendo os poli-insaturados de cadeia longa mais raros. Porém, bactérias têm capacidade de produzir AGs poli-insaturados (e.g. *Pseudomonas* e *Vibrio*) e essa capacidade foi observada também em bactérias de grandes profundidades (Nichols 2003). Em bactérias, EPA e DHA formam fosfolipídeos ao invés de triacilglicerídeos. A produção de EPA em larga escala por bactérias é considerada viável e possui vantagens sobre a fonte tradicional desses ácidos graxos, o óleo de peixe (Freese et al. 2009). A manipulação das condições de crescimento de linhagens de bactérias marinhas indica que é possível obter bons rendimentos na produção de EPA (El Razak et al. 2014).

Bactérias têm capacidade em produzir carotenoides mono- ou dicíclicos de 40 carbonos, bem como acíclicos de 30 carbonos (Goodwin 1980, Britton et al. 2004). Carotenoides raros foram isolados de linhagens de alfa-proteobactérias como *Paracoccus* sp., *Brevundimonas* sp.,

*Erythrobacter* sp. e *Flavobacterium* sp., que também produzem astaxantina (Misawa 2010).

Como procariontes são de crescimento rápido e as tecnologias de cultivo são estabelecidas, a produção de AGs e pigmentos por esses micro-organismos apresenta-se como uma perspectiva promissora.

### 3.3 INVERTEBRADOS E PEIXES

Animais precisam adquirir AGs essenciais e carotenoides por meio da dieta para suprir o metabolismo. O perfil desses compostos em animais marinhos reflete em geral os hábitos e itens alimentares preferenciais de cada grupo, com variações em função da seletividade na absorção e acúmulo e nos processos de transformação no metabolismo de cada grupo.

Espunjas (Porifera) são conhecidas por conterem grande variedade de AGs e diversos carotenoides. AGs com propriedade bioativa têm sido extensamente estudados nesse grupo. Uma recente revisão (Mishra et al. 2015) mostra uma grande variedade, ca. 200 AGs já identificados em esponjas. Essa diversidade, que varia entre espécies de Porifera, é refletida no grau de saturação, ramificações, comprimento da cadeia e tipos e número de grupos funcionais presentes nos AGs. Dentro da diversidade de AGs exibida pelas esponjas estão variantes raras, com funções ainda não totalmente conhecidas, mas também AGs poli-insaturados de reconhecida importância biomédica, como o ácido linoleico, ácido linolênico, AA, EPA, DHA, entre outros (Mishra et al. 2015). A coloração vívida de muitas esponjas marinhas se deve à presença de carotenoides nos tecidos (Britton et al. 2004). Os carotenoides característicos de esponjas, como isorenierateno, renierateno e renierapurpurina, e as recentemente descritas bastaxantinas, possivelmente originam-se de bactérias simbiotes e da ingestão de diatomáceas (Liaaen-Jensen 1998, Matsuno 2001, Rogers e Molinski 2005).

Moluscos marinhos também possuem grande diversidade de AGs. Em bivalves os teores de AGs poli-insaturados chegam a quase 50% do total de AGs e incluem EPA e DHA (Freites et al. 2002a). Altos teores de AGs saturados (e.g. C20:0) foram observados em bivalves de ambientes ricos em matéria orgânica e alta carga de bactérias, comparados com populações nutridas com fitoplâncton marinho, que são enriquecidos por AGs poli-insaturados de 18, 20 e 22 carbonos (Freites et al. 2002b). Carotenoides encontrados em moluscos marinhos normalmente refletem a dieta dos organismos. Carotenoides encontrados em quítons (classe Polyplacophora) que predam sobre algas são luteína, zeaxantina e fucoxantina e seus metabólitos (Tsushima et al. 1989). Similarmente, os gastrópodes herbívoros *Haliotis discus* e *Turbo cornutus*, que se alimentam de algas pardas e vermelhas, são ricos em betacaroteno, alfacaroteno, zeaxantina, luteína e fucoxantina, enquanto o gastrópode carnívoro *Charonia sauliae*, que se alimenta de estrelas-do-mar, é rico em astaxantina, o principal carotenoide encontrado nas estrelas-do-mar (Maoka et al. 2011). O mesmo padrão é observado em moluscos bivalves (mexilhões e ostras) que acumulam e metabolizam carotenoides de microalgas (Liaaen-Jensen 1998). A cor alaranjada ou vermelho vívido de alguns mexilhões deve-se à presença de carotenoides (Maoka 2011). A conversão metabólica de fucoxantina e peridinina (um carotenoide de dinoflagelados marinhos) em bivalves ocorre pela hidrólise do grupo acetil, conversão da ligação alênica em acetilênica e hidrólise do anel epoxi (Maoka 2011). Os carotenoides detectados em bivalves fornecem informações importantes

sobre interações na teia trófica marinha e dos processos metabólicos de biotransformação de carotenoides.

Entre os crustáceos marinhos, copépodos são os mais bem estudados em relação à composição e transformação de AGs. Copépodos marinhos são particularmente ricos em lipídeos, Celenterados têm perfis peculiares de AGs, alguns com estruturas pouco comuns ou concentrações dos AGs comuns diferentes do normalmente encontrado em outros grupos. Por exemplo, grandes quantidades de ácido tetracosapolienoico (24:6, n-3 e 24:5, n-6) são encontradas em diferentes ordens de octocorais (Baptista et al. 2012). Corais zooxantelados (que contêm algas simbiotes em suas células) obtêm AGs tanto da alimentação quanto dos fotossintatos dos simbiotes que são incorporados pelo coral (Oku et al. 2003).

Assim como nos celenterados, grandes quantidades de ácido tetracosapolienoico como o 24:6 (n-3) são encontrados nos equinodermos (McKenzie et al. 2000). Esse ácido graxo, quando isolado de *Ophiura sarsi*, apresentou significativa atividade anti-inflamatória e antialérgica similar aos efeitos do DHA. Esse organismo ainda contém 15% de EPA e 2,6% de DHA na fração lipídica. Equiniona é o carotenoide abundante nas gônadas de ouriços-do-mar, sendo um metabólito da oxidação de betacaroteno (Matsuno 2001). Estrelas-do-mar predam majoritariamente sobre moluscos bivalves e crustáceos. Seus principais carotenoides correspondem, portanto, aos metabólitos da oxidação do betacaroteno, diatoxantina e aloxantina.

Tunicados são, assim como moluscos bivalves, organismos filtradores, e espera-se que esse hábito reflita nos perfis de AGs e carotenoides. A maioria dos tunicados, como a ascídia comestível *Halocynthia roretzi* e formas planctônicas, apresentam AGs poli-insaturados como a maior fração de AGs, em torno de 50%. AGs saturados compreendem de 22 a 32% da fração fosfolipídica (Kostetsky et al. 1983). Carotenoides de tunicados originam-se do fitoplâncton que ingerem, incluindo muitas diatomáceas, sendo, portanto, metabólitos de fucoxantina, diatoxantina e aloxantina (Matsuno 2001).

Peixes como sardinha e cavala contêm altos teores de AGs, sendo a base da produção comercial de ômega-3. Esses peixes acumulam AGs, pois se alimentam próximo à base da cadeia alimentar, onde estão os produtores desses compostos. Dezenas de AGs já foram identificados no óleo de peixe marinho, mas oito tipos representam mais de 80% do total (Bergé e Barnathan 2005). A composição de AGs nos peixes é determinada pela dieta e metabolismo (Sargent 1995). Peixes conseguem sintetizar de novo os AGs saturados e monoinsaturados, além de absorver seletivamente e metabolizar AGs da dieta, incluindo poli-insaturados de cadeia longa, de forma a otimizar a composição corpórea desses compostos (Peng et al. 2003). Peixes são também ricos em carotenoides e apresentam grande variedade desses compostos. Astaxantina é amplamente encontrada em peixes marinhos e de água doce. Perciformes e salmonídeos não sintetizam astaxantina, sendo o carotenoide encontrado nesses peixes originado da ingestão de crustáceos do zooplâncton (Schiedt 1998). Tunaxantina, metabolizada a partir de astaxantina, confere coloração amarelada às nadadeiras dos perciformes (Matsuno 2001). Novos carotenoides continuam sendo isolados de organismos marinhos, indicando a vasta diversidade desses pigmentos no mar. Recentemente tem se visto uma explosão no mercado de carotenoides, motivada pelas descobertas do potencial terapêutico dessas substâncias.

## 4 | CONCLUSÃO

Por razões óbvias de acessibilidade e questões culturais, a biota terrestre (e.g. frutas, cereais, fungos, bactérias) é notavelmente ainda mais explorada do que a de ambientes marinhos (e.g. micro- e macroalgas, esponjas, peixes) como fonte de AGs e pigmentos com aplicações biotecnológicas. Apesar de existirem AGs e pigmentos sendo extraídos de organismos marinhos, a diversidade desses compostos encontrada nos organismos que já foram estudados deixa claro que há muitos outros que precisam ser avaliados e certamente novas fontes marinhas serão descobertas. O ambiente marinho apresenta grandes variações de propriedades físico-químicas em salinidade, temperatura, pressão e radiação luminosa. Portanto, é plausível assumir que os organismos nesse ambiente estejam submetidos a intensos processos seletivos e evolutivos, levando à diversificação de metabolismos e, conseqüentemente, de biomoléculas. Essa ideia atrai o interesse de pesquisadores e investidores e incentiva a busca por novos compostos no mar. É consenso entre especialistas que a biodiversidade marinha ainda é subexplorada para fins biotecnológicos. Em relação à exploração de AGs e pigmentos, as potencialidades são reconhecidamente promissoras.

## REFERÊNCIAS

- Albertsson, P.A. (2003). The contribution of photosynthetic pigments to the development of biochemical separation methods: 1900–1980. **Photosynth. Res.** 76(1-3): 217-225.
- Altincicek, B.; Kovacs, J.L.; Gerardo, N.M. (2011). Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Biology Letters.** 8(2): 253-257.
- Araoz, R.; Lebert, M.; Hader, D.P. (1998) Electrophoretic applications of phycobiliproteins. **Electrophoresis.** 19(2): 215-219.
- Baptista, M.; Lopes, V.M.; Pimentel, M.S.; Bandarra, N.; Narciso, L.; Marques, A.; Rosa, R. (2012) Temporal fatty acid dynamics of the octocoral *Veretillum cynomorium*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B,** 161: 178-187.
- Bartley, G.E.; Scolnik, P.A. (1995) Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. **The Plant Cell.** 7: 1027-1038.
- Bergé, J.L., Barnathan, G. (2005) Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. **Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.** 96: 49-125.
- Brenna, J.T.; Varamini, B.; Jensen, R.G.; Diersen-Schade, D.A.; Boettcher, J.A.; Arterburn, L.M. (2007) Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human milk worldwide. **Am. J. Clin. Nutr.** 85:1457-1464.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (2004) **Carotenoids Hand Book.** Birkhäuser: Basel/Switzerland.
- Burgess, J.G.; Iwamoto, K.; Miura, Y.; Takano, H.; Matsunaga, T. (1993) An optical-fiber photobioreactor

for enhanced production of the marine unicellular alga *Isochrysis aff. galbana* T-Iso (UTEX-LB-2307) rich in docosahexaenoic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 39: 456-459.

Cao, Y.; Liu, W.; Xu, X.; Zhang, H.; Wang, J.; Xian, M. (2014) Production of free monounsaturated fatty acids by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels.** 7:59.

Carballeira, N.M. (2008) New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. **Prog. Lipid Res.** 47(1): 50-61.

Carballeira, N.M.; Sanabria, D.; Cruz, C.; Parang, K.; Wan, B.; Franzblau, S. (2006) 2,6-Hexadecadiynoic acid and 2,6-nonadecadiynoic acid: novel synthesized acetylenic fatty acids as potent antifungal agents. **Lipids.** 41(5): 507-511.

Castro, D.J.; Löhner, C.V.; Fischer, K.A.; Waters, K.M.; Webb-Robertson, B.J.; Dashwood, R.H.; Bailey, G.S.; Williams, D.E. (2009) Identifying efficacious approaches to chemoprevention with chlorophyllin, purified chlorophylls and freeze-dried spinach in a mouse model of transplacental carcinogenesis. **Carcinogenesis.** 30(2): 315-320.

Cetin, I.; Koletzko, B. (2008) Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** 11(3): 297-302.

Chen, M.; Blankenship, R.E. (2011) Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. **Trends in Plant Science.** 16:427-431.

Chen, M.; Schliep, M.; Willows, R.D.; Cai, Z.L.; Neilan, B.A.; Scheer, H. (2010). A red-shifted chlorophyll. **Science.** 329(5997): 1318-1319.

Chew, A.G.; Bryant, D.A. (2007) Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity. **Annu. Rev. Microbiol.** 61:113-129.

Choudhury, N.K.; Behera, R.K. (2001) Photoinhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photo-protection of chloroplast constituents. **Photosynthetica.** 39(4): 481-488.

D'Ipollito, G.; Sardo, A.; Paris, D.; Vella, F.M.; Delfi, M.G.; Botte, P.; Gallo, C.; Fontana, A. (2015) Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. **Biotechnology for Biofuels.** 8:28.

Dunn, R.O. (2005) Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel) **Fuel Processing Technology.** 86(10): 1071-1085.

Dunstan, G.A.; Volkman, J.K.; Barrett, S.M.; Lero, J.M.; Jeffrey, S.W. (1994) Essential polyunsaturated fatty-acids from 14 species of diatom (*Bacillariophyceae*) **Phytochemistry.** 35:155-161.

El Razak, A.A.; Ward, A.C.; Glassey, J. (2014) Screening of marine bacterial producers of polyunsaturated fatty acids and optimisation of production. **Microb Ecol.** 67:454-464.

Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization Joint Expert Consultation (1994) *Fats and Oils in Human Nutrition*. Vol. 57. FAO; Rome, Italy. **Lipids in early development**; pp. 49-55. FAO Food and Nutrition Papers.

Francisco, E.C.; Neves, D.B.; Jacob-Lopes, E.; Franco, T.T. (2010) Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology.** 85: 395-403.

Fraser, P.D.; Bramley, P.M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog. Lipid Res.** 43:228-265.

Freese, E.; Rütters, H.; Köster, J.; Rullkötter, J.; Sass, H. (2009) Gammaproteobacteria as a possible source of eicosapentaenoic acid in anoxic intertidal sediments. **Microb. Ecol.** 57(3):444-454.

Freites, L.; Fernandez-Reiriz, M.J.; Labarta, U. (2002a) Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis*

- (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin. **Comp. Biochem. Physiol.** 132B:453-461.
- Freites, L.; Fernandez-Reiriz, M.J.; Labarta U (2002b) Lipid classes of mussel seeds *Mytilus galloprovincialis* of subtidal and rocky shore origin. **Aquaculture.** 207: 97.
- Glazer, A.N.; (1985) Light harvesting by phycobilisomes. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry.** 14: 47-77.
- Goodwin, T.M. (1980) **The Biochemistry of Carotenoids.** 2nd. ed. Vol. 1. Plant. Chapman and Hall. pp. 291-319.
- Graeve, M.; Albers, C.; Kattner, G. (2005) Assimilation and biosynthesis of lipids in Arctic *Calanus* species based on feeding experiments with a <sup>13</sup>C labelled diatom. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 317: 109-125.
- Graham, L.E.; Graham, J.M.; Wilcox, L.W. (2009) **Algae.** 2nd. ed. Benjamin Cummings. 616p.
- Gross, H.M.; Becker, C.H. (1953) A study of suppository bases. III. A new water-soluble suppository base. **J. Am. Pharm. Assoc.** 42(8): 498-501.
- Helland, I.B.; Smith, L.; Blomen, B.; Saarem, K.; Saugstad, O.D.; Drevon, C.A. (2008) Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 very-long-chain fatty acids on children's IQ and body mass index at 7 years of age. **Pediatrics.** 122(2): e472-479.
- Hildebrand, M. Davis, A. Smith, S.; Traller, J.; Abbriano, R. (2012) The place of diatoms in the biofuels industry. **Biofuels.** 3:221-240.
- Himaya, S.W.A.; Kim, S.K. (2015) **Marine nutraceuticals.** Springer Handbook of Marine Biotechnology. Cap. 43. Springer Verlag Berlin. 995-1014.
- Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M.; Darzins, A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant J.** 54:621-639.
- Hui, Y.H. (1996) **Bailey's Industrial Oil and Fat Product.** 5th. ed. Wiley, New York.
- Johnson, D.H. (1978) The use of fatty acid derivatives in cosmetics and toiletries. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 5(4), 438-443.
- Jones, I.D.; White, R.C.; Gibbs, E.; Butler, L.S.; Nelson, L.A. (1977) Experimental formation of zinc and copper complexes of chlorophyll derivatives in vegetable tissue by thermal processing. **J. Agric. Food Chem.** 25:149-153.
- Kawsar, S.M.A.; Fujii, Y.; Matsumoto, R.; Yasumitsu, H.; Ozeki, Y. (2011) Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization. **Phytologia Balcanica.** 17(3): 347-354.
- Khotimchenko, S.V.; Vaskovsky, V.E.; Titlyanova, T.V. (2002) Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of North California. **Botanica Marina.** 45: 17-22.
- Kim, M.J.; Kim, H. (2015) Anticancer effect of lycopene in gastric carcinogenesis. **J. Cancer Prev.** 20(2): 92-96.
- Kim, S.K.; Miyashita, K. Widjaja-Adhi, M.A.K.; Abe, M.; Hosokawa, M. (2011) Algal carotenoids as potent antioxidants. In: **Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology.** Cap. 24. John Wiley & Sons. pp.403-410.
- Knapp, H.R.; Melly, M.A. (1986) Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. **J. Infect. Dis.** 154(1): 84-94.
- Knothe, G. (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology.** 86(10): 1059-1070.
- Kostetsky, E.Y.; Naumenko, N.V.; Gerasimenko, N.I. (1983) Phospholipid composition of 13 species of

tunicates. **Biol. Morya.** 2: 51-56.

Kronik, MN (1986) The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. **J. Immunol. Methods.** 92(1): 1-13.

Kuddus, M.; Singh, P.; Thomas, G.; Al-Hazimi, A. (2013) Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. **BioMed Res. Int.** Article ID 742859, 9 pp.

Latscha, T. (1990) **Carotenoids: their nature and significance in animal foods.** F. Hoffmann-La Roche, Animal Nutrition and Health. Basel, Switzerland. 110p.

Le Jeune, H.; Joubert, Y.; Vilaume, C.; Fleurence, J. (2003) Propriétés et intérêt biotechnologique d'un pigment algal: la R-phycoérythrine. **Biofutur.** 236: 34-38.

Lebeau, T.; Robert, J.M. (2003a) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 60: 612-623.

Lebeau, T.; Robert, J.M. (2003b) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 60: 624-632.

Lee, R.F.; Hagen, W.; Kattner, G. (2006). Lipid storage in marine zooplankton. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.307, p.273-306.

Lee, R.E. (2008) **Phycology.** 4th. ed. Cambridge University Press. Cambridge.

Li, X.; Fan, X.; Han, L.; Lou, Q. (2002) Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. **Phytochemistry** 59: 157-161.

Liaaen-Jensen, S. (1998) Carotenoids in Food Chain. In **Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism.** Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.) Birkhäuser: Basel, Switzerland. Vol. 3. 359-371.

Lu, J.; Sheahan, C.; Fu, P.C. (2011) Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. **Energy Environ. Sci.** 4: 2451-2466.

Maeda, H.; Hosokawa, M.; Sashima, T.; Funayama, K.; Miyashita, K. (2005) Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 332 (2): 392-397.

Maoka, T. (2011) Carotenoids in marine animals. **Mar. Drugs** 9 (2): 278-293.

Mares-Perlman, J.A.; Millen, A.E.; Ficek, T.L. (2002) The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease, Overview, **Am. Soc. Nutr. Sci.** 132, 518S-524S.

Marsac, N.T. (2003) Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. **Photosynth. Res.** 76(1-3): 193-205.

Mason, W.T. (1999) **Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis.** 2nd. ed. Academic Press. 647p.

Matsuno, T. (2001) Aquatic animal carotenoids. **Fish. Sci.** 67: 771-789.

McKenzie, J.D.; Black, K.D.; Kelly, M.S.; Newton, L.C.; Handley, L.L.; Scrimgeour, C.M.; Raven, J.A.; Henderson, R.J. (2000) Comparisons of fatty acid and stable isotope ratios in symbiotic and non-symbiotic brittlestars from Oban Bay, Scotland. **J. Mar. Biol. Ass. UK** 80:311-320.

Misawa, N. (2010) Carotenoids. In: Mander, L.; Liu, H.W. (Eds.), **Comprehensive Natural Products. II Chemistry and Biology.** Vol. 1. Elsevier. Oxford. pp.733-753.

Mise, T.; Ueda, M.; Yasumoto, T. (2011) Production of fucoxanthin-rich powder from *Cladosiphon okamuranus*. **Adv. J. Food Sci. Technol.** 3:73-76.

Mishra, P.M.; Sree, A.; Panda, P.K. (2015). Fatty acids of marine sponges. In: Kim, K.E. (Ed.) **Springer Handbook of Marine Biotechnology.** Cap. 36. Springer Verlag Berlin. pp.851-868.

- Miyashita, K.; Nishikawa, S.; Beppu, F.; Tsukui, T.; Abe, M.; Hosokawa, M. (2011) The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. **J. Sci. Food Agric.** 91: 1166-1174.
- Mortensen, A. (2006) Carotenoids and other pigments as natural colorants. **Pure Appl. Chem.** 78(8): 1477-1491.
- Mozaffarian, D.; Rimm, E.B. (2006) Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. **JAMA**, 296(15): 1885-1899.
- Nakamura, S.; Ishii, N.; Nakashima, N.; Sakamoto, T.; Yuasa, H. (2017) Evaluation of sucrose fatty acid esters as lubricants in tablet manufacturing. **Chem Pharm Bull** 65(5): 432-441.
- Namitha, K.K.; Negi, P.S. (2010) Chemistry and biotechnology of carotenoids. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 50(8): 728-760.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2012) **Lehninger Principles of Biochemistry**, 6th. ed. W. H. Freeman. 1340p.
- Nichols, D.S. (2003) Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. **FEMS Microbiol. Lett.** 219:1.
- Oku, H.; Yamashiro, H.; Onaga, K.; Sakai, K.; Iwasaki, H. (2003). Seasonal changes in the content and composition of lipids in the coral *Goniastrea aspera*. **Coral Reefs**. 22, 83-85.
- Peng, J.; Larondelle, Y.; Pham, D.; Ackman, R.G.; Rollin, X. (2003) Polyunsaturated fatty acid profiles of whole body phospholipids and triacylglycerols in anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Comp. Biochem. Physiol.** Part B 134: 335-348.
- Peng, J.; Yuan, J.J.; Wu, C.F.; Wang, J.H. (2011) Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. **Mar. Drugs**. 9(10): 1806-1828
- Pereira, L. (2015) Seaweed Flora of the European North Atlantic and Mediterranean. In: Kim KE (Ed.) **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Cap. 6. Springer Verlag Berlin. pp.145-178.
- Raposo, M.F.J.; Morais, A.M.M.B.; Morais, R.M.S.C.; (2015) Carotenoids from marine microalgae: a valuable natural source for the prevention of chronic diseases. **Mar. Drugs**. 13(8): 5128-5155.
- Roberts, M.D.; Iosia, M.; Kerksick, C.M.; Taylor, L.W.; Campbell, B.; Wilborn, C.D.; Harvey, T.; Cooke, M.; Rasmussen. C.; Greenwood. M.; Wilson. R.; Jitomir. J.; Willoughby. D.; Kreider. R.B. (2007) Effects of arachidonic acid supplementation on training adaptations in resistance-trained males. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. 4: 21.
- Rodrigues-Amaya, D. (1999) **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, OMNI Research: ILSI Press: Washington D.C.
- Rogers, E.W.; Molinski. T.F. (2005) A cytotoxic carotenoid from the marine sponge *Prianos osiro*. **J. Nat. Prod.** 68: 450-452.
- Rohmer, M.; Bouvier, P.; Ourisson, G. (1979) Molecular evolution of biomembranes, structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. **Proc. Nat. Acad. Sci.** USA 76: 847-851.
- Sargent, J.R.; (1995) (n-3) polyunsaturated FA and farmed fish. In: Hamilton RJ, Rice RD (eds.). **Fish Oil: Technology, Nutrition and Marketing**. Barnes and Associates. Bucks. pp.67-94.
- Schiedt, K. (1998) Absorption and metabolism of carotenoids in birds, fish and crustaceans. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.) **Carotenoids Biosynthesis and Metabolism**. Birkhäuser, Basel, Switzerland. v.3, p.285-358.
- Schroeder, W.A.; Johnson, E.A. (1995) Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **J Biol Chem**. 270: 18374-18379.
- Schubert, N.; Garcia-Mendoza, E. (2006) Carotenoid composition of marine red algae. **J. Phycol.** 42:

1208-1216.

Sekar, S.; Chandramohan, M. (2008) Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **J. Appl. Phycol.** 20: 113-136.

Sidler, W.A. (1994) Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In: Bryant, D.A. (Eds). **The Molecular Biology of Cyanobacteria**. Kluwer Acad. Publication, Amsterdam. pp.139-216.

Soares, N.C.; Teodoro, A.J.; Lotsch, P.F.; Granjeiro, J.M.; Borojevic, R. (2015) Anticancer properties of carotenoids in prostate cancer. A review. **Histol. Histopathol.** 30(10): 1143-1154.

Sonania, R.R.; Singh, N.K.; Kumarc, J.; Thakara, D.; Madamwara, D. (2014) Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. **Process Biochemistry.** 49(10): 1757-1766.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2010) **Plant Physiology**. 5th. ed. Sinauer Associates, Inc. 782p.

Telford, W.G.; Moss, M.W.; Morseman, J.P.; Allnut, F.C. (2001) Cyanobacterial stabilized phycobilisomes as fluorochromes for extracellular antigen detection by flow cytometry. **J. Immunol. Meth.** 254(1-2): 13-30.

Thamaraiselvan, R.; Rajendran, P.; Nandakumar, N.; Balasubramanian, M.P.; Nishigaki, I. (2014) Cancer preventive efficacy of marine carotenoid fucoxanthin: cell cycle arrest and apoptosis. **Nutrients.** 5(12): 4978-4989.

Tushima, M.; Maoka, T.; Matsuno, T. (1989) Comparative biochemical studies of carotenoids in marine invertebrates. The first positive identification of  $\epsilon,\epsilon$ -carotene derivatives and isolation of two new carotenoids from chitons. **Comp. Biochem. Physiol.** 93B: 665-671.

VanGerpen, J. (2005) Biodiesel processing and production **Fuel Processing Technology.** 86(10): 1097-1107.

Vershinin, A. (1999) Biological functions of carotenoids – diversity and evolution. **BioFactors.** 10: 99-104.

Vilchez, C.; Forjan, E.; Cuaresma, M.; Bedmar, F.; Garbayo, I.; Vega, J.M. (2011) Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. **Mar. Drugs.** 9: 319-333.

Vogl, K.; Tank, M.; Orf, G.S. Blankenship RE, Bryant DA (2012) Bacteriochlorophyll f: properties of chlorosomes containing the “forbidden chlorophyll”. **Frontiers in Microbiology.** 3: art.298.

Wang, E.; Wink, M. (2016) Chlorophyll enhances oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* and extends its lifespan. **Peer J.** 4: e1879.

Weeks, W.W. (1986) Carotenoids: a source of flavor and aromas. In: Biogeneration of Aromas. ACS Symp. Ser. v.317, p.157-166. **Am. Chem. Soc.**, Washington DC.

Wen, Z.Y.; Chen, F. (2003) Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnol. Adv.** 21: 273-294.

Wilson, M.R.; Crowley, S.; Odgers, G.A.; Shaw, L. (1991) Immunofluorescent label in using covalently linked anti-Phycoerythrin antibodies and Phycoerythrin polymers. **Cytometry.** 12(4): 373-377.

Wissler, R.W.; Bethard, W.F.; Barker, P.; Mori, H.D. (1954) Effects of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (tween 20) upon gastrointestinal iron absorption in hamsters, **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 86(1): 170-177.

Yokoyama, M.; Origasa, H.; Matsuzaki, M.; Matsuzawa, Y.; Saito, Y.; Ishikawa, Y.; Oikawa, S.; Sasaki, J.; Hishida, H.; Itakura, H.; Kita, T.; Kitabatake, A.; Nakaya, N.; Sakata, T.; Shimada, Shirato, K. (2007) Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. **Lancet** 369(9567): 1090-1098.

Zhang, L.; Wang, H. (2015) Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin. **Mar Drugs** 13(7): 4310-4330.





# PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE ORGANISMOS MARINHOS: UM ENFOQUE ANTIMICROBIANO, ANTITUMORAL E ANTIVIRAL

Osmino Rodrigues Pires Júnior<sup>a</sup>  
Ana Carolina Martins Magalhães<sup>a</sup>  
Carlos José Correia de Santana<sup>a</sup>  
Mariana de Souza Castro<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade de Brasília

## RESUMO

Os organismos marinhos, ao longo da evolução, desenvolveram sofisticados mecanismos químicos, utilizados na comunicação, defesa, reprodução ou regulação da homeostase. Interessantemente, muitos desses compostos apresentam atividades biológicas, como agentes antitumorais, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunossupressores e neurotóxicos, ganhando especial atenção devido a sua potencial aplicação como ferramentas farmacológicas no campo do diagnóstico e da terapia de diversas doenças, como infecções, processos inflamatórios, distúrbios lipídicos, distúrbios imunomodulatórios, e no combate a vários tipos de câncer, atuando na divisão celular e no apoptose. De acordo com a literatura, a atividade citotóxica dos peptídeos não é mediada por interações entre receptores específicos, mas pela interação direta em sítios polares e não-polares em membranas citoplasmáticas bacterianas ou células tumorais, interferindo assim nos processos celulares, propagação e replicação. Muitos peptídeos antimicrobianos (PAMs) adotam uma estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice anfipática somente quando em contato com as membranas celulares, tornando-se ativos e perturbando a integridade da membrana, criando falhas ou formando poros. A carga positiva dos PAMs favorece uma maior interação com os fosfolípidios negativamente carregados (fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e cardiolipina) das membranas bacterianas/tumorais do que com fosfolípidios "zwitteriônicos" (neutros) presentes na face extracelular da membrana de células normais de mamíferos, dessa forma criando uma seletividade e consequentemente um potencial uso terapêutico. Este capítulo consiste em uma pequena revisão sobre alguns peptídeos já isolados e caracterizados de diversos organismos marinhos, com foco nas atividades antimicrobiana, antitumoral e antiviral.

## 1 | CIANOBACTÉRIA

Em termos gerais, organismos marinhos são uma interessante fonte de compostos citolíticos, sendo estes amplamente estudados para aplicação em diversas terapias. Dentre estes compostos citolíticos podemos destacar alguns peptídeos únicos em sua estrutura, pois apresentam aminoácidos não proteínogênicos ou resíduos de hidroxíácido, enquanto outros apresentam alterações pós-traducionais. Dentre estes destacamos os depsipeptídeos, peptídeos nos quais um ou mais de seus grupos amida,  $-C(O)NHR-$ , são substituídos pelo éster correspondente,  $-C(O)OR$ , ou mais geralmente, é uma molécula que possui ambas ligações peptídicas e éster na proximidade da mesma molécula, ou cadeia pequena contendo aminoácidos. Os depsipeptídeos são relativamente comuns estão se mostrando novas ferramentas terapêuticas para uso como antitumorais, antibacterianos e antivirais.

**Desmethoxymajusculamide C (DMMC)** é um depsipeptídeo cíclico isolado da cianobactéria *Lyngbya majuscula*, que promove a despolimerização da actina e mostrou-se potente e seletivo contra tumores sólidos. O DMMC foi testado em diversas linhagens de células cancerígenas humanas, entre elas o carcinoma colorretal (HCT116), carcinoma epitelial (H460), câncer de pulmão (H-125), adenocarcinoma mamário (MCF7), leucemia (CCRF-CEM), adenocarcinoma mamário metastático (MDA-MB-435), e também contra neuroblastoma murino (Neuro-2A). **Lagunamides A e B** são depsipeptídeos também isolados da cianobactéria *L. majuscula*, mostraram-se citotóxicos contra outras várias linhagens de células cancerígenas, incluindo leucemia murina (P388), adenocarcinoma pulmonar (A549), câncer de próstata (PC3), adenocarcinoma ileocecal coloretal (HCT8), carcinoma ovariano (SK-OV3), e adenocarcinoma de colon (HT-29).

**Apratoxina A** é outro depsipeptídeo isolado da cianobactéria marinha *L. majuscula* com ação contra linhagens de tumores de nasofaringe humana e colorretal humano em concentrações subnanomolares. A apratoxina A é o primeiro agente antitumoral identificado que inibe a via de secreção celular devido à prevenção da N-glicosilação de receptores tirosina-quinases associados ao câncer e proteínas secretoras (por exemplo, fator de crescimento e citocinas) a partir do citoplasma para o retículo endoplasmático, onde passam por rápida degradação proteossômica.

## 2 | PORÍFEROS

**Papuamida A** é um depsipeptídeo cíclico isolado das espécies *Theonella mirabilis* e *T. swinhoei*, que protege células de leucemia linfoblástica aguda em cultura contra a infecção pelo HIV-1 *in vitro*. A papuamida A inibe a entrada do vírus HIV, e apesar de não conhecermos os mecanismos, sabe-se que essa inibição não ocorre devido à ligação nos receptores de reconhe-

cimento célula-vírus. A papuamida A também é capaz de inibir o vírus da estomatite vesicular e vírus da leucemia murina anfortrópica, sugerindo que o mecanismo de inibição não é HIV-1 específico, e que possivelmente a atividade virucida está relacionada com a interação da papuamida diretamente com o vírus.

Da esponja *Homophymia* sp. foram isolados e caracterizados nove depsipeptídeos que foram denominados de **homofiminas**, os quais apresentaram potente atividade citotóxica contra uma variedade de linhagens de células de câncer humano, como carcinoma de próstata (PC3) e ovariano (SK-OV3).

**Stilopeptideo 2** é um ciclodecapeptídeo rico em prolina que foi isolado a partir de um extrato citotóxico da esponja marinha *Stylotella* sp., de Papua Nova Guiné. Apresenta atividade contra as células de leucemia linfocítica (P388). **Yaku'amidas A e B** foram isolados a partir da esponja marinha *Ceratopsis* sp., apresentando efeito inibidor sobre o crescimento de várias linhagens de células de câncer humano.

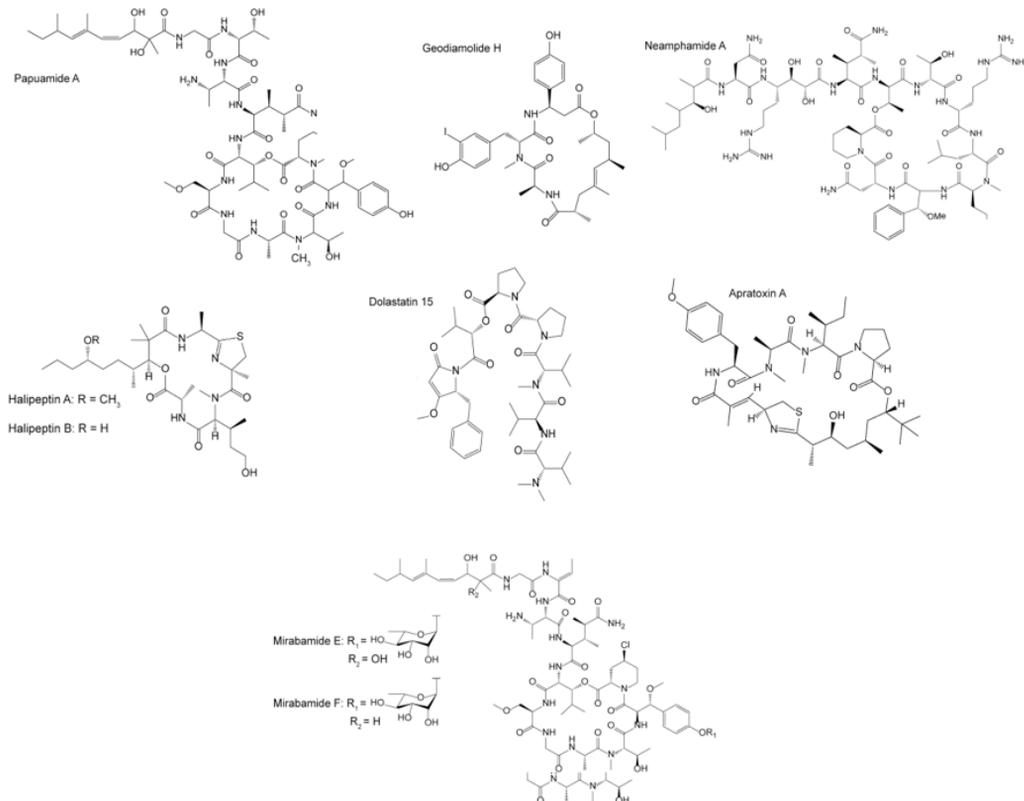
**Geodiamolida H**, isolada de uma esponja brasileira, *Geodia corticostylifera*, demonstrou atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama (Hs578T), alterando o citoesqueleto de actina. Interessantemente linhagens celulares normais não foram afetadas pelo tratamento com o geodiamolide H.

**Discoderminas** são tetradecapeptídeos citotóxicos obtidos a partir de esponjas do gênero *Discodermia* sp., contendo 13-14 aminoácidos. Os peptídeos denominados de **discoderminas A a H** foram efetivos na inibição da proliferação de linhagens celulares de câncer de pulmão humano (A549) e leucemia murina (P388). **Mirabamidas**, isoladas da esponja Siliquariaspongia mirabilis, apresentaram atividade anti-HIV-1 nas cepas virais HXB2 e SF162, inibindo a fusão do HIV com a membrana celular, presumivelmente por meio de interações com as glicoproteínas do envelope do HIV-1. **Neamphamide A**, depsipeptídeo isolado da esponja marinha *Neamphius huxley*, exibiu potente atividade citoprotetora contra a infecção pelo HIV-1 em células 12-CEM-SS (leucemia linfoblástica) em dose subnanomolar, com baixa citotoxicidade para as células hospedeiras.

**Halipectinas** foram isoladas da esponja marinha *Haliclona* sp. Apresentam propriedades anti-inflamatórias, que foram demonstradas através da inibição dose-dependente do edema induzido em pata de rato por injeção subplatar de carragenina um modelo amplamente usado em estudos que visam à descoberta de novas moléculas anti-inflamatórias.

## 3 | CNIDÁRIOS

A maioria dos trabalhos que envolvem isolamento e caracterização de peptídeos ativos de cnidários são realizados a partir da peçonha, sendo o foco em peptídeos com a atividade bloqueadora/moduladora de canais iônicos. Todavia, neste capítulo destacamos o isolamento de alguns peptídeos antimicrobianos isolados não só da peçonha, mas também da mesogleia,



**Figura 1.** Estrutura de alguns depsipeptídeos identificados de organismos marinhos.

uma camada gelatinosa situada entre a epiderme e a gastroderme das espécies desse filo.

Destacamos um peptídeo de 40 resíduos de aminoácidos, denominado aurelina, que foi isolado a partir da mesogleia da medusa *Aurelia aurita*, e exibiu atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Da anêmona-do-mar *Stichodactyla helianthus* foram isoladas a **sticolisina I e II (Delta-stichotoxin)**, duas citolisinas formadoras de poros que apresentam atividade hemolítica, neuro- e cardiotoxica.

No tentáculo de *Anemonia sulcata* foi isolado um peptídeo com atividade antibacteriana contra *Micrococcus lysodeikticus*. Sua sequência de aminoácidos revelou identidade com a **anemoniatoxina 2 (ATX-II, Delta-actitoxin-Avd1c)**, uma toxina bloqueadora de canal sódio voltagem-dependente. Consequentemente, a ATX-II parece ter um duplo papel como toxina e como antibacteriano.

**Ueq 12-1** é um peptídeo que apresenta atividade antibacteriana moderada contra bactérias Gram-positivas. Foi isolado e caracterizado a partir da anêmona do mar *Urticina eques*, este peptídeo apresenta 45 aminoácidos incluindo 10 resíduos de cisteína com uma distribuição incomum e representa um novo grupo de peptídeos de anêmona do mar sendo similar a uma defensina. Do extrato bruto do coral *Phyllogorgia dilatata* foi isolado um peptídeo capaz de inibir o desenvolvimento do *S. aureus*, o **Pd-AMP1**, cuja a sequência N-terminal não apresentou correspondência significativa com nenhum peptídeo descrito.

## 4 | MOLUSCOS

Células sanguíneas ou hemócitos são componentes celulares que medeiam a imunidade dos invertebrados. Eles flutuam no fluido interno ou hemolinfa em que os órgãos são imersos. Consequentemente, os hemócitos viajam amplamente na cavidade do corpo, oferecendo ampla oportunidade para encontrar e combater agentes patogênicos. Três peptídeos catiônicos denominados **myticinas A, B, e C** foram purificados a partir de extratos de hemócitos do mexilhão *Mytilus galloprovincialis*. As três isoformas apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, enquanto apenas a isoforma B é ativa contra o fungo *Fusarium oxysporum* e uma bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* D31.

Outros peptídeos denominados **mytilinas** foram isolados a partir da hemolinfa de mexilhões *Mytilus edulis*. Esses peptídeos, ricos em cisteína, apresentam 34 resíduos de aminoácidos e um potente espectro de atividade bactericida contra uma variedade de estirpes. No ensaio de inibição do crescimento, a mytilina A mostrou notória atividade contra as seguintes estirpes Gram-positivas: *Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium* e *Micrococcus luteus*; *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. **Mytilina A** teve um efeito semelhante nas duas estirpes Gram-negativas *E. coli* D31 e *E. coli* D22 e também afetou as espécies marinhas *Alteromonas carrageenovora*, *Pseudomonas alginovora* e *Cytophaga drobachiensis*. As outras cepas testadas (*E. coli* 1106 e *Salmonella typhimurium*) não foram afetadas, mesmo na maior concentração testada.

Uma nova lectina de ovos de *Aplysia dactylomela* foi isolada. Essa proteína consiste em 217 resíduos de aminoácidos, e foi capaz de aglutinar e inibir o crescimento de *S. aureus*, sugerindo que essa lectina pode ser uma alternativa ao uso convencional de agentes antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por biofilmes estafilocócicos.

Peptídeos com atividade antitumoral também foram encontrados em moluscos, entre os quais merecem destaque as dolastatinas, peptídeos isolados a partir da lebre-marinha *Dollabella auricularia*. A **dolastatina 10** é um peptídeo linear que na época da sua descoberta foi considerado como uma promessa no combate ao câncer, haja vista sua ação sem precedentes. As dolastatinas são potentes compostos antineoplásicos que atuam em doses picomolares e são efetivas contra um grande número de linhagens tumorais. Sua atividade antimitótica é resultante da ação inibitória na formação do microtúbulo e na inibição da hidrólise de GTP dependente de tubulina.

Na fase I dos ensaios clínicos, foi testada para tratamento de cânceres de mama e fígado, tumores sólidos e leucemia. Contudo, as dolastatinas, apesar de sua notável ação *in vitro*, não são tão eficientes quando testada *in vivo*. A dolastatina 10 não se mostrou eficaz para testes com humanos e não progrediu para a fase II, todavia sua estrutura primária serviu de modelo para a síntese de outros derivados ou formulações antitumorais.

A dolastatina 15, um depsi-peptídeo constituído de sete resíduos de aminoácidos, estruturalmente relacionado à dolastatina 10, promove a inibição da divisão celular através da inibição da polimerização dos microtúbulos, consequentemente afetando o fuso mitótico. A dolastatina 15 promove a indução de apoptose em diferentes linhagens de mieloma humano (RPMI8226,

U266 e IM9), através de duas vias mitocondriais diferentes: ativação das caspases-3 e 9; e aumentando a expressão de Bax, consequentemente a perda do potencial de membrana mitocondrial.

O **Kahalalide F** é um depsipeptídeo encontrado no molusco *Elysia rufescens* e em macroalgas do gênero *Bryopsis* spp., da qual ele se alimenta. Kahalalide F apresentou ação citotóxica para diversas linhagens tumorais de mama, hepático e de pulmão de células não-pequenas. Sua ação ocorre na membrana celular, sugerindo uma interação específica com componentes da membrana. Kahalalide F é um bom candidato como modelo para desenhos de medicamentos que visam explorar o potencial de seletividade celular.

## 5 | ANELÍDEOS

Dois novos peptídeos antimicrobianos com 21 resíduos de aminoácidos, **arenicina-1** e **arenicina-2**, foram isolados dos celomócitos de poliquetas marinhas da espécie *Arenicola marina*. Estes PAMs exibiram atividade contra bactérias Gram-positiva *Listeria monocytogenes* (linhagem EGD), Gram-negativa *E. coli* (linhagem ML-35p) e o fungo *Candida albicans*. As arenicinas possuem uma única ligação dissulfeto Cys3-Cys20, formando um anel de 18 resíduos de aminoácidos, e não possuem homologia de sequência com nenhum PAM previamente identificado.

Outro peptídeo antimicrobiano, denominado hedistina, foi identificado a partir dos celomócitos do anelídeo marinho *Nereis diversicolor*. A **hedistina** não mostra semelhanças com outros peptídeos conhecidos e constitui o primeiro peptídeo antimicrobiano contendo bromotriptofanos. A hedistina possui atividade contra um amplo espectro de bactérias, incluindo *S. aureus* e *Vibrio alginolyticus* resistentes à metilicina.

## 6 | ARTRÓPODES

Crustáceos compõem um grande, antigo e diversificado grupo de animais que inclui muitos membros conhecidos e explorados comercialmente. O seu hábitat natural é normalmente diversificado em organismos infecciosos, tais como vírus, bactérias, fungos e outros parasitas. Seu sucesso evolutivo confirma as estratégias eficientes que utilizam para a sobrevivência. Os crustáceos não apresentam um sistema imunitário adaptativo e altamente específico como os dos vertebrados, e sim um sistema inato, rápido e eficiente contra micro-organismos, baseado em peptídeos antimicrobianos encontrados em sua hemolinfa e/ou hemócitos.

Essas moléculas têm um peso molecular baixo (menos de 10 kDa) e, geralmente, formam poros nas membranas. Esses peptídeos possuem uma estrutura anfipática, que facilita sua capacidade de anexar, desestabilizar e/ou penetrar na membrana citoplasmática de micro-organismos.

Historicamente, **bac-like** é o primeiro peptídeo antimicrobiano parcialmente caracteri-

zado em crustáceos. É um peptídeo rico em prolina/arginina (ou rico em PRP) isolado de hemócitos de *Carcinus maenas*. Infelizmente o bac-like não tem a sua sequência completa elucidada, todavia sua sequência parcial compartilha semelhanças com as **peneidinas**, uma família de peptídeos antimicrobianos encontrada exclusivamente em camarões.

**Callinectina** é um peptídeo rico em PRP isolado a partir dos hemócitos do caranguejo-azul *Callinectes sapidu*. A sequência N-terminal parcialmente caracterizada da callinectina não mostrou homologia significativa com qualquer outro peptídeo antimicrobiano conhecido. Esse novo peptídeo catiônico foi testado apenas contra *E. coli* D31, e falta informação sobre a sua sequência completa e espectro de atividade antimicrobiana.

Peptídeos **defensin-like** foram identificados na lagosta japonesa *Panulirus japonicus* usando uma abordagem de TAG de sequência expressa (EST). Nessa espécie, foram detectadas duas isoformas diferentes, *Panulirus japonicus* Defensin 1 e 2 (PJD1 e PJD2) no tecido cardíaco, brânquias e hepatopâncreas e hemócitos. Ambas as isoformas possuem um peptídeo sinal (N-terminal) e um domínio (C-terminal) semelhante à defensina, contudo o padrão de cisteína encontrado é distinto das defensinas de outros invertebrados, mas idêntico ao de defensinas encontradas em vertebrados. Infelizmente, essas defensinas são meramente consideradas "antimicrobianos putativos", pois o seu espectro de atividade antimicrobiana ainda não foi determinado.

A **scygonadina** é um peptídeo antimicrobiano aniônico, originalmente purificado a partir do plasma seminal do caranguejo de lama *Scylla serrata*. Mostrou apenas atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas *Micrococcus luteus*. Posteriormente, um homólogo de scygonadina, denominado SSAP (sigla em inglês para proteína antimicrobiana de *S. serrata*), foi purificado a partir de hemócitos granulares da mesma espécie de caranguejo. SSAP mostrou atividade antibacteriana principalmente contra bactérias Gram-positivas: *M. luteus*, *Streptococcus pyogenes* e *S. aureus*, mas não contra fungos filamentosos e leveduras.

As **peneidinas** são, sem dúvida, a família mais bem caracterizada de peptídeos antimicrobianos descritos até o momento para crustáceos. São peptídeos catiônicos quiméricos compostos por um domínio não estruturado rico em PRP N-terminal e uma região C-terminal contendo seis resíduos de cisteína que estão envolvidos em três pontes dissulfeto intramoleculares. Interessantemente, o domínio N-terminal partilha elevada semelhança de sequências com peptídeos ricos em PRP, em particular com bac-like de caranguejo. Por outro lado, o domínio C-terminal rico em cisteína não corresponde a quaisquer outros "motivos de cisteína" previamente descritos em PAMs contendo cisteína. As peneidinas foram originalmente isoladas da hemolinfa do camarão-branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* e parecem ser restritas apenas à família Penaeidae.

Esses peptídeos demonstraram ser particularmente eficazes contra bactérias Gram-positivas *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, e fungos filamentosos (*Fusarium*, *Nectria*, *Alternaria*, *Neurospora*, *Botrytis*, *Penicillium*), mas pouco ativo ou não ativo contra bactérias Gram-negativas e *Vibrio* marinhos. Curiosamente, além de suas propriedades antimicrobianas, as peneidinas também são capazes de se ligar à quitina. A região de ligação à quitina é o domínio rico em cisteína, enquanto o domínio rico em PRP está preferencialmente envolvido com as atividades antimicrobianas. Sugere-se que a ligação à quitina das peneidinas poderia

ter funções adicionais, tais como a capacidade de se ligar à carapaça de camarão após lesão e participar na cicatrização de feridas.

**Crustinas** são definidas como peptídeos antibacterianos catiônicos multidomínio contendo um domínio de proteína ácida na região C-terminal. A primeira crustina identificada, purificada a partir dos hemócitos granulares do caranguejo de costa *Carcinus maenas*, exibe atividade específica para bactérias Gram-positivas dos gêneros *Micrococcus*, *Aerococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Bacillus*. Desde a sua primeira identificação, mais de 50 sequências em diversas espécies de crustáceos, incluindo lagostins, camarões marinhos e de água doce, caranguejos e lagostas, e também em crustáceos não decápodes, como anfípodes, foram identificadas através de abordagens baseadas em EST.

**Hyastatina** é um peptídeo antimicrobiano multidomínio que foi purificado e caracterizado a partir dos hemócitos do caranguejo-aranha *Hyas araneus*. Esse peptídeo antimicrobiano é composto por um notável domínio N-terminal rico em glicina, uma porção curta contendo PRP e uma região C-terminal com seis resíduos de cisteína. O domínio rico em glicina consiste em cerca de 27% de resíduos de glicina e é muito semelhante ao de algumas crustinas. Por outro lado, ambos os domínios contendo PRP e cisteína são comparáveis a outros PAMs de crustáceos. O arranjo dos seis resíduos de cisteína da hyastatina é idêntico ao padrão de cisteína encontrado em peneidinas, além disso a hyastatina também tem a capacidade de ligação à quitina tal como descrito para as peneidinas. A hyastatina foi testada contra um número reduzido de espécies de micro-organismos, mas mostrou um amplo espectro de atividade. É capaz de inibir o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans*, bactérias Gram-positiva *Corynebacterium glutamicum* e bactérias Gram-negativa *E. coli*, diferenciando-se assim das peneidinas e crustinas que possuem uma atividade antimicrobiana mais restrita para as bactérias Gram-positivas.

**Arasinas** são peptídeos catiônicos que foram também isolados de hemócitos de *Hyas araneus*. Esses peptídeos contêm uma sequência com 25 resíduos de aminoácidos, com a região N-terminal rica em PRP linear e a porção C-terminal contendo quatro resíduos de cisteína formando duas ligações dissulfeto. O motivo PRP N-terminal é semelhante aos PAMs de crustáceos, tais como Bac-like. A **arasina 1** foi testada apenas contra algumas espécies de micro-organismos e exibiu atividade contra Gram-positivo *C. glutamicum* e Gram-negativos *Listonella anguillarum* e *E. coli*. A **arasina 2** foi apenas identificada através de biblioteca de cDNA de hemócitos, e o seu espectro de atividade antimicrobiana ainda não foi determinado.

Um peptídeo catiônico, designado **taquiplesina**, foi isolado de extratos ácidos de restos de hemócitos de caranguejo-ferradura (*Tachypleus tridentatus*), consiste em 17 resíduos de aminoácidos. A taquiplesina inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas de várias linhagens de *Salmonella typhimurium*, *S. minnesota* e *E. coli*, e de Gram-positiva *S. aureus*. Acredita-se que a taquiplesina forme um complexo com lipopolissacarídeo bacteriano.

Somente poucas espécies de equinodermos causam acidentes em humanos, em consequência são poucos os estudos toxicológicos desse grupo. São poucas as toxinas já caracterizadas de pedicelos, o aparelho peçonhento de ouriços-do-mar. Porém, assim como os crustáceos, os ouriços-do-mar possuem um sistema imune inato e são considerados como uma fonte potencial para a descoberta de novos peptídeos antimicrobianos. Dois peptídeos antibacterianos foram isolados a partir de extratos de celomócitos de *Strongylocentrotus purpuratus*. As **estrongilocinas** são peptídeos catiônicos, *defensin-like* (ricos em cisteína), mas não mostram nenhuma semelhança com outros PAMs conhecidos no que diz respeito ao padrão de distribuição de cisteínas. Esses peptídeos apresentam potente atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Também de extratos de celomócitos do ouriço-do-mar verde *Strongylocentrotus droebachiensis* foram purificadas as **centrocinas 1 e 2**. Esses peptídeos catiônicos têm potente atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As centrocinas possuem uma estrutura heterodimérica, contendo uma cadeia pesada (30 aminoácidos) e uma cadeia leve (12 aminoácidos).

## 8 | TUNICADOS

Recentemente as ascídias têm ocupado um lugar de destaque no que diz respeito à prospecção de compostos biologicamente ativos, pois estudos têm demonstrado que elas podem produzir compostos antitumorais centenas de milhares de vezes mais potentes do que qualquer coquetel anticâncer em uso. Destacamos as **didemninias A, B e C**, descobertas no início da década de 80, são depsipeptídeos cíclicos obtidos a partir de *Trididemnum solidum*, um tunicado caribenho da família Didemnidae. As didemninias apresentaram grande eficácia contra uma variedade de vírus: *Herpes simplex* vírus tipo 1 e 2, *Coxsackie A-21* vírus e *Equine rhinovirus*. Também foram capazes de diminuir significativamente as lesões do herpes vírus no tratamento tópico em ratos, além de apresentar atividade antitumoral. As didemninias A e B atuam inibindo a síntese proteica, e foi constatado que a didemnina B era mais letal para células cancerosas do que para células normais. Didemnina B foi o primeiro componente de origem marinha a entrar em testes clínicos como agente antineoplásico pelo *National Cancer Institute*, mas, após mais de dez anos de testes clínicos para uma grande quantidade de cânceres, os resultados foram desanimadores, devido aos efeitos tóxicos, e os testes foram interrompidos na fase II.

**Aplidina** é um ciclodepsipeptídeo isolado do tunicado *Aplidium albicans*, que tem mostrado atividade antitumoral sobre várias linhagens de câncer humano, tais como câncer de mama, melanoma e pulmão, interessantemente sensíveis a baixas concentrações desse composto. O modo de ação da aplidina envolve várias vias, incluindo a interrupção do ciclo celular e inibição da síntese proteica, assim induzindo a apoptose. Além disso, a aplidina possui um mecanismo único e diferencial de citotoxicidade, que envolve a inibição da ornitina descarboxilase, uma enzima que é crítica no processo de formação e crescimento do tumor. Aplidina inibe também a expressão do gene do fator de crescimento vascular endotelial, tendo efeitos

antiangiogênicos.

**Molamida** é um ciclodepsipeptídeo obtido a partir da ascídia *Didemnum molle*. Demonstrou citotoxicidade contra várias linhagens celulares, como leucemia murina P388, carcinoma de pulmão humano (A549) e de cólon humano (HT29).

Além de peptídeos antitumorais, diferentes espécies de tunicados sintetizam peptídeos antimicrobianos como importantes moléculas efetoras do sistema imune inato. Dos hemócitos da ascídia *Styela clava*, foram isolados quatro peptídeos antimicrobianos helicoidais, denominados **clavanina A, B, C e D**. Cada clavanina contém 23 resíduos de aminoácidos e são amidadas na região C-terminal. Em baixas concentrações, a clavanina A foi capaz de diminuir a viabilidade das bactérias Gram-negativa *E. coli* e Gram-positiva *L. monocytogenes*, e do fungo *C. albicans*.

Clonado a partir de uma biblioteca de cDNA de tecidos faríngeos da ascídia *Styela clava*, a **clavaspirina** é um peptídeo amidado, rico em histidina, de 23 resíduos. Assim como a clavanina, a clavaspirina também demonstrou-se capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram-negativa *E. coli* e Gram-positiva *L. monocytogenes*, e do fungo *C. albicans*. Além da atividade antimicrobiana, apresenta efeito hemolítico sobre eritrócitos humanos e bovinos.

O peptídeo antimicrobiano **dicynthaurina** foi isolado de hemócitos do tunicado *Halocynthia aurantium*. Na realidade, dicynthaurina é um dímero composto por dois monômeros de 30 resíduos de aminoácidos sem homologia de sequência com quaisquer peptídeos identificados. Os monômeros são amidados na região C-terminal e ligam-se covalentemente por uma única ligação dissulfureto de cisteína. A atividade de amplo espectro da dicynthaurina incluiu bactérias Gram-positivas (*M. luteus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) e Gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), mas não tem atividade contra o fungo *C. albicans*.

**Halocitina** e **papillosina** são dois peptídeos antimicrobianos isolados e caracterizados a partir de hemócitos de *Halocynthia papillosa*. Apresentam 26 e 34 resíduos de aminoácidos, respectivamente, e suas estruturas primárias não se assemelham com nenhum PAM conhecido.

Essas moléculas exibem ampla atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium* e *S. aureus*, e Gram-negativas *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella thyphimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *E. coli*.

## 9 | VERTEBRADOS

Os peptídeos anfipáticos alfa-helicoidais são muito comuns em peixes. A primeira família de PAM em peixes a ser descoberta foi a **pardaxina**, isolada a partir das glândulas cutâneas de pele de um linguado do Mar Vermelho, *Pardachirus marmoratus*. A pardaxina apresenta atividade antibacteriana, pois forma poros na membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

**Pleurocidinas** são peptídeos de 25 resíduos de aminoácidos isolados primeiro do muco da pele de outro linguado, *Pleuronectes americanus*. As pleurocidinas são antimicrobianos de

amplo espectro e inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas.

**Piscidinas** são pequenos peptídeos de 22 resíduos de aminoácidos que foram primeiramente purificados da pele e das brânquias do robalo *Morone saxatilis*, contudo mais recentemente descobriu-se que esse antimicrobiano está presente em outros perciformes.

Existe pouca informação disponível a respeito de peptídeos antimicrobianos nativos isolados de peixes. Encontramos as **dicentracinas** no robalo europeu, *Dicentrarchus labrax*, as **crisofisinas** no sargo vermelho, *Chrysophrys major*, e a **epinecidina** da garoupa-manchada, *Epinephelus coioides*. Todos esses PAMs mostraram atividade antimicrobiana de amplo espectro, provavelmente formando poros na membrana das bactérias.

Apesar da pouca informação, podemos destacar a utilização de metodologias de biologia molecular, em que foram identificados genes codificadores de catelicidina, uma família de peptídeos antimicrobianos comum em vertebrados, no salmão atlântico, *Salmo salar*, no peixe do ártico *Salvelinus alpinus*, no bacalhau *Gadus morhua* e peixes agnatos como a feiticeira *Myxine glutinosa*.

## 10 | CONCLUSÃO

A vida marinha é extremamente diversa em forma e fisiologia para adaptações em diversos ambientes, em estratégias de captura de presa ou de defesa contra predadores. Nesses milhares de anos de evolução, diversas moléculas surgiram e também evoluíram. E só mais recentemente, nestas últimas três décadas, em paralelo com o avanço tecnológico, estamos vivenciando cada vez mais o isolamento e caracterização de compostos bioativos. Com a crescente demanda de moléculas com atividade antibacteriana e antitumoral, não é impertinente dizer que o ambiente marinho talvez seja o ambiente mais importante na bioprospecção de novos compostos farmacologicamente ativos. Neste capítulo destacamos alguns exemplos de peptídeos antibacterianos, antitumorais e antivirais isolados de vários grupos marinhos que apresentam potencial terapêutico.

**Tabela 1.** Peptídeos de origem marinha que apresentam atividade antibacteriana, antitumoral e antiviral.

PHYLLUM	NOME DO PEPTÍDEO	SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS	ENTRADA WWW. UNIPROT. ORG	ESPÉCIE	ATIVIDADE
	Aurelina	AACSDRAHGHICESFKSFCKDSGRNG VKLRANCKKTCGLC	Q0MWV8	<i>Aurelia aurita</i>	Antibacteriana
Cnidaria	Sticolisina I	ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLLEELGKVS RKIAVGIDNESGGTWTALNAYFRSGTTD VILPEFVPNTKALLYSGRKDTGPVATGAVAA FAYYMSSGNTLGVMFVFPDYNWYSNW WDVKIYSGKRRADQGMIEDLYGNPYRGD NGWHEKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKM QIKISR	P07845	<i>Stichodactyla helianthus</i>	hemolítica, neuro- e cardiotoxica

PHYLLUM	NOME DO PEPTÍDEO	SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS	ENTRADA WWW.UNIPROT.ORG	ESPÉCIE	ATIVIDADE
Cnidaria	Sticolisina II	SELAGTIIDGASLTFEVLDKVLGELGKVS RKIAVGDIDNESGGTWTALNAYFRSGTTD VILPEVVPNTKALLYSGRKSSGPVATGAVAA FAYYMSNGNTLGMFMSVFPFDYNWYSNWWD VKIYPGKRADQQGMEDMYGPNPYRGDNG WYQKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR	P81662	<i>Stichodactyla helianthus</i>	hemolítica, neuro- e cardiotóxica
	Anemoni-atóxina 2 (ATX-II)	GVPCLCDSDGSPVSRGNTLSGIIWLAGCPSG WHNCKKHGPTIGWCKQ	P01528	<i>Anemonia sulcata</i>	bloqueadora de canal sódio volta-gem-dependente, antibacteriano
	Ueq 12-1	CYPGQPGCGHCSRPNYCEGARCESGFHD CGSDHWCDASGDRCCCA	C0HK26	<i>Urticina eques</i>	Antibacteriano
Molusco	Mytilina A	GCASRCKAKCAGRRCKGWASASFRGRYCK CFRC	P81612	<i>Mytilus edulis</i>	Antibacteriano
	Mytilina B	SCASRCKGHCRARRCGYYVSVLYRGRYCK CLRC	P81613	<i>Mytilus edulis</i>	Antibacteriano e antifúngico
	Lectina	DPDKCKTIRVESWSYKYAEKVEDASYVL MTVVDRQSAAACTLGESFGYQATLWVD HGCRADFKVCYLPVMPTECQTLRVESWN YKYAEKVVEGAALFINMTVEDRQSEASCD LDKSFQFYNQNSTVWVNHGCRADFNICY LKGAVTTSTINVSSWNYQYATKVLPAAS CIYSMRVVNQQAAPCTLGTTYGFVANT MWVDDGCRADFKPSYSP	C0HK25	<i>Aplysia dactylomela</i>	Antibacteriano
Annelida	Arenicina 1	RWCYVAYVRVGRVLRVYRRCW	Q5SC60	<i>Arenicola marina</i>	Antibacteriano e antifúngico
	Arenicina 2	RWCYVAYVRIRGVLVYRRCW	Q5SC59	<i>Arenicola marina</i>	Antibacteriano e antifúngico
	Hedistina	LVKCEAGSKISDAKRVEDGEFGDAIK TLRDLQORDAKPKQKRLGAWLAGKVAGTVAT YAWNRYVGRSVDSDQVNNDFIRKLRMQM RERKNMK	Q1PG44	<i>Nereis diversicolor</i>	Antibacteriano
Arthropoda (Crustacea)	Scygonadina	MRSSLLGLTVVLLGVVPPMAGQALNKLMP KIVSAIIYMGQPNAVGTFLGHQCLVESTROP DGFYAKMŞCASWTHDNPIVGEGRSRVELE ALKGSITNFVQTASNYKKFTIDEVEDWIASY	Q5D710	<i>Scylla serrata</i>	Antibacteriano
	Taquiplesina 1	KWCFRVCYRG ICYRRCR	P69136	<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>	Antibacteriano
	Peneidina 3	MRLVVCLVFLASFALVCQGGVYKGGYTRP IPRPPFVRPLPGGPIGPNYNGCPVSCRGIS FSQARSCSRLGRCHVGKGYSG	P81058	<i>Litopenaeus vannamei</i> ( <i>Penaeus vannamei</i> )	Antibacteriano e antifúngico

PHYLLUM	NOME DO PEPTÍDEO	SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS	ENTRADA WWW. UNIPROT. ORG	ESPÉCIE	ATIVIDADE
Equino-dermata	Estrongi-locina 1a	APLDADNDEEMEEIFGSIYHRKCV VKNRCETVSGHKTKDLTCCR AVIFRHERPEVCRPQ	B5LAH8	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Antibacteriano
	Centroci-na 1a	KDFEEQDALLDALLNMMLPEEVASPD DAVALQGWFKTFHKVSHAVKSGI HAGQRGCSALGFSPEEARVKILTAIPE MREEDLSEEDLRGACAAHALGR	D8WN02	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Antibacteriano
	Centroci-na 2	KNFEEQDALLDALLNMMLSEEAASP DAVALQSWFSRTVHNVGNAVRKGI HAGQGVCSGLGLSPEEARVKILSAVPE MREEDLSEEDLRGACAAHALGR	D8WN04	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Antibacteriano
Chordata, Subphylum Vertebrata  Classe Peixes	Pardaxi-na 1	GFFALIPGIE	P81863	<i>Linguado Pardachirus marmoratus (Achirus marmoratus)</i>	antibacteriano
	Pleurocid-ina	GWGSFFKKAHVGVGKAALTHYL	P81941	<i>Linguado Pseudopleuronectes americanus (Pleuronectes americanus)</i>	Antibacteriano, inibem a síntese de DNA
	Piscidi-na 4	FFRHLFRGAKAIFRGARQGWRAHKV VSRYNRNDVPETDNNQEEPYNQR	E3UVF6	<i>Morone chrysops / Morone saxatilis</i>	antibacteriano

## REFERÊNCIAS

Alves de Lima, L.; Migliolo, L.; Barreiro e Castro, C.; de Oliveira Pires, D.; López-Abarrategui, C.; Ferreira Goncalves, E.; ... & Campos Dias, S. (2013). Identification of a novel antimicrobial peptide from Brazilian coast coral *Phyllogorgia dilatata*. **Protein Pept. Lett.** 20(10), 1153-1158.

Andavan, G.; Lemmens-Gruber, R. (2010) Cyclodepsipeptides from marine sponges: Natural agents for drug research. **Mar. Drugs.** 8, 810-834.

Andjelic, C.; Planelles, V.; Barrows, L. (2008). Characterizing the anti-HIV activity of papuamide A. **Mar. drugs.** 6(4), 528-549.

Aneiros, A.; Garcia, I.; Martinez, J.R.; Harvey, A.L.; Anderson, A.J.; Marshall, D.L.; Engstrom, A.; Hellman, U.; Karlsson, E. (1993) A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. **Biochim. Biophys. Acta.** 1157(1), 86-92.

Antony, S.P.; Bright Singh, I.S.; Philip, R. (2010) Molecular characterization of a crustin-like, putative antimicrobial peptide, Fi-crustin, from the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. **Fish Shellfish Immunol.** 28: 216-220.

Armand, J.-V.; Ady-Vago, N.; Faivre, S. (2001) Phase I and pharmacokinetic study of Aplidine (apl) given

as a 24-hour continuous infusion every other week (q2w) in patients (pts) with solid tumor (st) and lymphoma (NHL). In **Proceedings of 2001 ASCO Annual Meeting; American Society of Clinical Oncology**: San Francisco, CA, USA.

Auerbach, P.S. (1984) Hazardous marine animals. **Emerg. Med. Clin. North. Am.**, 2(3), 531-544.

Bartlett, T.C.; Cuthbertson, B.J.; Shepard, E.F.; Chapman, R.W.; Gross, P.S.; Warr, G.W. (2002) Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Mar. Biotechnol.** (NY) 4: 278-293.

Battison, A.L.; Summerfield, R.; Patrzykat, A. (2008) Isolation and characterization of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*. **Fish Shellfish Immunol.** 25: 181-187.

Becker, S.; Terlau, H. (2008) Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 79(1), 1-9.

Benvenuto, J.A.; Newman, R.A.; Bignami, G.S.; Raybould, T.J.; Raber, M.; Nesparza, L.; Walters, R.S. (1992) Phase II clinical and pharmacological study of didemnin B in patients with metastatic breast cancer. **Invest. New Drugs.** 10, 113-117.

Beress, L.; Beress, R. (1975) Purification of three polypeptides with neuro- and cardiotoxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*. **Toxicon.** 13(5), 359-367.

Bhatnagar, I.; Kim, S. (2010) Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies. **Mar. Drugs.** 8, 2702-2720.

Bhutia, S.K.; Maiti, T.K. (2008) Targeting tumors with peptides from natural sources. **Trends Biotechnol.** 26, 210-217.

Bowersox, S.S.; Luther, R. (1998) Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. **Toxicon.** 36(11), 1651-1658.

Broggini, M.; Marchini, S.V.; Galliera, E.; Borsotti, P.; Tarabozetti, G.; Erba, E.; Sironi, M.; Jimeno, J.; Faircloth, G.T.; Giavazzi, R.; et al. (2003) Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4. **Leukemia.** 17, 52-59. 25.

Carneiro, R. F., Torres, R. C. F., Chaves, R. P., de Vasconcelos, M. A., de Sousa, B. L., Goveia, A. C. R., ... & Teixeira, E. H. (2017). Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* eggs with antibacterial/a Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* eggs with antibacterial/antibiofilm potential. **Mar Biotechnol.** 19, 49-64 (2017).

Carroll, A.; Bowden, B.; Coll, J.; Hockless, D.; Skelton, B.; White, A. (1994) Studies of *Australian ascidians*. Mollamide, a cytotoxic cyclic heptapeptide from the compound ascidian *Didemnum molle*. **Aust. J. Chem.** 47, 61-69.

Casallanovo, F. et al. (2006) Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. **Biopolymers.** 84, 169-180.

Celedón, G.; González, G.; Barrientos, D.; Pino, J.; Venegas, F.; Lissi, E. A.; ... Lanio, M. E. (2008). Stycolysin II, a cytolytic cyclic heptapeptide from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* promotes higher hemolysis in aged red blood cells. **Toxicon.** 51(8), 1383-1390.

Chakraborty, S.; Ghosh, U. (2010) Oceans: a store of house of drugs - a review. **J. Pharm. Res.** 3, 1293-1296.

Chang, C.I.; Zhang, Y.A.; Zou, J.; Nie, P.; Secombes, C.J. (2006) Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Antimicrob. Agents Chemother.** 50, 185-195.

Cole, A.M.; Weis P.; Diamond, G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. **J. Biol. Chem.**, 272, 18, 12008-12013.

Craig, A.G.; Bandyopadhyay, P.; Olivera, B.M. (1999) Post-translationally modified neuropeptides from *Conus venoms*. **Eur. J. Biochem.** 264(2), 271-275.

Cuthbertson, B.J.; Bullesbach, E.E.; Fievet, J.; Bachère, E.; Gross, P.S. (2004) A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. **Biochem. J.** 381, 79-86.

Cuthbertson, B.J.; Bullesbach, E.E.; Gross, P.S. (2006) Discovery of synthetic penaeidin activity against antibiotic-resistant fungi. **Chem. Biol. Drug Des.** 68: 120-127.

Cuthbertson, B.J.; Deterding, L.J.; Williams, J.G.; Tomer, K.B.; Etienne, K.; Blackshear, P.J. et al. (2008) Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. **Dev. Comp. Immunol.** 32: 167-181.

Cuthbertson, B.J.; Shepard, E.F.; Chapman, R.W.; Gross, P.S. (2002) Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics.** 54: 442-445.

Dathe, M.; Nikolenko, H.; Meyer, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. **FEBS Lett.** 501, 146-150.

Dathe, M.; Wieprecht, T. (1999) Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membrane and biological cells. **Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.** 1462, 71-87.

Destoumieux, D.; Bulet, P.; Loew, D.; Van Dorsselaer, A.; Rodriguez, J.; Bachère E. (1997) Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J. Biol. Chem.** 272: 28398-28406.

De Vries, D.J.; McCauley, R.D.; Walker, F. (1994) Identification of marine organism extracts active at the EGF binding site of human A431 cells. **Toxicol.** 32(5), 553-559.

Diochot, S.; Baron, A.; Rash, L.D.; Deval, E.; Escoubas, P.; Scarzello, S.; Salinas, M.; Lazdunski, M. (2004) A new sea anemone peptide, apetx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. **EMBO J.** 23(7), 1516-1525.

Diochot, S.; Schweitz, H.; Beress, L.; Lazdunski, M. (1998) Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. **J. Biol. Chem.** 273(12), 6744-6749.

Faivre, S.; Chieze, S.; Delbaldo, C.; Ady-Vago, N.; Guzman, C.; Lopez-Lazaro, L.; Lozahic, S.; Jimeno, J.; Pico, F.; Armand, J. et al. (2005) Phase I and pharmacokinetic study of aplidine, a new marine cyclodepsipeptide in patients with advanced malignancies. **J. Clin. Oncol.** 23, 7871-7880.

Ford, P.W.; Gustafson, K.R.; McKee, T.C.; Shigematsu, N.; Maurizi, L.K.; Pannell, L.K.; Williams, D.E.; De Silva, E.D.; Lassota, P.; Allen, T.M.; Van Soest, R.; Andersen, R.J.; Boyd, M.R. (1999) Papuamides A-D, HIV-inhibitory and cytotoxic depsipeptides from the sponges *Theonella mirabilis* and *Theonella swinhoei* collected in Papua New Guinea. **J. Am. Chem. Soc.** 121(25), 5899-5909.

Freitas, V.; Rangel, M.; Bisson, L.; Jaeger, R.; Machado-Santelli, G. (2008) The geodiamolide H, derived from Brazilian sponge *Geodia corticostylifera*, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. **J. Cell. Physiol.** 216, 583-594.

Gala, F.; DAuria, M.; de Marino, S.; Sepe, V.; Zollo, F.; Smith, C.; Copper, J.; Zampella, A. (2008) Jaspami-

des H-L, new actin-targeting depsipeptides from the sponge *Jaspis splendans*. **Tetrahedron**. 64, 7127-7130.

Galinier, R., Roger, E., Sautiere, P. E., Aumelas, A., Banaigs, B., & Mitta, G. (2009). Halocytin and papillo-sin, two new antimicrobial peptides isolated from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia papillosa*. **J. Pept. Sci.** 15(1), 48-55.

García-Fernández, L.F.; Losada, A.; Alcaide, V.; Alvarez, A.M.; Cuadrado, A.; González, L.; Nakayama, K.; Nakayama, K.I.; Fernández-Sousa, J.M.; Muñoz, A. et al. (2002) Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C delta. **Oncogene**. 21, 7533-7544.

Garcia, T., Martinez, D., Palmero, A., Soto, C., Tejuca, M., Pazos, F., ... & Garateix, A. (2009). Pharmacological effects of two cytolytins isolated from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **J. Biosci.** 34(6), 891-898.

Geldof, A.; Mastbergen, S.; Henrar, R.; Faircloth, G. (1999) Cytotoxicity and neurocytotoxicity of new marine anticancer agents evaluated using in vitro assays. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 44, 312-318.

Haefner, B. (2003) Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discov. Today**, 8(12), 536-544.

Hamada, Y.; Shioiri, T. (2005) Recent progress of the synthetic studies of biologically active marine cyclic peptides and depsipeptides. **Chem. Rev.** 105, 4441-4482.

Hamann, M. T.; Otto, C. S.; Scheuer, P. J.; Dunbar, D. C. (1996) Kahalalides: bioactive peptides from a marine mollusk *Elysia rufescens* and its algal diet *Bryopsis* sp. **J. Org. Chem.** 61(19), 6594-6600.

Hirono, I.; Hwang, J.Y.; Ono, Y.; Kurobe, T.; Ohira, T.; Nozaki, R. et al. (2005) Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **FEBS J.** 272, 5257-5266.

Janmaat, M. L., Rodriguez, J. A., Jimeno, J., Kruyt, F. A., & Giaccone, G. (2005). Kahalalide F induces necrosis-like cell death that involves depletion of ErbB3 and inhibition of Akt signaling. **Mol. Pharmacol.** 68(2), 502-510.

Khoo, L.; Robinette, D.W.; Noga, E.J. (1999) Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. **Mar. Biotechnol.** (NY) 1: 44-51.

Kijjoo, A.; Sawangwong, P. (2004) Drugs and cosmetics from the sea. **Mar. Drugs**. 2, 73-82.

Kucuk, O.; Young, M.L.; Habermann, T.M.; Wolf, B.C.; Jimeno, J.; Cassileth, P.A. (2000) Phase II trial of didemnin B in previously treated non-Hodgkin's lymphoma: an Eastern cooperative oncology group (ECOG) study. **Am. J. Clin. Oncol.** 23, 273-277.

Lee, I.H.; Lee, Y.S.; Kim, C.H.; Kim, C.R.; Hong, T.; Menzel, L.; ... Lehrer, R. I. (2001). Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. **iochim. Biophys. Acta - Gen. Subjects**. 1527(3), 141-148.

Lee, I.H.; Zhao, C.; Cho, Y.; Harwig, S.S.; Cooper, E.L.; Lehrer, R.I. (1997). Clavanins,  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. **FEBS Letters**. 400(2), 158-162.

Li, C.; Haug, T.; Styrvold, O.B.; Jorgensen, T.O.; Stensvag, K. (2008) Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droe bachiensis*. **Dev. Comp. Immunol.** 32(12), 1430-1440.

Lin, W.J.; Chien, Y.L.; Pan, C.Y.; Lin, T.L.; Chen, J.Y.; Chiu, S.J. et al. (2009) Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish (*Epinephelus coioides*) which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cells. **Peptides**. 30, 283-290.

Logashina, Y.A.; Solstad, R.G.; Mineev, K.S.; Korolkova, Y.V.; Mosharova, I.V.; Dyachenko, I.A.; ... Kozlov,

S.A. (2017). New disulfide-stabilized fold provides sea anemone peptide to exhibit both antimicrobial and TRPA1 potentiating properties. **Toxins**. 9(5), 154.

Mcintosh, M.; Cruz, L.J.; Hunkapiller, M.W.; Gray, W.R.; Olivera, B.M. (1982) Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. **Arch. Biochem. Biophys.** 218(1), 329-334.

Mitsiades, C.; Ocio, E.; Pandiella, A.; Maiso, P.; Gajate, C.; Garayoa, M.; Vilanova, D.; Montero, J.; Mitsiades, N.; McMullan, C. et al. (2008) Aplidin, a marine organism-derived compound with potent antimyeloma activity in vitro and in vivo. **Cancer Res.** 68, 5216-5225.

Moneo, V.; Serelde, B.G.; Leal, J.F.; Blanco-Aparicio, C.; Diaz-Uriarte, R.; Aracil, M.; Tercero, J.C.; Jimeno, J.; Carnero, A. (2007) Levels of p27(kip1) determine Aplidin sensitivity. **Mol. Cancer Ther.** 6, 1310-1316.

Morita, K.; Koiso, Y.; Hashimoto, Y.; Kobayashi, M.; Wang, W.; Ohyabu, N.; Iwasaki, S. (1997) Interaction of arenastatin A with porcine brain tubulin. **Biol. Pharm. Bull.** 20, 171-174.

Nakagawa, H.; Kimura, A. (1982) Partial purification and characterization of a toxic substance from pedicellariae of the sea urchin *Toxopneustes pileolus*. **Jpn. J. Pharmacol.** 32(5), 966-968.

Nakagawa, H.; Tu, A.T.; Kimura, A. (1991) Purification and characterization of Contractin A from the pedicellarial venom of sea urchin, *Toxopneustes pileolus*. **Arch. Biochem. Biophys.** 284(2), 279-284.

Nascimento, A.C.C.; Fontes, W.; Sebben, A.; Castro, M.S. (2003) Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein Pept. Lett.** 10(3), 227-238.

Norton, R.S.; Olivera, B.M. (2006) Conotoxins down under. **Toxicon.** 48(7), 780-798.

Norton, T.R.; Shibata, S.; Kashiwagi, M.; Bentley, J. (1976) Isolation and characterization of the cardio-tonic polypeptide anthopleurin-A from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. **J. Pharm. Sci.** 65(9), 1368-1374.

Ovchinnikova, T.V.; Aleshina, G.M.; Balandin, S.V.; Krasnosdembkaya, A.D.; Markelov, M.L.; Frolova, E.I.; ... Kokryakov, V.N. (2004). Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina*. **FEBS letters.** 577(1-2), 209-214.

Prommer, E. (2006) Ziconotide: a new option for refractory pain. **Drugs Today (Barc)**. 42(6), 369-378.

Rameshkumar, G.; Ravichandran, S.; Kaliyavarathan, G.; Ajith-Kumar, T.T. (2009) Antimicrobial peptide from the crab, *Thalamita crenata* (Latreille, 1829). **World J. Fish Mar. Sci.** 1(2), 74-79.

Rangel, M.; Santana, J.C.; Pinheiro, A.; Anjos, L.; Barth, T.; Pires Jr., O.; Castro, M. (2017) Marine depsi-peptides as promising pharmacotherapeutic agents. **Curr. Protein Pept. Sci.** 18(1), 72-91.

Relf, J.M.; Chisholm, J.R.; Kemp, G.D.; Smith, V.J. (1999) Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Eur. J. Biochem.** 264: 350-357.

Rosa, R.D.; Barracco, M. A. (2010) Antimicrobial peptides in crustaceans. **Inv. Surv. J.** 7, 262-284.

Rolland, J.L.; Abdelouahab, M.; Dupont, J.; Lefevre, F.; Bachère, E.; Romestand, B. (2010) Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Mol. Immunol.** 47: 1269-1277.

Sable, R.; Parajuli, P.; Jois, S. (2017). Peptides, peptidomimetics, and polypeptides from marine sources: A wealth of natural sources for pharmaceutical applications. **Mar. Drugs.** 15(4), 124.

Schmidtko, A.; Lotsch, J.; Freynhagen, R.; Geisslinger, G. (2010) Ziconotide for treatment of severe chronic pain. **Lancet.** 375(9725), 1569-1577.

Schmitz, F.J.; Bowden, B.F.; Toth, S. (1993) Antitumor and cytotoxic compounds from marine organism. In **Marine Biotechnology: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products**; Attaway, D.H., Zaborsky, O.R.,

Eds.; Plenum Press: New York, NY. Volume 1, pp. 197-308.

Schweitz, H.; Bruhn, T.; Guillemare, E.; Moinier, D.; Lancelin, J.M.; Beress, L.; Lazdunski, M. (1995) Kali-cludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K<sup>+</sup> channels. **J. Biol. Chem.** 270(42), 25121-25126.

Sewell, J.M.; Mayer, I.; Langdon, S.P.; Smyth, J.F.; Jodrell, D.I.; Guichard, S.M. (2005). The mechanism of action of Kahalalide F: variable cell permeability in human hepatoma cell lines. **Eur. J. Cancer.** 41(11), 1637-1644.

Shen, G.; Layer, R.; McCabe, R. (2000) Conopeptides: From deadly venoms to novel therapeutics. **Drug Discov. Today.** 5, 98-106.

Shin, D.M.; Holoye, P.Y.; Murphy, W.K.; Forman, A.; Papasozomenos, S.C.; Hong, W.K.; Raber, M. (1991) Phase I/II clinical trial of didemnin B in non-small-cell lung cancer: Neuromuscular toxicity is dose-limiting. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 29, 145-149.

Shike, H.; Lauth, X.; Westerman, M.E.; Ostland, V.E.; Carlberg, J.M.; Van Olst, J.C.; Shimizu, C.; Bulet, P.; Burns, J.C. (2002) Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. **Eur J Biochem.** 269, 2232-2233.

Smith V.J.; Fernandes J.M.; Kemp, G.D.; Hauton, C. (2008) Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Dev. Comp. Immunol.** 32: 758-772.

Smith, V.J.; Desbois, A.P.; Dyrinda, E.A. (2010) Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. **Marine Drugs.** 8(4), 1213-1262.

Sperstad, S.V.; Haug, T.; Paulsen, V.; Rode, T.M.; Strandskog, G.; Solem, S.T. et al. (2009a) Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. **Dev. Comp. Immunol.** 33, 583-591.

Sperstad, S.V.; Haug, T.; Vasskog, T.; Stensvåg, K. (2009b) Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. **Mol. Immunol.** 46, 2604-2612.

Sperstad, S.V.; Smith, V.J.; Stensvåg, K. (2010) Expression of antimicrobial peptides from *Hyas araneus* haemocytes following bacterial challenge *in vitro*. **Dev. Comp. Immunol.** 34, 618-624.

Stensvåg, K.; Haug, T.; Sperstad, S.V.; Rekdal, O.; Indrevoll, B.; Styrvoid, O.B. (2008) Arasin 1, a pro-line-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. **Dev. Comp. Immunol.** 32(3), 275-285.

Stewart, J.A.; Low, J.B.; Roberts, J.D.; Blow, A. (1991) A phase I clinical trial of didemnin B. **Cancer.** 68, 2550-2554.

Suarez-Jimenez, G.M.; Burgos-Hernandez, A.; Ezquerra-Brauer, J.M. (2012). Bioactive peptides and decapeptides with anticancer potential: Sources from marine animals. **Marine drugs.** 10(5), 963-986.

Suárez, Y.; González, L.; Cuadrado, A.; Berciano, M.; Lafarga, M.; Muñoz, A. (2003). Kahalalide F, a new marine-derived compound, induces oncosis in human prostate and breast cancer cells. **Mol. Cancer Ther.** 2(9), 863-872.

Suenaga, K.; Mutou, T.; Shibata, T.; Itoh, T.; Kigoshi, H.; Yamada, K. Isolation and stereostructure of aurilide, a novel cyclodepsipeptide from the Japanese sea hare *Dolabella auricularia*. **Tetrahedron Lett.** 1996, 37, 6771-6774.

Tasiemski, A.; Schikorski, D.; Le Marrec-Croq, F.; Pontoire-Van Camp, C.; Boidin-Wichlacz, C.; Sautière, P. E. (2007). Hedistin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. **Dev. Comp. Immunol.** 31(8), 749-762.

- Tincu, J.A.; Taylor, S.W. (2004) Antimicrobial peptides from marine invertebrates. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48(10), 3645-3654.
- Trapani, M.R.; Parisi, M.G.; Toubiana, M.; Coquet, L.; Jouenne, T.; Roch, P.; Cammarata, M. (2014). First evidence of antimicrobial activity of neurotoxin 2 from *Anemonia sulcata* (Cnidaria). **Invertebr. Surviv. J.** 11(1), 182-191.
- Vera, M.D.; Joullié, M.M. (2002) Natural products as probes of cell biology: 20 years of didemnin research. **Med. Res. Rev.** 22, 102-145.
- Vervoort, H.; Fenical, W.; Epifanio, R. (2000) Tamandarins A and B: New cytotoxic depsipeptides from a Brazilian ascidian of the family Didemnidae. **J. Org. Chem.** 65, 782-792.
- Wang, C.Z.; Chi, C.W. (2004) Conus peptides - a rich pharmaceutical treasure. **Acta Biochim. Biophys. Sin.** 36(11), 713-723.
- Wang, Z.; Wang, X.; Wang, J. (2018). Recent advances in antibacterial and antiendotoxic peptides or proteins from marine resources. **Marine drugs.** 16(2), 57.
- Wesson, K.; Hamann, M. (1996) Keenamides A, a bioactive cyclic peptide from the marine mollusk *Pleurobranchus forskalii*. **J. Nat. Prod.** 59, 629-631.
- Yamada, K.; Okija, M.; Kigoshi, H.; Suenaga, K. (2000) Cytotoxic substances from opisthobranch molluscs. In: **Drugs from the sea**; Fusetani, N., Ed.; S. Karger, AG: Basel, 59.
- Zampella, A.; Sepe, V.; Bellotta, F.; Luciano, P.; D'Auria, M.V.; Cresteil, T.; Debitus, C.; Petek, S.; Poupat, C.; Ahond, A. (2009) Homophymines B-E and A1-E1, a family of bioactive cyclodepsipeptides from the sponge *Homophymia* sp. **Org. Biomol. Chem.** 7(19), 4037-4044.
- Zhao, C., Nguyen, T., Menzel, L., Waring, A. J., Lehrer, R. I., & Sherman, M. A. (2001). Clavaspilin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. **J. Pept. Res.** 58(6), 445-456.



# METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Anelise Baptista da Silva<sup>a</sup>  
Sharon Vieira dos Reis<sup>a</sup>  
Alexandre José Macedo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## RESUMO

Os produtos do metabolismo secundário de organismos marinhos são apontados como uma das principais fontes de moléculas bioativas para vários setores da indústria. Neste capítulo apresenta-se definição, breve histórico, aspectos que envolvem a diversidade, a biossíntese, as plataformas analíticas, as abordagens para o isolamento, bem como exemplos e aplicações dos principais metabólitos.

# 1 | O QUE É METABOLISMO SECUNDÁRIO

## 1.1 DEFINIÇÃO

Entende-se por metabolismo o conjunto de reações químicas envolvidas na manutenção, crescimento e reprodução de qualquer organismo vivo. É por meio dessas reações que os componentes disponíveis no meio ambiente que os cerca são convertidos em componentes celulares e na energia necessária para os processos celulares.

Os metabólitos são os compostos que participam do metabolismo e podem ser classificados em primários ou secundários. Os metabólitos primários são essenciais para o crescimento e manutenção celular dos organismos. As classes moleculares às quais pertencem compreendem proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. As vias metabólicas que sintetizam, degradam e modificam essas moléculas são encontradas em todas as formas de vida, ainda que apresentem variações.

Em contrapartida, os compostos oriundos do metabolismo secundário (também conhecido por metabolismo especializado) não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos organismos. Apesar disso, apresentam relevantes funções ecológicas e conferem aos organismos que os produzem vantagens adaptativas, como comunicação entre espécies e com o ambiente que os circunda, defesa, sinergismo e predação. Metabólitos secundários são formados a partir de metabólitos primários, por meio de vias diferenciadas e em fases específicas de crescimento. Sua biossíntese se dá a partir de *building blocks* (precursores de moléculas mais complexas) derivados principalmente de acetilcoenzima A, ácido chiquímico, ácido mevalônico e desoxixilulose fosfato, que podem ser convertidos em uma vasta gama de compostos, por meio de inúmeras transformações metabólicas. São considerados uma expressão da individualidade de espécies e têm sido amplamente explorados em vários segmentos da indústria, em decorrência de suas inúmeras aplicações. Uma grande parte dos “produtos naturais”, termo muito utilizado para definir compostos produzidos por organismos vivos, são metabólitos secundários. Como exemplo clássico (embora não seja de origem marinha) podemos citar a penicilina, descoberta por Alexander Fleming em 1928 e isolada e purificada em 1938 por Ernst Chain e Howard Florey. A penicilina é uma molécula com atividade antibiótica, produzida a partir do metabolismo secundário do fungo *Penicillium notatum*.

Os metabólitos secundários são encontrados em uma grande variedade de micro e macro-organismos, sejam eles terrestres ou aquáticos. As próximas seções serão dedicadas especialmente aos metabólitos secundários de origem marinha.

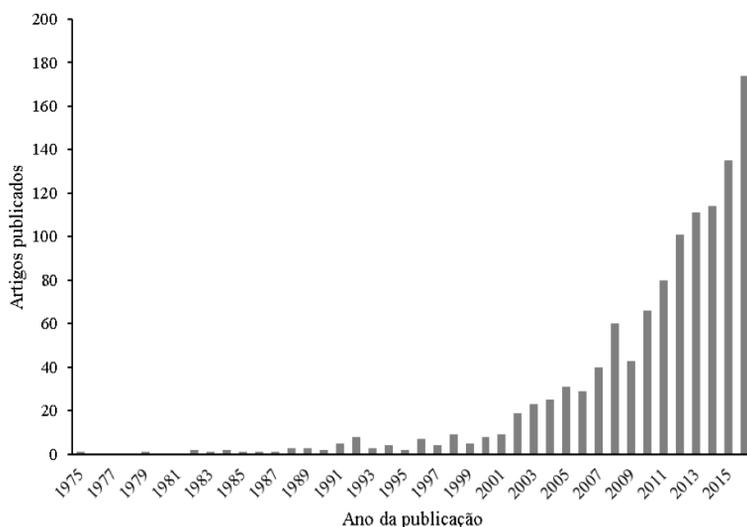
## 1.2 HISTÓRICO

Os mares e oceanos cobrem cerca de 70% da superfície do planeta, compreendendo uma grande diversidade de ecossistemas. O ambiente marinho pode apresentar amplas varia-

ções de pressão, temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e luz. Algumas condições ambientais desses ecossistemas podem ser extremas, como nas profundezas do mar, onde as pressões são extremamente altas, combinadas a condições anaeróbicas e temperaturas próximas a 0 °C. As condições de vida nesses ambientes marinhos diferem enormemente das condições terrestres, e dessa forma, os organismos que os habitam e as adaptações necessárias para seu crescimento e sobrevivência também são especialmente diferentes. Um dos mecanismos de adaptação é a produção de metabólitos secundários que podem ter funções de proteção contra predadores, sinalização inter e intra-específica, inibição de micro-organismos, ou proteção contra radiação UV.

A grande diversidade do ambiente marinho, bem como dos organismos que nele habitam, faz com que os mares e oceanos sejam reconhecidos como fontes promissoras e ainda pouco exploradas de moléculas bioativas de alta complexidade e diversidade. Até a década de 70, no entanto, os oceanos foram praticamente negligenciados como tal. Somente a partir de então, com o acesso a técnicas e equipamentos mais modernos de mergulho e coleta de amostras, registra-se maior interesse na exploração do ambiente marinho e de seus organismos.

Uma busca na base de dados Pubmed utilizando os termos *secondary metabolite(s)* e *marine* ou *sea* resultou em quase 2.000 artigos publicados nos últimos 50 anos. Embora esse número pareça pequeno, não reflete a quantidade de estudos nessa área e nem mesmo a quantidade de metabólitos secundários já isolados de organismos marinhos. Com o crescente uso do termo “produtos naturais” para designar compostos isolados de organismos vivos, torna-se difícil delimitar o número de trabalhos sobre o assunto. Ainda que a maior parte dos produtos naturais já descritos seja, de fato, metabólitos secundários, muitas publicações já adotam apenas o primeiro termo. Ainda assim, é importante salientar que o interesse pela descoberta de novos compostos e sua possível atividade biológica vem crescendo continuamente nas últimas décadas, como ilustrado na Figura 1.

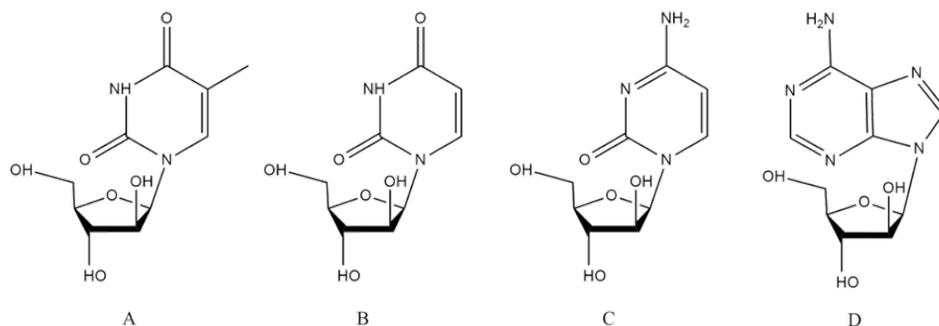


**Figura 1.** Número de artigos publicados entre 1975 e 2016 disponíveis na base de dados Pubmed sobre metabólitos secundários marinhos.

A progressiva exploração do ambiente marinho resultou no isolamento de milhares de produtos nas últimas décadas, especialmente com o crescimento no interesse em micro-organismos marinhos após os anos 2000. Isolados de água e sedimento, mas também de outros organismos vivos, os micro-organismos representam a possibilidade de exploração da diversidade marinha com menor impacto ambiental, visto que a fermentação para obtenção de metabólitos é uma alternativa sustentável. Apesar da evolução das pesquisas, acredita-se que menos de 10% do total estimado de organismos marinhos tenham sido estudados até o momento.

### 1.3 ALGUNS EXEMPLOS DE ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA

Um dos primeiros relatos de metabólitos isolados de organismos marinhos data da década de 50. Em 1951, Bergmann e Feeney isolaram um nucleosídeo nunca antes descrito, a espongotimidina, da esponja *Cryptotethia crypta*, coletada na Flórida. Quatro anos depois, juntamente com Burke, Bergmann descreveu um novo nucleosídeo, chamado de espongouridina e isolado da mesma espécie de esponja marinha. Alguns anos mais tarde, duas moléculas sintéticas inspiradas nesses nucleosídeos foram produzidas por Walwick e colaboradores na Universidade da Califórnia em Berkeley, e por Baker e colaboradores no Instituto de Pesquisa Stanford. A citosina arabinosídeo (Ara-C), comercializada como Citarabina, e a adenina arabinosídeo (Ara-A), Vidarabina, são fármacos utilizados no tratamento de leucemia e do vírus do herpes simples, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Nucleosídeos isolados por Bergmann e colaboradores: espongotimidina(A) e espongouridina(B), e seus análogos sintéticos: citarabina(C) e vidarabina(E).

Hoje existem no mercado alguns fármacos de origem marinha (que serão abordados com mais detalhes adiante), além de diversos outros que estão sendo submetidos a ensaios clínicos avançados. A maior parte dos estudos de metabólitos secundários marinhos é voltada ao descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, apesar do grande número de metabólitos marinhos de valor terapêutico, existem estudos que avaliam atividades diversas, como bioemulsificantes e biossurfactantes, anti-incrustantes e anti-insetos, por exemplo.

## 1.4 DIVERSIDADE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS MARINHOS

Inúmeros estudos têm sido realizados com objetivo de isolar metabólitos secundários oriundos dos mais diversos organismos marinhos. Diferentes classes de metabólitos já foram relatadas, apresentando uma ampla gama de atividades biológicas, como pode ser observado no quadro abaixo.

ORGANISMOS MARINHOS	PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	PRINCIPAIS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
Algas vermelhas	Terpenos, acetogeninas, indóis, esteróis	Citotóxicas, antimicrobianas, antivirais, anti-parasitárias, anti-inflamatórias
Algas pardas	Florotaninos	Cosmecêutica (clareadores, anti-idade, antioxidantes), anti-inflamatórios, antialérgicos
Ervas marinhas	Cetosteroides, ácidos fenólicos, flavonoides	Citotóxica, antimicrobiana, anti-incrustante, antiviral, anti-insetos
Moluscos	Terpenos, macrolídeos, acetogeninas, esteróis, alcaloides, polipropionatos, peptídeos	Citotóxica, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antiparasitária, antiviral
Ascídias	Alcaloides, peptídeos, policetídeos, esteróis, alquil sulfatos, saturosporinas	Antiproliferativa, antibacteriana, antimalária, anti-HIV, anti-inflamatória, antioxidante
Esponjas	Alcaloides, peptídeos cíclicos, terpenos, glicolipídeos, esteróis, macrolídeos, policetídeos, enzimas, lactonas, nucleosídeos	Antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-malária, anti-inflamatória, imunossupressora, cardiovascular, relaxante muscular
Fungos	Policetídeos, terpenos, alcaloides, peptídeos, esteróis, lipídeos, chiquímatos	Antibacteriana, imunossupressora, citotóxica, anti-helmíntica, antiviral
Cianobactérias	Lipopeptídeos, policetídeos, indóis, peptídeos lineares, depsipeptídeos	Anti-inflamatória, citotóxica, neurotóxica, antiparasitária
Bactérias	Lipopeptídeos, peptídeos cíclicos, macrolactonas, policetídeos, terpenos, isocumarinas, depsipeptídeos	Antimicrobiana, antitumoral, antiviral
Actinobactérias	Antraquinonas, policetídeos, alcaloides, aminoglicosídeos, esteróis, depsipeptídeos	Antibacteriana, antitumoral, antimalária, antifúngica, antiviral

Muitas das moléculas isoladas do ambiente marinho apresentam estruturas químicas não usualmente encontradas no ambiente terrestre, com a presença de halogênios (principalmente cloro e bromo) ligados covalentemente aos metabólitos secundários, presença de oxidações não usuais e de metilações. Ainda, é comum entre os metabólitos secundários marinhos a presença de moléculas híbridas de duas ou mais classes. Todas essas peculiaridades resultam em enorme diversidade estrutural, com imensos potenciais biotecnológicos.

## 2 | BIOSSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Embora organismos marinhos sejam, reconhecidamente, fontes de potenciais moléculas de interesse industrial, existe um gargalo no que se refere à prospecção dessas moléculas. Isso ocorre porque, além das dificuldades de coleta de macro-organismos e outras implicações técnicas associadas, a biomassa disponível para obtenção de substâncias de interesse não atende às necessidades, em termos de quantidade, para testes pré-clínicos e clínicos. Estima-se que a demanda de mercado para um metabólito secundário que já tenha passado por todos os testes clínicos pode ser da ordem de alguns quilogramas por ano, o que representa uma quantidade massiva de moléculas que são obtidas a partir de um número ainda maior de organismos marinhos. Essa quantidade dificulta a sua obtenção por meio da exploração do meio marinho, fazendo-se necessário o desenvolvimento de técnicas de produção alternativas que gerem menos impacto ao meio ambiente.

Estudos recentes têm evidenciado que grande parte dos metabólitos de interesse extraídos de organismos invertebrados marinhos são em realidade produzidos por micro-organismos associados a eles. Um exemplo clássico é o da briostatina 1, um fármaco antitumoral isolado do briozoário *Bugula neritina*, sintetizado por uma bactéria simbiote (*Candidatus Endobugula sertula*).

Fica evidente nesses casos, portanto, que compostos de interesse podem ser produzidos em grandes quantidades em escala biotecnológica por meio de processos fermentativos, sem a necessidade de coletar os macro-organismos hospedeiros, sendo, portanto, uma fonte economicamente viável e sustentável de prospecção de metabólitos de interesse comercial.

Além disso, levando em consideração que uma parcela significativa dos metabólitos de origem marinha apresenta estrutura química complexa, cuja síntese em laboratório não se mostra economicamente viável, a prospecção de micro-organismos associados a organismos marinhos surge como uma alternativa promissora na busca por novas moléculas com potencial biotecnológico.

Grandes progressos têm sido feitos na elucidação de vias de biossíntese de metabólitos secundários, em especial quando se trata de micro-organismos. Isso se deve não somente aos avanços das técnicas de biologia molecular, mas também ao fato de micro-organismos usualmente possuírem genes estreitamente ligados, organizados em *clusters* gênicos, que são coletivamente responsáveis pela síntese de um determinado metabólito secundário. Tanto a ordem como a posição específica que os genes ocupam dentro do *cluster* fornecem uma estrutura organizacional que determina o tempo e a ordem de ativação desses genes. Essa característica tem sido explorada como estratégia para o descobrimento de novos produtos naturais a partir do conceito de *genome mining* (mineração de genoma), no qual informações sobre um organismo são derivadas da análise de seu genoma.

Actinomicetos (grupo específico de bactérias que apresentam morfologia filamentosa semelhante a hifas de fungos) e fungos filamentosos estão entre as fontes mais abundantes de diversidade metabólica quando se trata de metabólitos secundários. Estudos de genômica de micro-organismos filamentosos demonstraram a existência de um número de *clusters* gênicos para a biossíntese de metabólitos secundários superior ao que era previsto a partir dos metabólitos que já haviam sido identificados. O sequenciamento completo do genoma de espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* (gênero de maior interesse farmacêutico), por exemplo,

evidenciou a presença de mais de 20 *clusters* gênicos na espécie *Streptomyces coelicolor* e 30 *clusters* gênicos envolvidos em metabolismo secundário em *S. avermitilis*.

A expressão dos *clusters* de metabólitos secundários é controlada tanto pelas condições do ambiente no qual o organismo se encontra como pelo seu estágio de desenvolvimento. Levando em consideração que as vias metabólicas secundárias evoluíram impulsionadas pela pressão seletiva dos ambientes de origem desses organismos, *clusters* gênicos podem estar silenciados em condições laboratoriais. Isso se deve ao fato de essas condições serem diferentes das naturalmente enfrentadas pelo organismo no seu ambiente de origem, não fornecendo a ele o gatilho ecológico necessário para a expressão de determinados metabólitos secundários.

Embora exista grande variedade de classes de metabólitos secundários, considerável parcela dos produtos naturais de baixo peso molecular são pertencentes às classes dos policetídeos (PK, do inglês *polyketides*), peptídeos não ribossomais (NRPs) ou híbridos destes (PK-NRP), além de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs).

## 2.1 POLICETÍDEOS

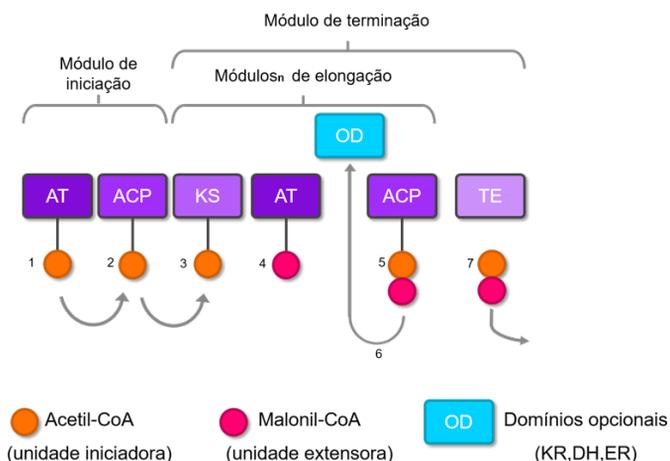
Policetídeos e peptídeos não-ribossomais são sintetizados por complexos enzimáticos multimodulares presentes em bactérias e fungos. Essas enzimas são organizadas em linhas de montagem modulares onde cada módulo é composto por um conjunto de domínios enzimáticos responsáveis pela elongação da cadeia e modificações pós-síntese que geram diversidade estrutural e funcional aos metabólitos secundários em questão.

Os policetídeos são sintetizados pelos complexos enzimáticos das *policetídeo sintases* (PKS, do inglês *polyketide synthases*) a partir da oligomerização de pequenos ácidos carboxílicos. As etapas básicas da síntese dos policetídeos estão representadas na Figura 3.

Cada módulo de PKS pode ser subdividido nos seguintes domínios: domínio aciltransferase (AT – responsável pela ativação do substrato acetil-CoA), domínio da proteína carreadora de acil (ACP – responsável por realizar o transporte de substratos no processo de elongação), domínio cetosintase (KS – responsável por catalisar a reação de elongação) e domínio tioesterase (Te – responsável por liberar o policetídeo). Além desses domínios principais, podem ser encontrados os domínios opcionais cetoreductase (KR), desidratase (DH), enoil redutase (ER) e metiltransferase (MT), que permitem que o policetídeo sofra modificações pós-síntese por meio de reações de redução ou oxidação.

As PKSs são classificadas em três tipos, de acordo com a organização catalítica dos seus domínios: PKS I, II e III. A primeira (PKS I) se subdivide em PKS I modular (presente em bactérias) e PKS I iterativa (presente principalmente em fungos filamentosos); a segunda (PKS II) está presente exclusivamente em bactérias e é responsável pela síntese de um grande número de policetídeos aromáticos (por exemplo, doxorrubicina e oxitetraciclina), e a terceira (PKS III) está presente em plantas, fungos e bactérias.

Na PKS I modular os sítios ativos existentes em cada módulo são utilizados apenas uma vez durante o processo de síntese e o comprimento da cadeia da molécula formada depende do número e ordem dos módulos. Já na PKS I iterativa, cada sítio ativo do módulo é utilizado repetidas vezes.



**Figura 3.** Etapas básicas da síntese de policetídeos. (1) No módulo de iniciação o domínio AT seleciona o substrato (monômero de acetil-CoA) e (2) o domínio ACP o transporta até o domínio (3) KS do primeiro módulo. (4) Uma unidade extensora (malonil-CoA) é selecionada e adicionada ao domínio AT e (5) transportada pelo domínio ACP até o domínio KS onde já havia a molécula de acetil-CoA e a reação de elongação tem continuidade até que o domínio TE libere a molécula (caso a molécula não sofra nenhuma modificação por unidades opcionais). (6) Caso a molécula necessite de reações de redução, o domínio ACP transporta a cadeia até os domínios opcionais, que farão as modificações, antes de a molécula ser liberada pelo domínio TE (7).

## 2.2 PEPTÍDEOS NÃO-RIBOSSOMAIS

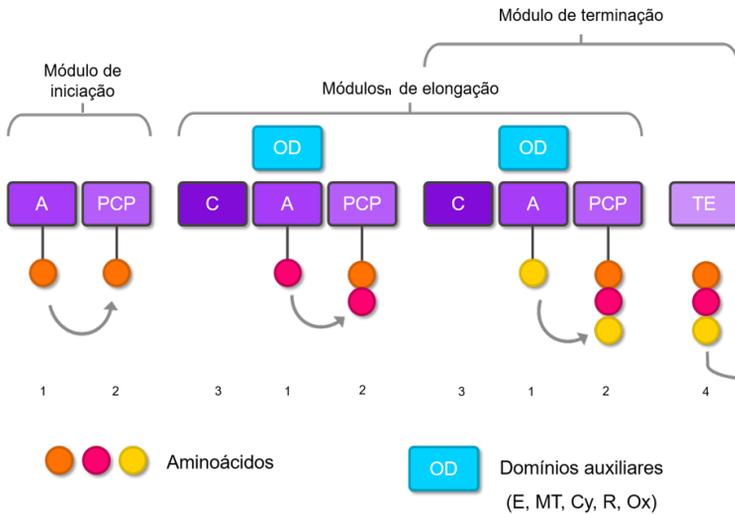
Os peptídeos não-ribossomais podem ser peptídeos lineares, cíclicos ou ramificados que usualmente contêm menos de 20 resíduos de aminoácidos e que são frequentemente modificados por processos químicos como acilação, glicosilação e outros. Assim como os policetídeos, muitos peptídeos não-ribossomais são conhecidos por sua importância clínica, como é o caso da ciclosporina e vancomicina. São sintetizados por peptídeos não-ribossomais sintetases (NRPSs, do inglês *non-ribosomal peptide synthetases*), que, assim como as PKSs, são enzimas estruturadas em módulos.

Cada módulo funciona como um *building block* responsável pela incorporação e modificação de um aminoácido, de maneira que a ordem e quantidade de módulos de uma NRPS determinam a sequência de aminoácidos do peptídeo sintetizado.

Cada módulo de NRPS é composto por três domínios principais: domínio de adenilação (A – responsável por selecionar o aminoácido específico, ativá-lo como aminoacil-adenilato e transferi-lo para o próximo domínio); domínio da proteína carreadora de peptidil (PCP – que recebe o aminoácido do domínio A e forma uma ligação tioéster), e domínio de condensação (C – responsável por catalisar a formação das ligações peptídicas), conforme Figura 4.

Além desses domínios principais, existem domínios adicionais envolvidos na modificação dos peptídeos não-ribossomais. São eles: o domínio E (envolvido na epimerização da molécula); domínio MT (que possibilita a ocorrência de reações de metilação); domínio Cy (possibilita a ciclização da molécula em formação); domínio R (conduz reações de redução), e domínio Ox

(conduz reações de oxidação), conforme a figura 4.



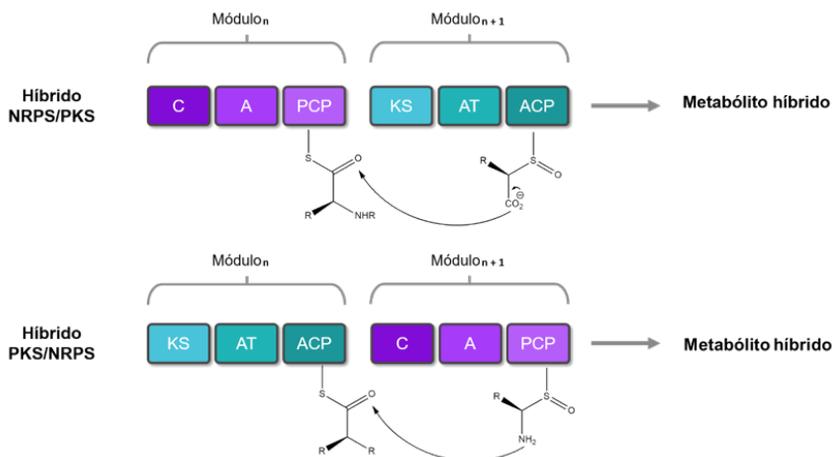
**Figura 4.** Passos básicos da síntese de peptídeos não-ribossomais. (1) O domínio A seleciona o aminoácido a ser incorporado e transfere ao domínio PCP (2), onde uma ligação tioéster é formada. (3) O domínio C forma a ligação peptídica entre o aminoácido presente no domínio PCP do mesmo módulo e o peptidil intermediário ligado ao domínio PCP do módulo anterior (ou seja, catalisa a ligação entre aminoácidos de módulos adjacentes). (4) Caso não estejam presentes domínios adicionais que modificam a molécula em formação, o domínio TE libera o peptídeo formado. Entretanto, caso estejam presentes domínios adicionais (como o E, MT, Cy, R ou Ox), a molécula é modificada antes de ser liberada pelo domínio TE.

### 2.3 HÍBRIDOS ENTRE POLICETÍDEOS E PEPTÍDEOS NÃO-RIBOSSOMAIS

Os híbridos de policetídeos e peptídeos não-ribossomais são produtos naturais biosinteticamente derivados de aminoácidos e pequenas moléculas de ácidos carboxílicos. Esses metabólitos de natureza híbrida podem ser gerados por dois mecanismos básicos. No primeiro mecanismo o sistema enzimático das PKSs e NRPSs (ou vice-versa) forma um sistema híbrido que participa diretamente do alongamento da molécula (Figura 5); no segundo, não há requerimento de hibridização funcional entre as duas maquinarias enzimáticas para que haja a formação do produto híbrido. Nesse mecanismo, policetídeos e peptídeos não-ribossomais são produzidos por suas respectivas maquinarias enzimáticas e, somente após, porções de cada um dos produtos gerados são unidas por uma enzima ligase, resultando no metabólito híbrido.

### 2.4 ISOPRENÓIDES (TERPENOS)

Os terpenos constituem uma variada classe de metabólitos encontrados na maior parte dos organismos vivos. São classificados de acordo com o número de moléculas de isopreno (C5) que possuem, sendo hemiterpenos (C5), monoterpênicos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40), ou politerpenos. Apesar da diversidade de estruturas e funções, os terpenos são todos derivados do precursor isopentenil difosfato (IPP)



**Figura 5.** Mecanismo básico da síntese de híbridos de policetídeos e peptídeos não-ribossomais por hibridização dos módulos enzimáticos de PKS e NRPS.

e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), que são produzidos por meio de duas possíveis vias: a do mevalonato (MVA) e a do metileritritol-fosfato (MEP).

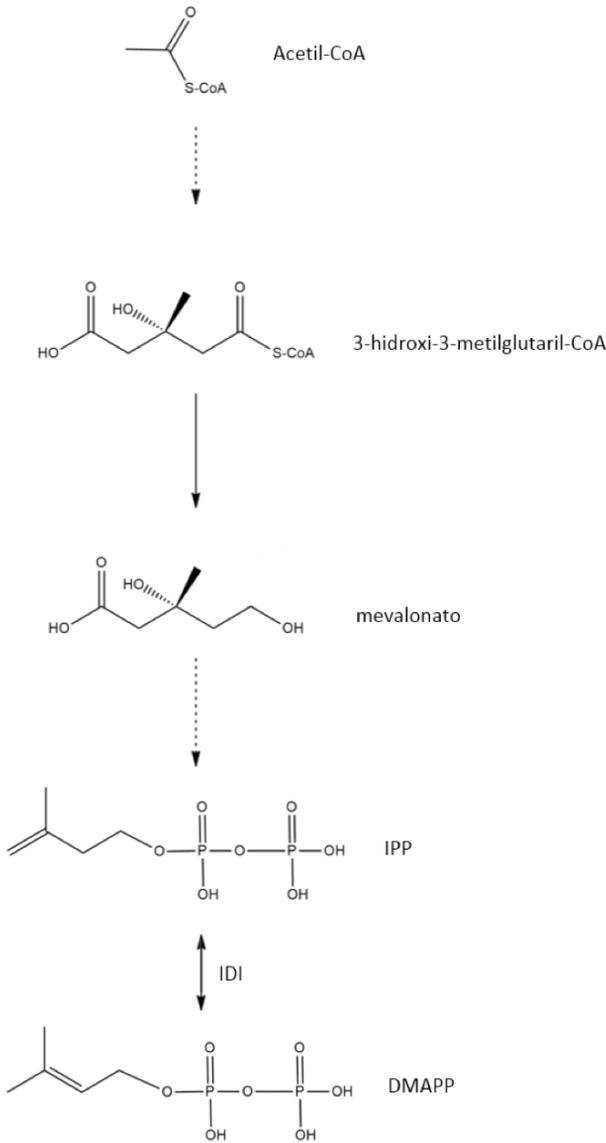
A via MVA produz os precursores dos terpenos primariamente em eucariotos, como animais e fungos, mas também está presente em arqueias e algumas eubactérias (as últimas também apresentando a via MEP, mais comumente utilizada na produção de metabólitos secundários). Em plantas, ambas as vias existem. A via MVA transforma acetilcoenzima A (acetil-CoA) em IPP em seis etapas. Nas primeiras etapas, a condensação sequencial de três moléculas de acetil-CoA dá origem a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, que é convertido a mevalonato. A seguir, o mevalonato passa por reações de fosforilação e descarboxilação, gerando IPP. A atividade de uma isomerase (IDI) é necessária para formar DMAPP a partir de IPP (Figura 6).

A via MEP transforma gliceraldeído-3-fosfato e ácido pirúvico em IPP e DMAPP em sete etapas, na proporção aproximada de 5:1. A primeira reação é a condensação de ácido pirúvico e gliceraldeído-3-fosfato, formando 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato. A partir de redução e de um rearranjo intramolecular, é formado metileritritol-fosfato. Ao final dessa via, serão formados, simultaneamente, IPP e DMAPP (Figura 7).

A seguir, prenilttransferases convertem IPP e DMAPP em precursores lineares (Figura 8), que serão ciclizados por diversas terpeno ciclases, resultando em diferentes estruturas da família dos terpenos.

O conhecimento das vias biossintéticas dos metabólitos secundários permite a utilização de técnicas para a interferência e redirecionamento do fluxo metabólico de um organismo, com o objetivo de aumentar o rendimento de um determinado composto ou obter análogos de um metabólito conhecido através da alteração de enzimas biossintéticas.

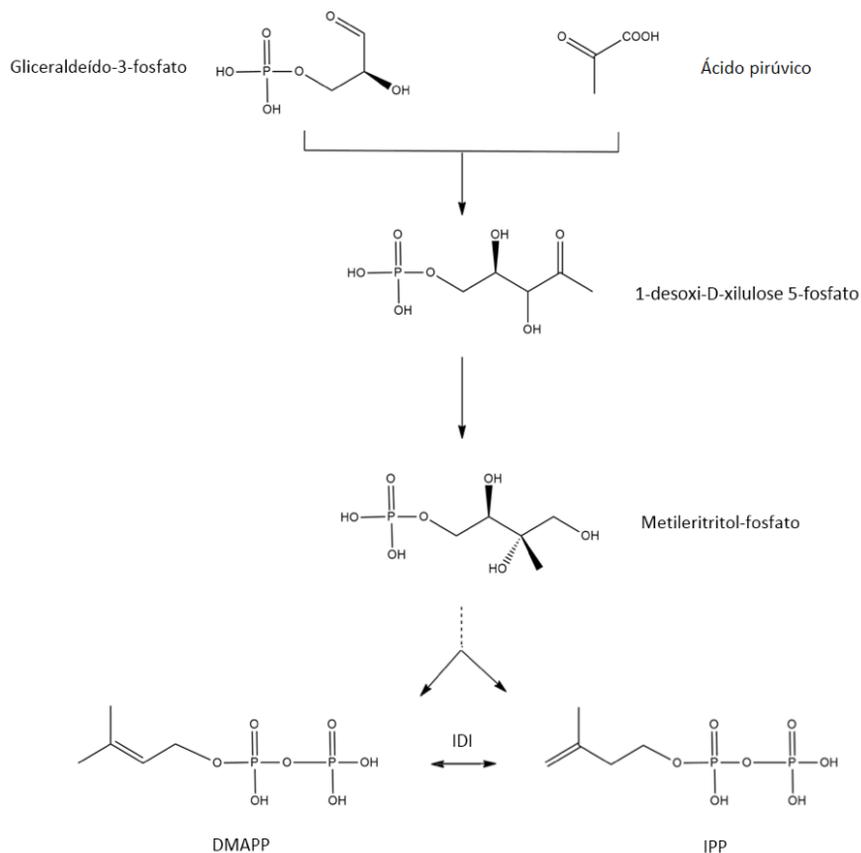
### 3 | ABORDAGENS METODOLÓGICAS



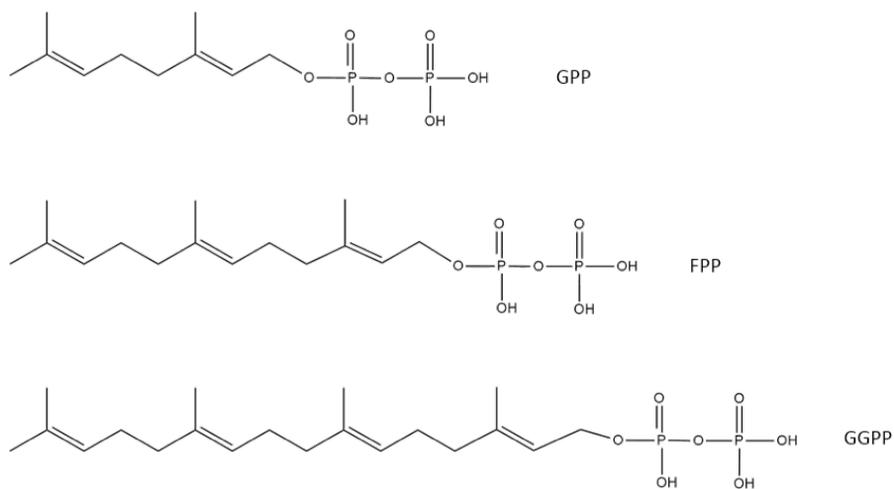
**Figura 6.** Via do mevalonato (MVA). Linhas tracejadas indicam múltiplas etapas.

### 3.1 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS ATIVOS

A busca por metabólitos secundários ativos provenientes de origens naturais tem início, na maioria das vezes, com a análise de extratos oriundos de plantas, organismos marinhos, e cultivos bacterianos ou fúngicos. Nessa etapa inicial, um *screening* biológico é comumente utilizado para avaliar um grande número de amostras. Idealmente, essas análises devem ser simples, específicas, baratas e rápidas, podendo servir aos mais variados objetivos, como inibição do crescimento microbiano, citotoxicidade contra células tumorais ou atividade anti-inflamatória, por exemplo. Observada a atividade de interesse, outros tipos de análises ainda mais específicas e também mais caras e demoradas podem ser necessários para restringir a busca,



**Figura 7.** Via do metileritritol-fosfato (MEP). Linhas tracejadas indicam múltiplas etapas.



**Figura 8.** Precusores lineares de terpenos. GPP: difosfato de geranila (precursor de monoterpens); FPP: difosfato de farnesila (precursor de sesquiterpenos); GGPP: difosfato de geranyl geranila (precursor de diterpenos).

visando um determinado alvo que seja responsável pelo efeito observado.

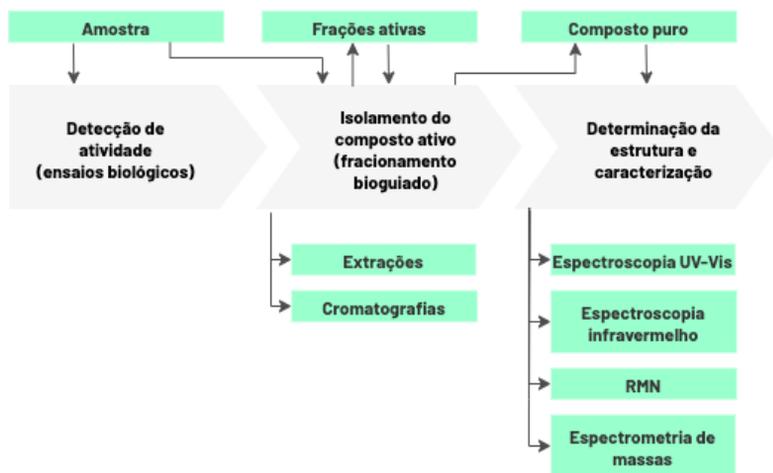
O passo seguinte é o isolamento do composto ativo por meio de fracionamento, que deve ser guiado por análises que permitam verificar a atividade biológica em cada etapa. Assim, todas as frações geradas são testadas para a atividade de interesse, selecionando-se somente as frações ativas para as etapas subsequentes. Usualmente, o processo de fracionamento envolve técnicas de extração com solventes seguidas de técnicas cromatográficas. No entanto, quando não se sabe a natureza química do metabólito a ser isolado de uma mistura complexa, não é possível seguir uma metodologia específica para a purificação, que acaba sendo um processo com uma sequência de distintas abordagens de separação (polaridade, cargas, tamanho, entre outras) no intuito de isolar o metabólito.

A extração com solventes pode ser o primeiro passo do fracionamento bioguiado. No caso de amostras secas ou liofilizadas, geralmente são utilizados solventes polares, como acetato de etila ou metanol, mas pode ser empregada uma sequência de extrações envolvendo diversos solventes com diferentes polaridades. A extração em meios de cultivo líquidos pode ser feita sequencialmente com solventes de polaridades crescentes, como éter de petróleo a butanol. Ao trabalhar com cultivos fúngicos, o micélio deve passar por processo de extração separadamente do meio líquido, já que alguns metabólitos aderem ao micélio.

A amostra bruta original ou as frações ativas obtidas no processo de extração podem ser submetidas a técnicas de cromatografia. Normalmente, são necessárias diversas etapas envolvendo diferentes técnicas cromatográficas, e cada uma delas deve ser cuidadosamente avaliada antes de se seguir para a próxima. Algumas possibilidades mais utilizadas incluem as cromatografias em camada delgada e em coluna. O princípio das técnicas cromatográficas é comum a todas, e envolve a passagem de uma amostra por duas fases: uma estacionária e outra móvel. A diversidade de combinações entre essas duas fases permite uma ampla exploração das características dos componentes da amostra, que poderão ser separados de acordo com tamanho, polaridade, solubilidade, afinidade, carga iônica, entre outras.

Após a obtenção de um composto puro, chega-se à etapa de identificação ou determinação da sua estrutura e caracterização. Essa fase pode envolver diferentes abordagens, cada qual fornecendo algumas informações estruturais que devem ser analisadas conjuntamente. Entre alguns métodos importantes estão os espectroscópicos de absorção molecular, como o UV/Visível e o infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas. Análises espectroscópicas na região UV/Visível e infravermelho permitem acesso a informações como presença de grupos funcionais e ligações químicas características. A RMN atualmente é o método mais importante para a determinação das estruturas moleculares, definindo o número e tipos de núcleos e como estão interconectados em uma molécula orgânica. A espectrometria de massas fornece dados para a identificação da massa molecular e fórmula molecular, com informações relativas à presença ou ausência de grupos funcionais no composto em estudo.

A Figura 9 resume, esquematicamente, as possíveis etapas a serem seguidas para o isolamento e identificação de um metabólito ativo.



**Figura 9.** Representação esquemática das etapas de isolamento de um metabólito ativo.

### 3.2 PLATAFORMAS ANALÍTICAS E ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA PARA METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Durante muito tempo o estudo de metabólitos secundários se restringiu a organismos terrestres. Com o avanço de metodologias de coleta e técnicas moleculares ampliou-se a possibilidade de estudo para organismos anteriormente inacessíveis, como é o caso dos organismos marinhos.

Tendo em vista que os metabólitos secundários derivados de micro e macro-organismos marinhos constituem uma fonte promissora de moléculas de alta complexidade e atividade biológica, muito tem sido investido em relação ao desenvolvimento de bancos de dados e ferramentas de bioinformática que deem suporte às pesquisas científicas e desenvolvimento de fármacos ou outros produtos de interesse industrial.

Entre os bancos de dados disponíveis destaca-se o *MarinLit*, dedicado a pesquisa de produtos naturais de origem marinha, que cobre de modo abrangente o tema, disponibilizando informações taxonômicas dos organismos de origem das moléculas, atividades biológicas já avaliadas, detalhes experimentais de relevância, classes estruturais e propriedades químicas das moléculas. Outro banco de dados relevante no cenário de produtos naturais (embora não seja restrito a organismos marinhos como o anteriormente mencionado) é o *AntiBase*, que conta com dados de mais de 40.000 compostos e informações espectroscópicas e biológicas dos mesmos. Da fusão entre os dois bancos de dados surgiu o *AntiMarin* que, assim como seus precursores, utiliza uma estratégia de desreplicação que permite utilizar a informação da estrutura química de uma molécula previamente caracterizada para identificá-la em amostras experimentais sem necessidade de isolá-la ou determinar sua estrutura. Graças a isso a possibilidade de descobrir novos compostos é maximizada, uma vez que indica aos pesquisadores se o composto avaliado já é conhecido, evitando a reavaliação e minimizando tempo, esforço e custos inerentes ao processo. Além disso a estratégia permite encontrar variantes de compostos conhecidos e que, por vezes, apresentam aplicações clínicas mais efetivas que as originais.

A desrepliação é particularmente interessante em relação à seleção de micro-organismos para ensaios bioguiados, uma vez que bactérias do mesmo gênero, por exemplo, podem apresentar morfologia idêntica mas produzir metabólitos secundários com estruturas bem diversas, assim como bactérias fenotípica e genotipicamente distintas podem produzir os mesmos metabólitos. Com a desrepliação é possível verificar rapidamente que amostras potencialmente apresentam novas moléculas e prosseguir para os estágios de fracionamento e purificação apenas com elas.

Outro banco de dados que vem crescendo em importância no cenário de biotecnologia marinha é o *BaMBa* (*Brazilian Marine Biodiversity Database*), resultado da iniciativa da Rede Nacional de Pesquisa em Biotecnologia Marinha (Biotecmar) e mantida pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). O *BaMBa* conta com dados de estudos integrados auxiliando na tomada de decisões científicas, industriais e governamentais sobre o uso e gerenciamento de recursos marinhos, além de manter conexões com outros bancos de dados nacionais e internacionais, possibilitando recuperação rápida de informações de qualquer parte do mundo.

Além dos bancos de dados, outras ferramentas de bioinformática são de grande utilidade para descoberta de moléculas de interesse farmacológico e industrial. Entre elas, as que possibilitam a descoberta de metabólitos secundários a partir da identificação de *clusters* gênicos, que, como já mencionado, são genes estreitamente ligados que são coletivamente responsáveis pela síntese de um metabólito secundário em um micro-organismo. Vários métodos de bioinformática para a detecção de *clusters* gênicos têm sido desenvolvidos (por vezes muito similares entre si em relação à informação gerada, mas que diferem em relação aos algoritmos utilizados para chegar até essa informação). Entre essas ferramentas computacionais, destacam-se o antiSMASH, CASSIS/SMIPS, CLUSEAN, ClusterFinder, ClustScan, MIDDAS-M, NP.searcher e SMURF.

Um resumo comparativo entre as ferramentas computacionais de detecção de *clusters* gênicos envolvidos no metabolismo secundário pode ser observado no quadro abaixo.

FERRAMENTA DE BIOINFORMÁTICA	ORGANISMO ALVO	INFORMAÇÃO REQUERIDA PARA ANÁLISE	FOCO DA ANÁLISE ("ASSINATURA" DE ENZIMAS*)	INFORMAÇÃO GERADA
antiSMASH	Bactérias e fungos	Sequências de DNA ou arquivo de nucleotídeo anotado (formato GenBank ou EMBL*)	Ampla variedade de enzimas de biossíntese de metabólitos secundários	Identificação de <i>clusters</i> de metabólitos secundários e predição de estrutura química de produtos de <i>clusters</i> de NRPS/PKS
CASSIS-SMIPS	Fungos	Sequências de DNA (formato FASTA)	Policetídeo sintase, peptídeo não-ribossomal sintetase e dimetilalil-triptofano sintase	Prediz a localização dos <i>clusters</i> de metabólitos secundários
CLUSEAN	Bactérias	Sequências de DNA e regiões codificantes (formato EMBL*)	Policetídeo sintase, peptídeo não-ribossomal sintetase	Identificação de motivos e domínios funcionais conservados em NRPS e PKS I e predição de especificidades de NRPS

FERRAMENTA DE BIOINFORMÁTICA	ORGANISMO ALVO	INFORMAÇÃO REQUERIDA PARA ANÁLISE	FOCO DA ANÁLISE ("ASSINATURA" DE ENZIMAS)	INFORMAÇÃO GERADA
ClusterFinder	Bactérias	Sequências de nucleotídeos	Sem necessidade de "assinatura" de enzimas	Predição de <i>clusters</i> de genes biossintéticos
ClustScan	Bactérias	Sequências de DNA	Policetídeo sintase, peptídeo não-ribossomal sintetase e híbridos	Predição de estrutura química de metabólitos secundários
MIDDAS-M	Fungos	Sequências de DNA, proteínas e dados de transcriptoma	Sem necessidade de "assinatura" de enzimas	Identificação de <i>clusters</i> de metabólitos secundários
NP. Searcher	Bactérias	Sequências de DNA (formato FASTA*)	Policetídeo sintase e peptídeo não-ribossomal sintetase	Predição de estrutura química de metabólitos secundários (formato SMILES*)
SMURF	Fungos	Sequências de proteínas	Policetídeo sintase, peptídeo não-ribossomal sintetase e dimetilalil-triptofano sintase	Identificação de domínios conservados de PKS, NRPS, híbridos e DMATS

\*Formato GenBank: Forma de compartilhar sequências de nucleotídeos, proteínas e genomas desenvolvido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) e que contém mais informações do que apenas sequências nucleotídicas.

\*Formato EMBL (European Molecular Biology Laboratory):

\*Formato FASTA: trata-se da representação de sequências de nucleotídeos ou peptídeos, utilizando códigos de uma única letra para cada nucleotídeo ou aminoácido.

\*Formato SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specifications*): trata-se da representação de estruturas químicas utilizando caracteres e números.

### 3.3 antiSMASH

O *antiSMASH* (*Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell*) é um servidor abrangente que possibilita a identificação, anotação e análise genômica automática de clusters de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários de bactérias e fungos, a partir da integração de uma variedade de ferramentas de análise de metabólitos *in silico* já publicadas. Cobre uma gama de classes de metabólitos secundários além dos tradicionais policetídeos e peptídeos não-ribossomais (como terpenos, aminoglicosídeos, sideróforos, bacteriocinas, entre outros).

### 3.4 CASSIS-SMIPS

O *CASSIS* (*Cluster Assignment by Island Sites*) foi desenvolvido para analisar genomas de fungos, embora seja aplicável a outros organismos eucarióticos. A ferramenta é capaz de prever a presença de *clusters* gênicos de metabólitos secundários assumindo que regiões promotoras de genes organizados em clusters contêm uma densidade de sítios de ligação de fatores de transcrição compartilhados superior à de genes que não estão agrupados. Para tanto, o

software SMIPS (*Secondary Metabolites by InterProScan*) fornece ao CASSIS uma lista de genes “âncora” (genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários, como policetídeo sintases, peptídeos não-ribossomais sintetases e dimetilalil-triptofano sintases).

### 3.5 CLUSEAN

O CLUSEAN (*Cluster Sequence Analyzer*) possibilita a anotação e análise de *clusters* de genes da biossíntese de metabólitos secundários, além de identificação de motivos e domínios funcionais conservados em peptídeos não-ribossomais sintetases e policetídeo sintases do tipo I, além da predição de especificidades de NRPS.

### 3.6 CLUSTERFINDER

Deteção de *clusters* de genes putativos de metabolismo secundário em dados genômicos e metagenômicos sem necessidade de uma “assinatura” enzimática, como ocorre em outras ferramentas. Pode ser utilizado sozinho ou integrado ao antiSMASH.

### 3.7 CLUSTSCAN

Desenvolvido para análise de genomas de fungos, o MIDDAS-M (*Motif-Independent De novo Detection Algorithm for Secondary Metabolite gene clusters*) detecta *clusters* de genes de metabolismo secundário (incluindo mecanismos de síntese novos que possuem genes funcionalmente ainda não caracterizados), sem necessidade de “assinatura” de enzimas.

### 3.8 MIDDAS-M

O NP.searcher é um *software* livre desenvolvido para analisar genomas microbianos e identificar *clusters* gênicos de biossíntese de metabólitos secundários e indicar estruturas químicas putativas de peptídeos não-ribossomais, policetídeos e seus híbridos.

### 3.9 SMURF

SMURF (*Secondary Metabolite Unknown Regions Finder*) consiste em uma ferramenta que identifica vias e genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários a partir do genoma de fungos. A ferramenta permite a identificação de domínios conservados das enzimas PKS, NRPS e híbridos das duas, além de dimetilalil-triptofano sintase (DMATS).

## 4 | APLICAÇÕES DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ORIUNDOS DA BIOTECNOLOGIA MARINHA

## 4.1 FÁRMACOS

Os metabólitos secundários de origem marinha apresentam características diferenciadas, o que os torna promissores na busca do desenvolvimento de novos fármacos. De fato, diversos compostos derivados de produtos marinhos estão em fase de ensaios clínicos, enquanto outros já foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) e EMEA (*European Medicines Agency*) para comercialização. No entanto, poucos mantêm a mesma estrutura da molécula inicialmente isolada, como Prialt® e Yondelis®.

- **Ziconotídeo (Prialt®)** – Elan Pharmaceuticals: aprovado em 2004 pela FDA e em 2005 pela EMEA. Analgésico não opioide sintetizado quimicamente a partir da  $\omega$ -conotoxina MVIIA (peptídeo de 25 aminoácidos isolado do veneno do caracol *Conus magnus*). É administrado por infusão intratecal, indicado para dor crônica severa em pacientes tolerantes ou refratários a outros tratamentos.
- **Trabectedin (Yondelis®)** – PharmaMar: aprovado em 2007 pela EMEA e em 2015 pela FDA. Alcaloide tetra-hidroquinolínico inicialmente isolado da ascídia marinha *Ecteinascidia turbinata*. Mais tarde descobriu-se ser produzido por uma bactéria simbiote, *Candidatus Endoecteinascidia frumentensis*. Atualmente é produzido sinteticamente. Seu mecanismo de ação se dá pela ligação à fenda menor da fita de DNA, interferindo na divisão celular, nos processos de transcrição gênica e na maquinaria de reparo do DNA. É indicado no tratamento de sarcoma avançado de tecidos moles e câncer ovariano (recidiva).
- **Citarabina (Cytosar-U®; DepoCyt®)** – Bedford; DepoTech: aprovado em 1969 pela FDA (Cytosar-U®). Substituído por DepoCyt® em 1999, também aprovado pela EMEA em 2001. Molécula sintética inspirada nos nucleosídeos espongoouridina e espongotimidina, isolados da esponja *Cryptotethia crypta*. É um antimetabólito antineoplásico que inibe a síntese de DNA. Utilizado no tratamento de algumas leucemias, especialmente leucemia aguda não linfoblástica.
- **Vidarabina (Vira-A®)** – King Pharma: aprovado pela FDA em 1976 e descontinuado em 2001. Ainda em uso na Europa em forma de colírio. Assim como a citarabina, é um nucleosídeo inicialmente sintetizado inspirado na espongoouridina e espongotimidina, mas hoje isolado a partir de *Streptomyces antibioticus*. Possui atividade antiviral contra os vírus do herpes simples, varicela-zoster e da família poxvirus.
- **Mesilato de eribulina (Halaven®)** – Eisai Co. Ltd.: aprovado pela FDA em 2010 e pela EMEA em 2011. Obtido pela simplificação estrutural (com a remoção dos grupos desnecessários à atividade farmacológica) da halicondrina B, um policetídeo isolado da esponja marinha *Halichondria okadai*. Age inibindo a polimerização da tubulina, impedindo a proliferação celular. Indicado para tratamento de câncer de mama metastático.

- **Brentuximabe vedotina (Adcetris®)** – Seattle Genetics: aprovado pela FDA em 2011 e pela EMEA em 2012. Análogo sintético da dolastatina 10 (peptídeo isolado do molusco *Dolabella auricularia*) ligado a um anticorpo anti-CD30. Mais tarde foi descoberto que a dolastatina 10 é produzida pelas cianobactérias *Symploca hydnoides* e *Lyngbya majuscula*, que fazem parte da alimentação do molusco. Indicado no tratamento de linfoma Hodgkin e linfoma anaplásico de células grandes.

## 4.2 COSMECÊUTICOS

A presença de ingredientes bioativos, com benefícios terapêuticos ou medicinais, faz com que os cosmeceúticos venham se destacando nas últimas décadas. Nesse setor também os ativos de origem marinha têm prosperado nos últimos anos. Muitos deles foram desenvolvidos visando a aplicação farmacêutica, mas acabaram sendo lançados como bioativos cosmeceúticos. Um exemplo é a linha de produtos Resilience® (Estée Lauder), que contém um extrato rico em pseudopterosinas, obtido do coral mole *Pseudopteroergorgia elisabethae*. As pseudopterosinas são glicosídeos diterpenos, com ação anti-inflamatória e analgésica, utilizados como aditivos na prevenção de irritação causada por exposição ao sol ou a químicos.

## 5 | CONCLUSÕES

O ambiente marinho é fonte de um repertório ainda incalculável de moléculas bioativas. Nesse contexto, o Brasil se destaca por possuir uma costa com mais de oito mil quilômetros e por receber correntes marinhas de sul e de norte, aumentando a diversidade nesse ambiente. No que diz respeito a aplicações biotecnológicas, micro-organismos vêm se destacando em virtude da facilidade de manutenção de uma coleção sem a necessidade de nova coleta, diminuindo impactos ambientais para obtenção de amostra biológica. Os principais desafios hoje estão, entre outros, na: (i) formação de recursos humanos especializados para atuação e desenvolvimento de tecnologias de vanguarda; (ii) busca por novas ferramentas de análises de dados oriundos das plataformas *ômicas* e (iii) tentativa de melhorar e qualificar o acesso ao material biológico por parte de pesquisadores e empresas para um desenvolvimento sustentável do país.

## REFERÊNCIAS

- Anand, M.; Prasad, M.; Yadav, G.; Kumar, N.; Shehara, J.; Ansari, M.; Mohanty, D. (2010) SBSPKS: structure based sequence analysis of polyketide synthases. **Nucleic Acids Research**, 38:W487-W496.
- Anjum, K.; Abbas, S. Q.; Shah, S. A. A.; Akhter, N.; Batool, S.; Hassan, S. S. (2016) Marine sponges as a drug treasure. **Biomolecules & Therapeutics**. 24(4):347-362.

Benkendorff, K. (2010) Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. **Biological Reviews**. 85: 757-775.

Bentley, R. (1997) Secondary metabolites play primary roles in human affairs. **Perspectives in Biology and Medicine**. 40(2):197-221.

Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeno-Tárraga, A. M. et al. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**. 417(6885):141-147.

Bergmann, W.; Feeney, R. J. (1951) Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. **The Journal of Organic Chemistry**. 16:981-987.

Bergmann, W.; Burke, D. C. (1955) Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III Spongothymidine and spongouridine. **The Journal of Organic Chemistry**. 20:1501-1507.

Blunt, J.; Munro, M.; Laatsch, H. (2007) **AntiMarin Database**. University of Canterbury: Christchurch, New Zealand, University of Gottingen: Gottingen, Germany.

Blunt, J.; Copp, B.; Keyzers, R.; Munro, M.; Prinsep, M. (2017) Marine natural products. **Natural Product Reports**. 34:235-294.

Boronat, A.; Rodríguez-Concepción, M. (2014) Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. 148:3-18.

Chavali, A.; Rhee, S. (2017) Bioinformatics tools for the identification of gene clusters that biosynthesize specialized metabolites. **Briefings in Bioinformatics**. 1-13.

Davies, J. (2013) Specialized microbial metabolites: functions and origins. **The Journal of Antibiotics**, 66(7):361-364.

Dias, D.A.; Urban, S.; Roessner, U. (2012) A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**. 2(2):303-336.

Donadio, S.; Monciardini, P.; Sosio, M. (2007) Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthases: the emerging view from bacterial genomics. **Natural Products Reports**. 24:1073-1109.

Du, L.; Sanchez, C.; Shen, B. (2001) Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. **Metabolic Engineering**. 3:7895.

Harizani, M.; Ioannou, E.; Roussis, V. (2016) The Laurencia paradox: an endless source of chemodiversity. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. 102:91-252.

Ghisalberti, E. (2008) Detection and isolation of bioactive natural products. In: **Bioactive Natural Products - Detection, Isolation, and Structural Determination**. CRC Press. 2nd. ed. Chap. 2, p. 11-76.

Grünwald, J.; Marahiel, M. (2006) Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 70:121-146.

Hassan, S.S.; Anjum, K.; Abbas, S. Q.; Akhter, N.; Shagufta, B. I.; Shah, S.A.A.; Tasneem, U. (2017) Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. **Environmental Toxicology Pharmacology**. 49:34-47.

Hildebrand, M.; Waggoner, I.E.; Liu, H.; Sudek, S.; Allen, S.; Anderson, C.; Sherman, D.H.; Haygood, M. (2004) bryA: an unusual modular polyketide synthase gene from the uncultivated bacterial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. **Chemistry & Biology**. 11:1543-1552.

Hunt, B.; Vincent, A.C.J. (2006) Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. **Ambio**. 35(2):57-64.

Ikedo, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; Omura, S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nature Biotechnology**. 21(5):526-531.

Lindequist U. (2016) Marine-derived pharmaceuticals – Challenges and opportunities. **Biomolecules & Therapeutics**. 24(6):561-571.

Macintyre, L.; Zhang, T.; Viegelmann, C.; Martinez, I.; Cheng, C.; Dowdells, C.; Abdelmohsen, U.; Gernert, C.; Hentschel, U.; Edrada-Ebel, R. (2014) Metabolomic tools for secondary metabolite discovery from marine microbial symbionts. **Marine Drugs**. 12:3416-3448.

Martins, A.; Vieira, H.; Gaspar, H.; Santos, S. (2014) Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. **Marine Drugs**. 12(2):1066-1101.

Mohimani, H.; Gurevich, A.; Mikheenko, A.; Garg, N.; Nothias, L.; Ninomiya, A.; Takada, K.; Dorrestein, P.; Pevzner, P. (2017) Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. **Nature Chemical Biology**. 13:30-37.

Mondol, M.A.M.; Shin, H.J.; Islam, M.T. (2013) Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. **Marine Drugs**. 11(8):2846-2872.

Nunnery, J.K.; Mevers, E.; Gerwick, W.H. (2010) Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**. 21(6):787-793.

Osborn, A. (2010) Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. **Trends in Genetics**. 26:449-457.

Palanisamy, S.K.; Rajendran, N.M.; Marino, A. (2017) Natural products diversity of marine ascidians (Tunicates; Ascidiacea) and successful drugs in clinical development. **Natural Products and Bioprospecting**. 7(1):1-111.

Pereira, R.B.; Andrade, P.B.; Valentão, P. (2016) Chemical diversity and biological properties of secondary metabolites from sea hares of *Aplysia* genus. **Marine Drugs**. 14(2):39.

Radjasa, O.K.; Vaske, Y.M.; Navarro, G.; Crews, P. (2011) Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: their biomedical potential and possible production by microbial associates. **Bioorganic & Medical Chemistry**. 19(22):6658-6674.

Salomon, C.E.; Magarvey, N.A.; Sherman, D.H. (2004) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. **Natural Product Reports**. 21:105-121.

Sanjeewa, K.K.A.; Kim, E.; Son, K.; Jeon, Y. (2016) Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 162:100-105.

Sukarmi, R.; Radjasa, O.K. (2007) Bioethical consideration in the search for bioactive compounds from reef invertebrates. **Journal of Applied Sciences**. 7(8):1235-1238.

Umamura, M.; Koike, H.; Nagano, N.; Ishii, T.; Kawano, J.; Yamane, N.; Kozono, I.; Horimoto, K.; Shinya, K.; Asai, K.; Yu, J.; Bennett, J.; Machida, M. (2013) MIDDAS-M: Motif-Independent de novo detection of secondary metabolite gene clusters through the integration of genome sequencing and transcriptome data. **Plos One**. 8(12):e84028.

Weber, T.; Blin, K.; Duddela, S.; Krug, D.; Kim, H.; Bruccoleri, R.; Lee, S.; Fischbach, M.; Müller, R.; Wohlleben, W.; Breitling, R.; Takano, E.; Medema, M. (2015) antiSMASH 3.0 – A comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**. 43(W1):W237-243.

Weissman, K.; Leadlay, P. (2005) Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. **Nature Reviews Microbiology**. 3:925-936.

Xie, X.; Qiao, K.; Tang Y. (2012) Metabolic Engineering of Natural Product Biosynthesis. In: **Bioactive**

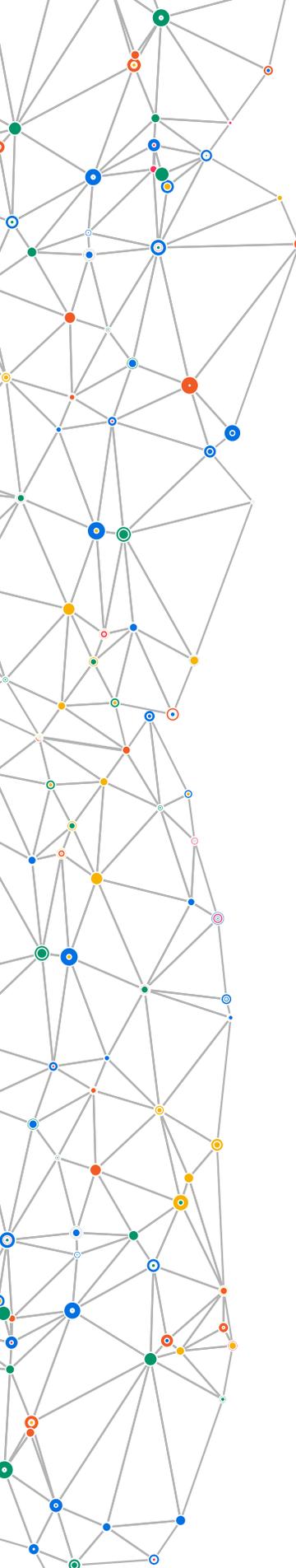
**Compounds from Natural Sources - Natural Products as Lead Compounds in Drug Discovery.** CRC Press, Chap. 3, p. 65-96.

Yang, J.; Sanchez, L.; Rath C.; Liu, X.; Boudreau, P.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; Felicio, R.; Fenner, A.; Wong, W.; Linington, R.; Zhang, L.; Debonsi, H.; Gerwick, W.; Dorrestein, P. (2013) Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products.** 76(9):1686-1699.

Zidorn, C. (2016) Secondary metabolites of seagrasses (Alismatales and Potamogetonales; Alismatidae): chemical diversity, bioactivity, and ecological function. **Phytochemistry.** 124:5-28.







# ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

Nicole Sartori Ribeiro<sup>a</sup>  
Luciana Angelo Loges<sup>a</sup>  
Alexandre José Macedo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## RESUMO

Nos anos 40 descobriu-se que a informação genética estava contida no DNA, mas somente em 1953 James Watson e Francis Crick elucidaram a estrutura dessa macromolécula, bem como o mecanismo de codificação para a produção de proteínas. Desde então vem sendo possível utilizar esses conhecimentos e a tecnologia para fins tão variados quanto o diagnóstico de doenças, a produção de compostos, a identificação de espécies e a prospecção de fármacos a partir de moléculas bioativas, entre outros. Neste capítulo serão discutidos tópicos referentes aos nucleotídeos e nucleosídeos, constituintes fundamentais das moléculas de DNA e RNA, sondas e marcadores moleculares, bem como às ferramentas construídas a partir da biologia molecular, numa abordagem voltada para a riqueza e diversidade do ambiente marinho.

## 1

## NUCLEOTÍDEOS, SONDAS E MARCADORES MOLECULARES

A palavra biodiversidade possui diversos significados, que variam de acordo com a escala biológica a que se referem. Contudo, um desses conceitos é “todas as espécies que habitam o planeta Terra”, incluindo tanto organismos unicelulares como vírus, bactérias e protistas (ex.: amebas), quanto multicelulares, como plantas, animais e fungos. Todos eles têm seu material genético constituído por ADN (ácido desoxirribonucleico; DNA, *deoxyribonucleic acid*, em inglês) ou ARN (ácido ribonucleico; RNA, *ribonucleic acid*). O DNA e o RNA são macromoléculas essenciais para todas as formas de vida, responsáveis por determinar características genéticas dos seres vivos. Elas são constituídas por nucleotídeos e apresentam imensas variações quando comparadas entre organismos evolutivamente distintos. A diversidade biológica resulta da variação genética entre as espécies, devido aos diferentes ecossistemas que habitam, a variação da comunidade biológica e as interações entre os organismos no ambiente. A biodiversidade é dinâmica na natureza, sendo que as espécies e suas populações continuam a mudar e evoluir devido a processos de diversificação genética, causados por mutações.

Todos os organismos vivos estão sujeitos a mutações devido a interações com o ambiente ou para aperfeiçoar o funcionamento normal das células. Essas alterações genéticas variam desde a troca de um único nucleotídeo até a modificação de um conjunto de cromossomos, e a maioria delas visa aumentar as possibilidades do organismo de adaptar-se ao ambiente e de sobreviver. Além disso, as mutações alteram macromoléculas que constituem o genoma, levando a uma variação genética chamada polimorfismo.

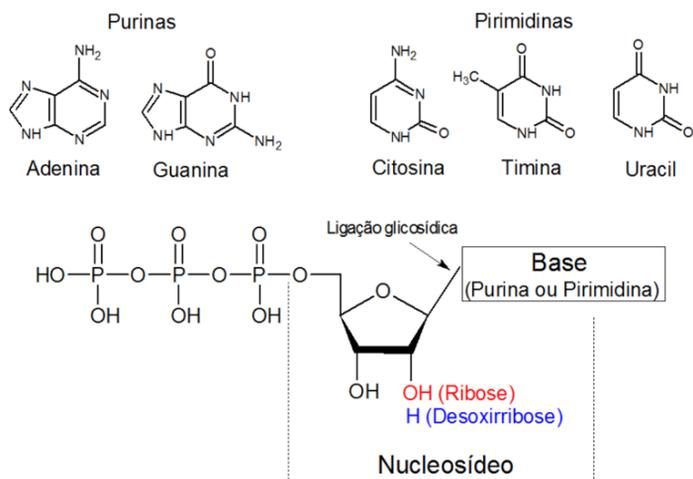
Os polimorfismos, juntamente com outras forças evolutivas como seleção, migração e deriva genética (mudança da frequência alélica de forma randômica em uma população), levam a uma diferenciação de indivíduos, espécies e grupos de ordem taxonômica maior. Os marcadores moleculares surgiram a partir dessas variações e se tornaram muito presentes ao longo do genoma, sendo por isso utilizados como ferramentas para detectar singularidades genéticas em indivíduos, espécies ou populações, além de identificar diversidade genética. Eles apresentam propriedades biológicas características que podem ser medidas ou detectadas em qualquer parte do corpo, como sangue ou tecidos, em qualquer estágio de desenvolvimento. Os marcadores moleculares podem ser identificados por meio de diversas técnicas de biologia molecular, incluindo a técnica de PCR e sondas.

### 1.1 CONCEITOS E DEFINIÇÕES

Nucleosídeos são glicosilaminas que fazem parte da estrutura das moléculas dos nucleotídeos, a unidade estrutural do DNA (ácido desoxirribonucleico) e do RNA (ácido ribonucleico). Tanto os nucleosídeos como os nucleotídeos são componentes vitais das células e estão envolvidos em vários processos biológicos.

Os nucleosídeos são compostos por uma base heterocíclica contendo nitrogênio e uma

pentose, ambas ligadas através de uma ligação glicosídica. A fosforilação dos nucleosídeos no primeiro grupo hidroxila da pentose dá origem aos nucleotídeos, que, através de ligações do tipo fosfodiéster, formam os ácidos nucleicos. Os nucleotídeos podem ser mono, di ou trifosfatados, e no DNA estão presentes nucleotídeos monofosfatados. A ribose é a pentose presente no RNA, enquanto a desoxirribose está presente no DNA. Ambas se diferenciam pelas moléculas presentes no carbono 2, sendo que na ribose há a presença de um grupamento hidroxila, enquanto na desoxirribose há um átomo de hidrogênio nessa mesma posição. As bases nitrogenadas que formam o DNA são: Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) e Timina (T). A e G são bases púricas (derivadas das purinas), e C e T são bases pirimidicas (derivadas das pirimidinas).



**Figura 1.** Estrutura dos nucleosídeos e nucleotídeos.

Duas longas cadeias de nucleotídeos se unem na forma de uma dupla fita ou dupla hélice, unida por pontes de hidrogênio entre as bases dos nucleotídeos. Cada base nitrogenada é pareada com sua base complementar na outra cadeia, dando origem assim a uma macromolécula. T pode parear com A por meio de duas pontes de hidrogênio, e C pode parear com G formando três pontes de hidrogênio. O RNA possui uma estrutura química semelhante a uma fita simples do DNA, no entanto, além de o açúcar presente ser a ribose, a base Uracil (U) substitui a Timina (T).

Nos organismos eucarióticos, o DNA está nos cromossomos, que consistem em moléculas de DNA organizadas e compactadas por meio de um complexo proteico denominado cromatina. A estrutura do DNA é similar para todos os organismos vivos. Todavia, a sequência dos nucleotídeos, o conjunto de cromossomos e a quantidade de informação genética nessas sequências são bastante variáveis, sendo esses os motivos para haver diferenciação de espécies e, inclusive, variações genotípicas dentro da mesma espécie. Muitas dessas alterações, denominadas polimorfismos e causadas por mutações, originaram marcadores moleculares ao longo da molécula de DNA.

Marcadores moleculares, também considerados marcadores genéticos, são variações

de fragmentos específicos de DNA usados para marcar ou rastrear um *locus* (localização específica) em um determinado cromossomo – por exemplo, um gene marcador. O gene marcador tem sua localização conhecida ou clara expressão fenotípica, podendo ser detectado por meio de métodos analíticos ou por uma sequência de DNA identificável, facilitando assim o estudo de herança genética.

Os genes marcadores ou locais específicos nos cromossomos são sítios de heteroziguidade, isto é, sítios onde ocorrem alterações na sequência de DNA entre membros de uma mesma população, podendo isso ser determinado pelas diferentes formas alélicas do gene ou pelo *locus* gênico. Entre as possíveis causas dessas variações estão incluídas as inserções, translocações, deleções, duplicações e pontos de mutação. Além disso, esses marcadores estão associados com a determinação de certas características que podem ser transmitidas de uma geração a outra.

Com o desenvolvimento da biologia molecular e biotecnologia nas últimas décadas, pesquisadores desenvolveram diversas técnicas moleculares capazes de detectar os marcadores moleculares presentes nos organismos. Em alguns casos, essas técnicas são também chamadas de marcadores moleculares, pois sua utilização é essencial para que um determinado polimorfismo seja identificado (ex.: RFLP, RAPD).

Outra estratégia bastante utilizada atualmente para detectar essas variações genéticas são as sondas moleculares. Sondas são trechos de fragmentos de DNA ou RNA que reconhecem e se ligam em sequências de DNA ou RNA complementar, isto é, são capazes de detectar e identificar uma sequência-alvo no genoma.

## 1.2 HISTÓRICO

A variação genética de populações começou a receber atenção de cientistas especialmente a partir do final do século XIX, pois se percebeu que as diferenças na sequência de DNA dos organismos permitiam a identificação de sua espécie, além de possibilitar a análise de sua relação evolutiva com outras espécies.

Desde a determinação do modelo da estrutura do DNA, estabelecido por Watson e Crick no início dos anos 1950, passou-se a estudar e compreender a função do DNA e também dos genes, que começaram a ser utilizados para determinar as variações genéticas.

Entre os anos 60 e 90, com o desenvolvimento das pesquisas e tecnologias, os marcadores genéticos tornaram-se cada vez mais populares, por serem capazes de detectar tais variações, sendo utilizados na identificação de uma sequência específica de DNA ao longo dos cromossomos. Tornaram-se importantes para análise genômica e permitiram relacionar traços hereditários com variação genética, além de determinar parentesco e distância genética entre espécies.

Essa diferenciação entre os organismos teve um impacto significativo na ecologia marinha, já que um grande número de seres marinhos tem ciclos de vida complexos, incluindo formas larvais. As larvas são capazes de habitar diferentes ambientes e de se comportarem de forma muito diferente das formas adultas, dificultando identificá-las e relacioná-las. A tecnologia envolvendo a obtenção das sequências de DNA espécie-específicas e o desenvolvimento de

ferramentas moleculares, incluindo identificação de marcadores moleculares, técnica de PCR e sondas, auxiliaram os estudos da ecologia e da diversidade marinha, possibilitando a classificação de espécies, por exemplo, de ovos e larvas, distinção de espécies de uma mesma família ou gênero, obtenção de informações genéticas e de alterações evolutivas. Ainda, permitiram o isolamento do DNA de micro-organismos marinhos de seu hábitat, sem a necessidade de cultivo em laboratório, para posterior identificação.

### 1.3 ANÁLOGOS NATURAIS DE NUCLEOSÍDEOS DE ORIGEM MARINHA COM ATIVIDADE BIOLÓGICA

A descoberta de nucleosídeos com bioatividade em diversas fontes marinhas estimulou atividades de pesquisa voltadas para o isolamento dessas moléculas, bem como a síntese de análogos e a avaliação das atividades biológicas desses compostos. Em especial, os esforços focaram na busca por novos análogos de nucleosídeos naturais com potencial atividade antibacteriana, antiviral, antiparasitária e antitumoral.

A prospecção de fármacos a partir de moléculas oriundas do ambiente marinho deu um importante passo na década de 50, quando o grupo do pesquisador Werner Bergmann, da Universidade de Yale (EUA), isolou dois nucleosídeos incomuns a partir da esponja marinha *Tectitethya crypta* (anteriormente denominada *Cryptotethya crypta*). Esses compostos, chamados de espongotimidina e espongouridina, eram nucleosídeos similares aos constituintes dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), mas continham um resíduo de arabinose no lugar da ribose e desoxirribose presentes no RNA e DNA. Esses análogos naturais de nucleosídeos demonstraram inicialmente uma significativa atividade antiviral, e o estudo do mecanismo de ação como inibidores da transcriptase reversa inspirou a síntese de vários compostos que vieram a ser utilizados no tratamento de infecções virais e de câncer. Espongotimidina e espongouridina podem ser considerados precursores de compostos análogos a nucleosídeos que agem como antimetabólitos, e inspiraram a prospecção de moléculas que tiveram suas atividades avaliadas frente a diversas doenças humanas, entre elas vários tipos de câncer e infecção por HIV. Entre os produtos inspirados nesses análogos de nucleosídeos, que alcançaram êxito e foram disponibilizados comercialmente, estão o Ara-C (citosina-arabinosídeo), usado no tratamento de leucemias, o antiviral Ara-A (adenina-arabinosídeo) e o AZT (azidotimidina), um dos primeiros medicamentos usados no tratamento da AIDS e das infecções pelo vírus HIV. Ara-C, ou Citarabina, é usado principalmente no tratamento da leucemia aguda não linfoblástica, enquanto Ara-A, ou Vidarabina, é usado na forma de colírio no tratamento de infecções oftalmológicas pelo vírus *Herpes simplex*.

A descoberta desses nucleosídeos naturais bioativos contendo um açúcar diferente da ribose ou desoxirribose inspirou uma geração de novos compostos com potencial terapêutico, sendo essa característica fundamental no mecanismo de ação dessas moléculas, já que a incorporação destas ao DNA durante a replicação resulta no bloqueio do processo de síntese. Embora a síntese de nucleosídeos seja conhecida desde o final da década de 40, o isolamento desses compostos e a busca por seus análogos sintéticos permanecem sendo de interesse por causa de seus perfis farmacológicos promissores.

## 2 | MARCADORES E SONDAS MOLECULARES: ABORDAGENS METODOLÓGICAS

Os marcadores moleculares, utilizados para identificar diferenças em nível molecular entre indivíduos e populações, podem ser classificados em três grupos: proteínas variantes, polimorfismo na sequência de DNA e variação na repetição do DNA. Entre os mais importantes marcadores e as técnicas utilizadas para sua detecção, encontram-se as alozimas, polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*), polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD - *randomly amplified polymorphic DNA*), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP - *amplified fragment length polymorphism*), polimorfismo de nucleotídeo único (SNP - *single nucleotide polymorphism*), entre outros. Para o ambiente marinho, as vantagens dessas técnicas incluem: aumentar o conhecimento sobre relações filogenéticas, diferenciar estágios de vida iniciais de espécies morfologicamente próximas e variação genética de organismos dentro de uma população. A seguir serão descritos os principais marcadores moleculares utilizados nas áreas biológicas.

### 2.1 ALOZIMAS

Alozimas foram os primeiros marcadores moleculares utilizados, já nos anos 60. Sua nomenclatura foi originada da junção das palavras 'allelic variants of enzymes', traduzido como 'variantes alélicas de enzimas'. Esses marcadores são definidos como formas variantes de uma enzima devido a diferenças alélicas, com estruturas moleculares diferentes, porém com função catalítica similar. A forma alélica alternativa de uma enzima ocorre como consequência de substituições de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, o que resulta em uma alteração da composição da proteína. Essas mudanças podem resultar em diferentes produtos proteicos que irão migrar de forma alternativa (em diferentes tempos e velocidades), de acordo com seus diferentes tamanhos e cargas, visualizados na forma de bandas (alelos) em um gel de eletroforese.

A metodologia geral utilizada para detectar a variação de alozimas inclui as etapas de extração, eletroforese e detecção. As frações proteicas, extraídas através da utilização de solventes, são adicionadas a um gel sólido (ex.: acrilamida) e colocadas em um sistema de eletroforese, que é uma técnica de separação baseada no deslocamento de moléculas carregadas em um campo elétrico. Pelo fato de a maioria das proteínas possuírem carga negativa, elas migram do ponto inicial cátodo (negativo) para o final ânodo (positivo). Assim, se a amostra de um indivíduo homocigoto para uma proteína for analisado, será observado apenas uma banda no gel, enquanto a de um indivíduo heterocigoto apresentará duas bandas.

A detecção de alozimas é considerada um método sensível, sendo efetivo mesmo com a utilização de baixas quantidades de material, que pode variar desde amostras de culturas bacterianas até fluidos animais. Além disso, a simplicidade, rapidez, baixo custo e necessidade de equipamentos simples para sua realização tornaram essa técnica amplamente utilizada para detecção de variações moleculares. O protocolo técnico dessa metodologia, após padroniza

ção, é facilmente ajustável para os diferentes tipos de amostras e espécies, e de fácil interpretação.

Por essas vantagens, as alozimas tiveram um impacto significativo nos estudos sobre a fauna marinha, pois foram amplamente utilizadas para diferenciar espécies de diversos organismos, especialmente de peixes. Elas são atualmente utilizadas na identificação de estrutura populacional, conservação genética, hibridização, herança de genes e mapeamento genético. Um exemplo dessa aplicabilidade foi o atum-azul (*Thunnus spp.*), que tem duas espécies morfológicamente muito similares que costumavam ser confundidas, o que aumentava o risco de extinção de uma delas. Isso foi resolvido por meio de análises espécie-espécie por alozimas e DNA mitocondrial (conforme explicado a seguir). O mesmo aconteceu para os peixes *Argyrosomus spp.*, *Zacco spp.*, *Mullus spp.*, *Merluccius spp.* e para o crustáceo *Pseudocalanus spp.* Além disso, a técnica é capaz de identificar organismos híbridos de origem natural ou artificial originados do cruzamento genético de duas espécies diferentes, como observado para híbridos de *Haliotis laevigata* e *H. rubra*. Também já foram detectados polimorfismos na enzima lisossomal leucina aminopeptidase no molusco *Ruditapes philippinarum*, provavelmente devido a uma adaptação à variação ambiental.

Entretanto, essa metodologia apresenta algumas desvantagens, como a não detecção de mutações nulas, isto é, alteração de nucleotídeo na sequência de DNA que não alteram a proteína codificada ou mudanças na cadeia polipeptídica que não alteram a migração em um gel eletroforético. Além disso, ela detecta apenas genes bastante expressos, e possui baixo número de marcadores, o que levou à diminuição do número de pesquisas utilizando esse marcador ao passar dos anos.

### 2.2 DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

Uma pequena porcentagem (<1%) do DNA de células eucarióticas encontra-se fora do núcleo celular, sendo esse o DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA é um genoma extra-cromossomal presente no interior das mitocôndrias e que tem como característica ser herdado apenas da linhagem materna, não havendo contribuição paterna.

Os marcadores de DNA mitocondrial são considerados uma classe separada da classe de DNA nuclear devido a suas diferentes dinâmicas evolutivas: o DNA mitocondrial tem uma taxa evolutiva muito maior comparado com o genoma nuclear. Estudos em algumas espécies de vertebrados mostraram que diferentes sequências se acumulam mais rapidamente no DNA mitocondrial do que no nuclear, provavelmente devido às altas taxas de mutação resultantes da falta de mecanismo de reparação durante a replicação e do menor tamanho populacional efetivo devido à estreita herança materna do genoma mitocondrial haploide. Além disso, regiões não codificantes do DNA mitocondrial, como a região "D-loop", onde é iniciada tanto a replicação quanto a transcrição de moléculas, apresentam níveis elevados de variação na sequência codificante, como no gene citocromo b. Isso ocorre provavelmente devido à pressão seletiva relaxada.

Devido à sua alta taxa evolutiva, as análises por meio de mtDNA são utilizadas para construção de filogenias e verificação das interferências evolutivas, muito úteis para comparação

intra e interespécies. Ajudaram a relacionar espécies evolutivamente próximas e a investigar a estrutura da variação entre os vertebrados, incluindo peixes, pássaros, répteis e mamíferos. Em organismos marinhos, foi possível identificar ovos e larvas de peixe-agulha que eram morfológicamente muito similares. Em um estudo de Hyde e colegas (2005), foram identificadas sete larvas de peixes coletadas da costa Kona, no Haváí. Verificou-se que cada uma dessas larvas tinha uma sequência única de mtDNA, indicando que tinham “mães” diferentes, e que o local era uma região de reprodução das espécies. A análise de variação de mtDNA também já foi utilizada para revelar diferenciação populacional, como em esperma de baleias ao longo de bacias oceânicas. Além disso, mtDNA possibilita verificar perda ou não de diversidade genética de ancestrais comparados com seus descendentes.

A detecção de variações em mtDNA é amplamente realizada por meio da técnica de RFLP, descrita abaixo. A análise pode ser feita por RFLP utilizando todo mtDNA purificado de um tecido digerido por enzimas endonucleases ou pode ter fragmentos de seu DNA sequenciados após amplificação por PCR (descrito posteriormente).

### **2.3 RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)**

Os RFLPs foram descobertos nos anos 70 e foram um dos pioneiros no conceito de análise de variações no DNA como marcadores genéticos, sendo utilizados na área de ciência forense e outras. Eles são referenciados tanto como técnica quanto como marcador, pelo fato de a técnica molecular utilizada para gerar os RFLPs ser necessária para a visualização dos polimorfismos nas regiões de interesse. Assim, o RFLP é uma técnica que utiliza a ação de uma endonuclease para gerar fragmentos de restrição de DNA com tamanhos variados, de acordo com cada polimorfismo existente. Isto é, essa metodologia foi desenvolvida para visualizar as diferenças na estrutura do DNA de indivíduos por meio do uso de enzimas de restrição bacterianas, que cortam o DNA em locais onde há a presença de uma sequência de nucleotídeos específica. Em outras palavras, quando o DNA de diferentes indivíduos (com diferentes polimorfismos) é digerido por enzimas de restrição, pode-se averiguar diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA (os RFLPs). Essas diferenças se dão por mudanças evolutivas nas sequências de nucleotídeos entre os indivíduos, que podem ser resultado de mutações pontuais, deleções, inserções, inversões ou translocações nos cromossomos. A identificação das variações por essa metodologia requer a utilização de gel de eletroforese para separar os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, seguida pela transferência dos fragmentos para uma membrana de nylon (Southern blot) e visualização de uma sequência específica de DNA por meio de sondas radioativas ou quimioluminescentes expostas a um filme de raio-X.

Os primeiros dados gerados utilizando o RFLP foram realizados em vírus e com o gene da globina humana. A partir disso, essa técnica começou a ser amplamente utilizada na área biotecnológica, sendo que o primeiro mapa genético do DNA e o primeiro estudo de associação genética foram realizados com base nesses marcadores moleculares. Além disso, análises por RFLP do DNA mitocondrial (mtDNA) e DNA ribossomoal (rDNA) foram aplicadas tanto na genética populacional quanto na sobrevivência biogeográfica e filogenética. No caso de identificação de organismos marinhos, essa técnica já foi utilizada para diferenciar diversas espécies de lar

vas de lagostas (*Panulirus argus*, *P. guttatus* e *P. laevicauda*) e moluscos (*Mytilus trossulus* e *M. galloprovincialis*). É bastante comum identificar marcadores RFLP em regiões bem conservadas evolutivamente, como nos genes 16s rRNA, 18s rRNA e 28s rRNA, explicados de forma mais detalhada no decorrer deste capítulo.

Algumas desvantagens dessa metodologia, que atualmente já não é muito utilizada, incluem a grande demanda de tempo para realizá-la e também a necessidade de uma grande quantidade de amostra, em comparação com outras técnicas mais modernas.

### 2.4 MINISSATÉLITES

Os minissatélites são definidos como unidades de repetições em *tandem*, ou seja, são sequências específicas de DNA que se repetem uma atrás da outra (ex.: AAACCTAAACCTAAACCT). Essas sequências repetidas são denominadas de core. Assim, cada uma dessas unidades contém um core de 12-16 nucleotídeos e duas sequências flanqueadoras do mesmo. É comum, ao longo do genoma, haver loci com o mesmo core, mas regiões flanqueadoras distintas. Por isso, quando há uma hibridização de uma sonda com a sequência core, o resultado é um perfil multibanda, único para cada indivíduo. De forma similar ao que é realizado no RFLP, as análises de minissatélites iniciam-se com a digestão do DNA genômico com enzimas de restrição para verificar mudanças no número de repetições em *tandem*.

As taxas extremamente altas de polimorfismo nos minissatélites geraram uma grande revolução na identificação genética dos indivíduos, originando uma técnica chamada de fingerprinting (análise de sequências repetitivas em diversos loci do DNA capaz de diferenciar indivíduos). Os minissatélites são considerados ideais para identificação individual, e têm sido utilizados para deduzir relação genética entre indivíduos aleatórios de uma mesma população. Além disso, já foram aplicados na detecção de variação genética em populações de peixes, diferenças populacionais de acordo com localização geográfica e estimação de sucesso do acasalamento.

### 2.5 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES COM BASE NA TÉCNICA DE PCR

A principal descoberta na área dos marcadores moleculares, que permitiu sua aplicação em estudos em nível molecular para diversas áreas, incluindo ecologia marinha, foi a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*). A PCR foi desenvolvida por Kary Mullis nos anos 1980. Essa técnica possibilitou a amplificação de fragmentos específicos de DNA de um genoma complexo e de amostras de tecidos pequenos e mal preservados, sendo por isso classificada como uma metodologia sensível (necessidade de baixas concentrações de amostra). Os produtos da amplificação da PCR do DNA de diferentes indivíduos são analisados pela determinação tanto do tamanho quanto de sua sequência.

A PCR consiste na geração de milhões de cópias de um segmento específico de DNA. Esse processo necessita da ação da enzima DNA polimerase, responsável por sintetizar uma fita de DNA complementar utilizando como modelo a fita de DNA original. Essa enzima, entretanto, só pode adicionar um novo nucleotídeo em um grupo 3'-OH livre, e para isso são necessá-

rios *primers*, também chamados iniciadores moleculares (sequências curtas de nucleotídeos), para que o primeiro nucleotídeo seja adicionado e inicie, assim, as reações em sequência. Isso possibilita delinear uma região de sequência específica que se deseja amplificar.

Explicando a metodologia de forma mais detalhada: para a realização da reação de PCR são necessários diversos componentes químicos: (i) uma pequena quantidade de DNA que serve como modelo inicial ou sequência-alvo; (ii) um par de *primers* desenhados para ligar um em cada extremidade da sequência-alvo; (iii) DNA polimerase; (iv) quatro dNTPs, nucleotídeos sintéticos para Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) e Tirosina (T); (v) volume de íons e sais.

A PCR mimetiza o processo natural de replicação do DNA que ocorre nas células. Para isso, realiza diversos ciclos de aumento e diminuição de temperatura. Cada um desses ciclos é dividido em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão.

- **Desnaturação:** inicialmente, o DNA da amostra é desnaturado pelo aumento de temperatura que varia entre 90 °C e 100 °C, havendo assim a separação da dupla-fita de DNA pela quebra das pontes de hidrogênio que as conectam.
- **Anelamento:** em seguida, a temperatura inicial de interesse é alcançada (entre 30 e 65 °C) e mantida por alguns minutos. Isso permite que os *primers* se liguem na sua sequência complementar no DNA de fita simples.
- **Extensão:** durante a fase final, a amostra sofre novamente um aquecimento (entre 60 e 75 °C), temperatura ideal para o funcionamento da enzima DNA polimerase. Essa enzima então se liga aos *primers* e inicia a extensão da fita complementar utilizando como modelo a fita simples de DNA original. Isso ocorre pela adição dos dNTPs correspondentes à sequência da fita de DNA, gerando uma cópia idêntica da sequência de interesse. Esse processo resulta em uma duplicação do DNA original, no qual cada molécula nova contém uma fita nova e uma fita antiga de DNA. O ciclo é repetido de 30 a 40 vezes, gerando bilhões de cópias idênticas desse segmento específico de DNA.

A PCR é utilizada para identificar diversos marcadores moleculares, sendo os mais populares (eficientes para a análise da estrutura populacional intraespecífica) os loci de microsatélite e sequência de repetições únicas (SNP).

### 2.5.1 MICROSSATÉLITES

Os microsatélites foram os primeiros a serem amplificados pela técnica de PCR. Da mesma forma que os minissatélites, os microsatélites são sequências com repetições simples em *tandem*, que variam de um a seis pares de base (ex.: ACA, GATA) e se repetem em média de cinco a vinte vezes. São abundantes no genoma nuclear de todas as espécies e estima-se uma frequência de um em cada 10 kilobases (kb) em peixes, isto é, há presente, em média, um microsatélite a cada mil pares bases. Na literatura, os microsatélites já foram referenciados com outras nomenclaturas como número variável de repetições em *tandem* (VNTRs, *variable*

*number of tandem repeats*), como polimorfismos de comprimento de sequência única (SLPs, *simple sequence length polymorphisms*) e repetições de sequência simples (SSP, *simple sequence repeats*).

Por seu tamanho reduzido, os loci de microssatélites podem ser amplificados por PCR, e suas sequências são utilizadas como base para o desenho dos *primers*. Essas regiões (loci) são altamente polimórficas, muito frequentes e distribuídas ao longo do genoma e em todos os cromossomos, mas especialmente na eucromatina (local do DNA na cromatina onde os genes encontram-se ativos e ocorre a síntese de RNA), o que permite sua utilização em mapeamento genético e genética populacional.

A utilização de microssatélites apresenta a vantagem de necessitar de pequenas quantidades de DNA (por ter como base a técnica de PCR), além de serem bons marcadores para análise de parentesco, filogenia e para estimar o grau de proximidade entre indivíduos de uma população. Já as desvantagens incluem o alto preço e tempo de execução. Na ecologia marinha, são utilizados para identificar espécies de peixes, migração e predominância de população em um determinado hábitat (ex.: salmões, golfinhos, trutas).

### 2.5.2 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNP)

O SNP faz parte da terceira geração de marcadores moleculares. Foi primeiramente descrito por Lander, em 1996. É utilizado para investigar variação genética entre diferentes espécies de animais. Os SNPs são descritos como polimorfismos causados por mutações pontuais, em um único nucleotídeo no genoma, isto é, quando um único nucleotídeo (A, T, C ou G) em uma determinada sequência é substituído, inserido ou deletado. Isso resulta em diferentes alelos que contêm bases nucleotídicas diferentes em uma determinada posição dentro de um *locus*. Eles representam o polimorfismo mais abundante em todos os organismos vivos, tanto em regiões codificantes quanto em não-codificantes. As causas para que ocorram esses polimorfismos incluem transições de base única, transversões, inserções e deleções, sendo a mais comum a transição (troca de uma purina por outra ou de uma pirimidina por outra).

Os SNPs têm algumas propriedades que os tornaram populares no mundo científico: são abundantes no genoma, são geneticamente estáveis, seus marcadores são capazes de detectar doenças multifatoriais em seres humanos e de identificar polimorfismos “escondidos”, que não eram detectados por meio de outros marcadores e métodos. Todavia, fazem-se necessários ensaios automatizados para a detecção de SNPs, podendo ser utilizados métodos baseados no uso de gel ou não. No caso da utilização de gel, *primers* específicos são desenhados para amplificar alelos positivos (ocorre hibridização entre *primer* e amostra). Já nos métodos que não utilizam géis, as regiões de interesse são amplificadas e detectadas por técnicas como cromatografia, espectrometria de massas, microarranjo ou por fluorescência.

A descoberta desses marcadores foi importante tanto para o mundo animal quanto para os seres humanos, pois possibilitou analisar estrutura populacional, diferenciação genética, origem e pesquisa sobre evolução. Além disso, possibilitou o diagnóstico de doenças por meio marcadores específicos, inclusive em animais marinhos como peixes.

### 2.5.3 DNA BARCODING

Um *DNA barcode* refere-se a uma sequência curta de DNA em uma região bem estabelecida do genoma, utilizada para identificar espécies. O objetivo desse marcador é averiguar em larga escala um ou mais genes de referência para classificar indivíduos desconhecidos dentro de uma espécie ou para descobrir novas espécies.

Tautz e Paul Hebert foram os dois pesquisadores que sugeriram o uso do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI), um gene mtDNA, como uma sequência comum entre os animais para o estudo de *DNA barcoding*. Dessa forma, o barcode é identificado por meio de *primers* de PCR para amplificar e sequenciar fragmentos de aproximadamente 600 pares de base (pb) do gene COI, que posteriormente são comparados com um banco de dados de sequências conhecidas de espécies previamente identificadas. Essa técnica possibilita identificar espécies relacionadas e também sua frequência em diversos filos.

O *DNA barcoding* tem acurácia de quase 98% e fornece uma estratégia de identificação rápida para diversidade genética de animais, incluindo organismos desconhecidos. Como exemplo, podemos citar o estudo de Raupach et al. (2015) que montou uma biblioteca com mais de 1330 sequências de *DNA barcode*, cobrindo 205 espécies de crustáceos marinhos coletados no mar do hemisfério norte até 2015. Eles provaram que essa metodologia é efetiva para identificação e análise de crustáceos, além de ser uma etapa importante para estudos modernos de biodiversidade. As desvantagens dessa técnica incluem a dificuldade de obter fragmentos do genoma e a impossibilidade de identificação de alguns organismos pelo gene COI devido às baixas taxas de evolução da sequência de COI em algumas espécies.

### 2.5.4 RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)

A técnica de RAPD baseia-se em amplificações randômicas de *locus* desconhecido por meio da reação de PCR. Os RAPDs, assim como os RFLPs, são também considerados tanto técnica quanto marcador, pois a tecnologia molecular utilizada para gerar os RAPDs é necessária para que haja a identificação dos polimorfismos de interesse, os randômicos nesse caso. Essa tecnologia possibilita uma rápida e eficiente varredura no genoma por sequências de DNA polimórficas em um grande número de *loci*. A principal vantagem é não ser necessário conhecimento prévio sobre as sequências do DNA de interesse ou da organização do genoma. Além disso, permite que um grande número de loci e indivíduos possam ser analisados simultaneamente. É uma técnica simples, rápida e barata e necessita de pequena quantidade de amostra para a hibridização molecular dos *primers*.

O princípio do RAPD baseia-se no uso de *primers* de oligonucleotídeos (sequências curtas), capazes de se ligar em diferentes *loci* e em múltiplos locais no genoma, para amplificar sequências aleatórias de um DNA complexo (os RAPDs). Isso permite detectar altos níveis de polimorfismo no DNA. Além disso, a estratégia é capaz de detectar tanto sequências de DNA codificantes quanto não-codificantes, e os segmentos polimórficos que mais trazem informações relevantes são os derivados de sequências repetitivas (não-codificantes).

Entre suas aplicações, constatou-se sua habilidade de identificar *fingerprints* especi-

ficos de espécies em diversos peixes, possibilitando, assim a determinação de suas relações taxonômicas. Entre os exemplos de diferenciação de espécies ou relação genética, através de marcadores RAPDs, estão os peixes do gênero *Barbus*, da família dos ciprinídeos (como carpas), lambari tambuí (*Astyanax altiparanae*), *Mullus surmuletus*, *Salmo trutta* e dourado (*Sparus aurata*).

As desvantagens dos marcadores RAPD são: detecção dos polimorfismos somente na presença ou ausência de uma banda com peso molecular determinado, não havendo informações sobre heterozigotidade; difícil reprodutibilidade e dificuldade de análise devido ao grande número de produtos gerados.

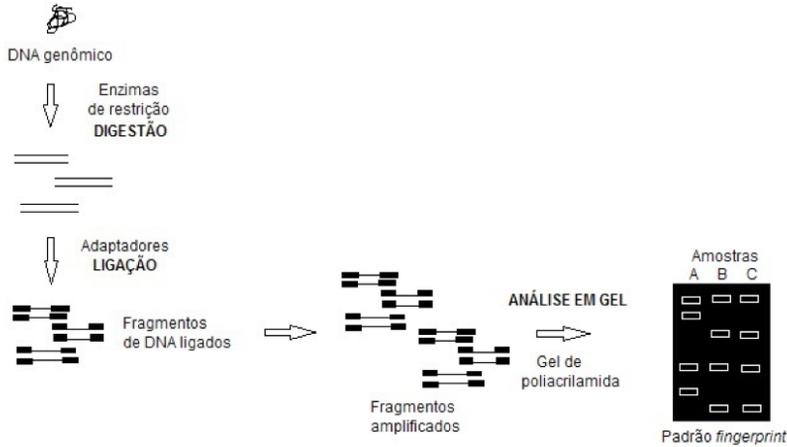
### 2.5.5 AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS (AFLP)

Os marcadores AFLPs (também considerado uma técnica) são os mais abrangentes em suas aplicações nas análises de variação genética em nível de espécie, principalmente na investigação estrutural de população e suas diferenças. É uma técnica de *fingerprinting* que permite uma rápida análise do genoma inteiro sem conhecimento prévio de suas sequências. A metodologia baseia-se na amplificação de fragmentos de restrição por PCR, gerados a partir de um DNA genômico digerido por endonucleases. Os polimorfismos moleculares são identificados com base na presença ou ausência de sequências curtas de DNA reconhecidas por essas enzimas de restrição em diversos locais dentro do genoma. A variação da presença ou ausência desses segmentos promove um padrão de bandas diferentes em um gel de eletroforese, resultantes dos diversos produtos de PCR (varia de acordo com o indivíduo).

Estudos com AFLP não necessitam de *primers* espécie-específicos e são realizados em quatro etapas: (i) digestão do DNA genômico por duas enzimas de restrição; (ii) ligação de adaptadores de oligonucleotídeo dupla-fita nas extremidades de cada fragmento de DNA gerado; (iii) amplificação dos fragmentos por PCR através da utilização de *primers* complementares à sequência dos adaptadores; (iv) análise em gel desnaturante de poliácridamida dos padrões gerados pelos segmentos de DNA amplificados (Figura 2).

As vantagens dessa técnica incluem o baixo custo e tempo, alta reprodutibilidade, alta resolução comparada com outros marcadores como RAPD, RFLP e microssatélites, e alta sensibilidade, provavelmente devido à presença de um grande número de marcadores. Sua aplicabilidade está incluída na genética de população, mapeamento quantitativo de traços de *locus* e detecção de polimorfismos. Uma vez que essa metodologia produz um *fringerprint* genético, pode ser utilizada para verificar a conexão entre populações. Entretanto, AFLPs são marcadores bialélicos dominantes, não sendo possível distinguir indivíduos homozigotos ou heterozigotos dominantes.

AFLP tem sido utilizada também em estudos de genética ecológica. Por exemplo, Shank e Halanych (2007) identificaram variações genéticas dentro da espécie do verme de águas profundas *Riftia pachyptila*. O estudo de Gruenthal (2007) verificou essas variações em *Haliotis rufescen* (concha abalone vermelho) e Hoffman (2012) analisou polimorfismos em animais marinhos da Antártica, desde corais até peixes de mar aberto. Além disso, AFLPs podem realizar um "scan genômico" que permite analisar associações entre marcadores específicos e hábitat.



**Figura 2.** Esquema das quatro etapas básicas para identificação por AFLP.

## 2.6 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA IDENTIFICAR MARCADORES MOLECULARES

### 2.6.1 SEQUENCIAMENTO

Outro método capaz de identificar a sequência genômica dos seres vivos é o sequenciamento. O sequenciamento do DNA é a determinação da ordem sequencial dos nucleotídeos de um gene. Essa tecnologia começou a ser utilizada nos anos 1975, com o desenvolvimento do sequenciamento de Sanger, metodologia que mimetiza o processo de replicação do DNA e foi estabelecida por Sanger, um cientista ganhador do Prêmio Nobel por suas contribuições sobre sequenciamento de bases nos ácidos nucleicos.

O sequenciamento de Sanger é capaz de definir a ordem das bases nitrogenadas por meio de dideoxinucléotídeos trifosfatos (ddNTPs), isto é, nucleotídeos modificados que impedem a continuação do crescimento da fita de DNA durante a replicação. Eles são chamados de moléculas terminadoras, pois não apresentam o grupamento 3' hidroxila (OH) disponível, necessário para formar a ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos, causando, assim o fim do alongamento da fita. Essas terminações geram um grande número de fragmentos de DNA com diferentes comprimentos. Tais fragmentos são então separados por tamanho através de sua aplicação em um gel de eletroforese e cada tamanho de banda no gel representa um dos nucleotídeos (A, T, G ou C), indicando assim sua posição na sequência do DNA.

Portanto, cada reação para o sequenciamento é composta por um DNA amostral, *primers* específicos para iniciar a replicação (nos quais a enzima DNA polimerase se liga), quatro dideoxinucléotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e DNA polimerase. Após o início do processo, os dideoxinucléotídeos são adicionados à fita complementar de acordo com a ordem nucleotídica da fita molde do DNA amostra.

Ao longo do tempo, o sequenciamento foi sendo aprimorado e automatizado. Uma dessas novas estratégias foi responsável por adicionar fluoróforos aos ddNTP, permitindo que as reações fossem lidas por coloração. Ou seja, cada dideoxinucléotídeo é marcado com uma cor

diferente, permitindo que seja identificada a ordem dos nucleotídeos em um equipamento específico que identifica as diferentes cores. A partir dos anos 90, surgiram novas técnicas de sequenciamento que ficaram conhecidas como “sequenciamento de nova geração”, que envolvem a adição de outras moléculas identificadoras para cada ddNTP.

Da mesma forma que o sequenciamento foi utilizado em diversas áreas de estudo, ele foi extremamente útil para a investigação dos genomas de organismos marinhos. Isso permitiu que estudos sobre evolução genômica e conservação fossem avaliados; permitiu a identificação de organismos com pequenas quantidades de amostra, já que a extração de DNA de qualidade suficiente é difícil para organismos marinhos devido às suas altas concentrações de polissacarídeos, fenóis e metabólitos secundários. Também, por ser uma metodologia bastante sensível, o sequenciamento possibilitou o reconhecimento genômico de espécies por meio da extração de DNA de apenas um indivíduo, já que espécies marinhas apresentam grandes populações com genomas altamente variáveis, especialmente invertebrados e algas.

### 2.6.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR) é uma técnica com princípio similar ao da PCR tradicional, porém com algumas diferenças, incluindo: (i) na RT-qPCR, os dados são coletados a cada ciclo através da emissão de fluorescência que ocorre em decorrência da incorporação de marcadores de fluorescência no produto de PCR durante a amplificação; ou seja, a quantidade de produto amplificado é proporcional à fluorescência gerada em cada ciclo, e isso é captado por um equipamento específico. Na PCR convencional, os dados são analisados apenas no final do processo e são visualizados em gel; (ii) a RT-qPCR é utilizada para quantificar RNA mensageiro (mRNA), ou seja, RNA codificado durante o processo de transcrição (precursores das sequências que serão traduzidas em proteínas). Para fazer a quantificação do mRNA, faz-se necessário realizar a síntese de cDNA, um DNA complementar que utiliza como molde a sequência de RNA que foi extraída da amostra a ser analisada. Já a PCR tradicional quantifica diretamente o DNA da amostra.

As vantagens da RT-qPCR (dita quantitativa) em comparação com a PCR convencional (dita semiquantitativa) incluem maior rapidez, reprodutibilidade e habilidade quantitativa, além de ser mais sensível. O tempo real possibilita quantificar facilmente a expressão de um determinado gene e fazer a distinção entre espécies relativas próximas evolutivamente, devido a sua capacidade de diferenciar pares de base. Na PCR muitas vezes não é possível observar diferenças significativas de expressão.

Assim, a RT-qPCR pode ser utilizada como uma alternativa da PCR padrão para detectar os marcadores moleculares, citados anteriormente, que têm como base essa técnica.

## 2.7 GENES MARCADORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

### 2.7.1 GENE 16S rRNA

A amplificação da sequência do gene 16S rRNA é comumente realizada, pois ele codifica para subunidade menor ribossomal de organismos procariotos. Isso é feito por meio de PCR, utilizando-se *primers* específicos para as regiões conservadas do 16S rDNA, a fim de identificar e diferenciar os seres procarióticos, mais especificamente as bactérias. Devido ao seu alto grau de conservação com a presença de regiões de sequências variadas, o 16S rDNA é usado como um marcador filogenético. A sequência do 16S rDNA permite a identificação e afiliação taxonômica de diferentes seres vivos, incluindo linhagens microbianas presentes em amostras do meio ambiente. Além disso, essa técnica permite a identificação de organismos desconhecidos e fornece informações sobre a biodiversidade nos ambientes, inclusive o marinho. Apesar de suas vantagens, tem como limitação o fato de prover informações restritas à distribuição e fisiologia do organismo no ambiente natural.

**2.7.2 GENE 18S rRNA**

Assim como o gene 16S rRNA, a amplificação do gene 18S rRNA se dá por meio de *primers* específicos. Esse gene é um RNA ribossomal, componente nuclear da subunidade menor, presente em eucariotos. A identificação desse gene é popularmente utilizado em pesquisas sobre diversidade e já foi utilizado para identificar micróbios eucarióticos de ambiente marinho e para diferenciar organismos.

**2.7.3 GENE 28S rRNA**

Gene nuclear codificante para RNA da subunidade maior ribossomal de eucariotos. O gene 28S rRNA é utilizado para estudos de filogenética e *DNA barcoding*. Já foi utilizado para identificação da composição de espécies e distribuição de organismos, como exemplo, presença do DNA de crustáceos em sedimentos de lagos da Antártica.

**Quadro comparativo**

Existem diversas técnicas de biologia molecular que podem ser utilizadas para o estudo de organismos marinhos. As mais utilizadas estão descritas de forma resumida na Tabela 1.

**Tabela 1.** Comparação de técnicas mais utilizadas para identificação de marcadores moleculares.

TECNOLOGIA	BASE EM PCR	FACILIDADE DE USO	QUALIDADE DO DNA	POSSÍVEL AUTOMATIZAÇÃO	REPRODUTIBILIDADE
Alozima	Não	Sim	Alta	Baixa	Baixa
RFLP	Não	Não	Alta	Baixa	Alta
RAPD	Sim	Sim	Alta	Moderado	Baixa
AFLP	Sim	Sim	Moderada	Moderado	Alta
Microsatélite	Sim	Sim	Moderada	Alto	Alta

TECNOLOGIA	BASE EM PCR	FACILIDADE DE USO	QUALIDADE DO DNA	POSSÍVEL AUTOMATIZAÇÃO	REPRODUTIBILIDADE
SNP	Sim	Sim	Alta	Alto	Alta
DNA <i>Barcoding</i>	Sim	Sim	Alta	Alto	Alta

## 2.8 DESENVOLVIMENTO DE OUTRAS TECNOLOGIAS

A descoberta da PCR foi um marco histórico na análise de genoma e trouxe uma nova classe metodológica capaz de detectar marcadores de DNA: as sondas. Para estudos básicos em laboratórios de biologia molecular, as sondas normalmente são usadas para identificação e isolamento de genes ou sequências relativas. Em teoria, qualquer ácido nucleico pode ser utilizado como uma sonda, desde que seja possível identificar e quantificar moléculas híbridizadas formadas pela junção da sonda com a sequência específica a ser detectada.

Após a hibridização, as sondas devem transmitir um sinal para que seja feita a detecção da sequência homóloga. Para isso, costuma-se adicionar à sonda um sinalizador, que pode ser um isótopo radioativo ou moléculas-sinais não-radioativas, como anticorpos fluorescentes, enzimas que realizam a troca de cor do meio ou compostos quimioluminescentes, que não interfiram na hibridização da sonda.

- **Sondas com marcação radioativa:** é considerado o método mais sensível de detecção. Há diversos tipos de isótopos disponíveis e eficientes quanto ao tempo de exposição necessário para permitir sua detecção, além de ter um bom sinal. Entre eles estão  $^{32}\text{P}$  e  $^{35}\text{S}$  que apresentam rápida detecção.
- **Sondas com marcação não-radioativa:** técnicas que utilizam marcações alternativas aos radioisótopos têm se tornado populares. Um exemplo disso é a utilização da biotina que tem afinidade com certos tipos de glicoproteína. Além disso, surgem alternativas, como a hibridização de ligantes aderidos à sonda com proteínas específicas que podem ser marcadas com moléculas enzimáticas ou fluorescentes. Isso permite que várias sondas sejam monitoradas simultaneamente, desde que cada ligante emita sinais diferentes.

As sondas quimioluminescentes também são eficientes. Seu sistema é baseado no uso de duas diferentes sondas que são complementares a um segmento de DNA e se ligam nas extremidades opostas de um determinado gene. O primeiro marcador é um quimioluminescente complexo que emite um determinado comprimento de onda, capaz de excitar a molécula presente na outra sonda, e esta, por sua vez, é capaz de emitir luz em um comprimento de onda diferente, que pode ser detectado por um equipamento fotomultiplicador. Contudo, para que o sistema seja efetivo, as duas sondas devem hibridizar no local correto e a transferência energética depende da distância entre ambas.

As aplicabilidades das sondas são inúmeras. Entre elas estão: identificação de RFLP para estudos de evolução, mapeamento e relação espécie-específica, hibridização *in situ* (FISH) (descrito abaixo) e isolamento de genes. Além disso, as sondas podem diferenciar espécies por

meio de dois diferentes métodos de preparo: (i) mantendo a célula estudada intacta, possibilitando, inclusive, uma análise morfológica, como no caso da utilização de sondas marcadas com moléculas fluorescentes (ex.: FISH), que são hibridizadas com ribossomos presentes na amostra para detecção dos mesmos por meio de microscopia ou citometria de fluxo; (ii) extração dos ácidos nucleicos e aplicação das sondas para hibridização com ácido nucleico de interesse (microarranjo, biossensores), ou para amplificar regiões de barcode (através de RT-qPCR). Nesse caso, a detecção da sonda é feita por colorimetria ou eletroquímica.

### 2.8.1 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* OU FISH

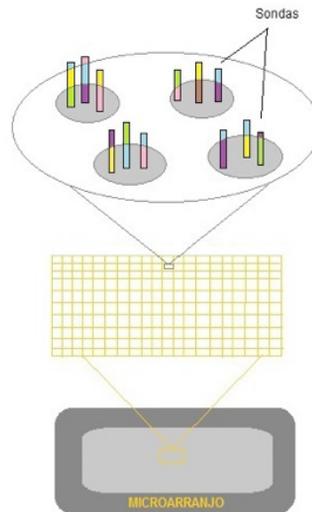
A técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) permite investigar a estrutura do padrão genético de uma população sem utilizar sequências específicas amplificadas por PCR e sem a necessidade de fazer cultivo de micro-organismos. Ela é capaz de detectar sequências de DNA ou RNA em uma secção tecidual diretamente e em cromossomo metafásico, sem alterar a morfologia da célula ou tecido, através da visualização direta através de microscópios óticos capazes de detectar fluorescência.

A FISH é baseada na formação de uma dupla fita híbrida devido à ligação do segmento-alvo de DNA ou RNA com uma sonda fita simples complementar marcada com fluorescência (dita marcação direta) ou com hapteno, uma molécula pequena que quando se liga a uma proteína leva a uma resposta imune (marcação indireta). A hibridização entre DNA alvo e sonda é averiguada ou pela detecção da fluorescência ou pela utilização de sistemas de detecção enzimática ou imunológica. Apesar de a metodologia de marcação direta ser mais rápida, a marcação indireta tem como vantagem ter um sinal mais amplificado devido à presença de vários anticorpos gerando esse sinal. Um exemplo da utilização de FISH é a produção de sondas específicas de rRNA que permitem a identificação filogenética de bactérias marinhas. Essas sondas são observadas por meio de microscopia confocal ou fluorescência. A sensibilidade de análises por FISH 16S rRNA, por exemplo, se dá pelo fato de haver um alto número de ribossomos por célula e cada ribossomo contém uma cópia de 16S rRNA, promovendo assim um forte sinal fluorescente.

### 2.8.2 MICROARRANJO (EM INGLÊS, *MICROARRAY*)

O microarranjo é uma técnica em que barcodes (sequências de DNA conhecidas) sintéticos estão aderidos em posições definidas em regiões microscópicas de uma superfície de vidro, formando assim uma matriz (Figura 3). Cada molécula de DNA aderida na matriz funciona como uma sonda para detectar expressão gênica, também chamado de transcriptoma ou transcritos de mRNA expressos por um grupo de genes. Se esses barcodes identificarem espécies, o microarranjo é também chamado de *filochip*.

As etapas para a realização de um experimento de microarranjo incluem: (i) produção de *microarranjo*; (ii) isolamento e preparação da amostra; (iii) hibridização e (iv) análise dos resultados. Antes da hibridização, os ácidos nucleicos alvos (amostra) são fragmentados para ficar em um tamanho determinado e posteriormente são marcados com molécula fluorescente.



**Figura 3.** Ilustração esquemática de um sistema de microarranjo.

Esses segmentos, quando encontram uma sonda de sequência complementar na matriz, se ligam a ela (hibridizam). Então, esse sistema passa pela identificação em um equipamento que verificará se há fluorescência hibridizada nas sondas (se há expressão de um gene específico).

*Filochips* têm sido utilizados para identificar fitoplâncton como algas tóxicas e bactérias marinhas. Microarranjo já foi utilizado para detectar patógenos nas águas do rio Tibre, na Itália, para verificar a qualidade da água, por exemplo.

### 2.8.3 BIOSSENSORES

Os biossensores podem fazer a detecção de quimioluminescentes ou eletroquímicos por meio da técnica de hibridização sanduíche. Nesse caso, uma sonda, dita captadora, é aderida e imobilizada em uma superfície. A amostra de DNA ou RNA de interesse é adicionada ao sistema e liga-se nas sondas aderidas (quando complementares). Posteriormente, uma segunda sonda, chamada de sonda sinalizadora, liga-se também à sequência-alvo, formando um sanduíche. Um anticorpo para detectar a sonda sinalizadora é acoplado com uma enzima capaz de converter substratos inativos a um produto passível de detecção colorimétrica. Ou seja, cor indica hibridização das sondas com a amostra. Essa técnica é considerada sensível, com boa acurácia, versátil, rápida e barata. É utilizada para identificação de espécies e, assim como o microarranjo, para identificação de algas tóxicas, por exemplo.

## 3 | CONCLUSÕES

Os oceanos cobrem cerca de 70% da superfície da Terra, e deles mais de 240.000 es-

pécies de organismos já foram descritos. Tornou-se possível observar mais detalhadamente o tamanho de sua riqueza e diversidade após a descoberta da codificação da informação genética e os avanços em pesquisas nas áreas de biologia molecular e biotecnologia. Essas tecnologias são importantes ferramentas tanto para a caracterização e identificação das peculiaridades de espécies e populações, como para o aproveitamento de recursos valiosos ainda pouco explorados, como compostos e metabólitos secundários com potencial efeito farmacológico. No decorrer das últimas décadas, diversas metodologias foram sendo desenvolvidas a fim de aumentar a compreensão sobre a evolução dos organismos vivos, verificando suas diferenças e similaridades genéticas. O ambiente marinho é repleto de vida, com imensa biodiversidade e, embora tenha recebido mais atenção dos cientistas nos últimos anos, ainda é pouco conhecido, reservando um potencial inestimável de recursos a serem trabalhados.

## REFERÊNCIAS

Al-Samarai, F.R; Al-Kazaz, A.A. (2015) **Molecular Markers: An Introduction and Applications**. Academic Publishing House Researcher. ISSN: 2310-6255(Print); 2409-1332(online). Disponível em: <[http://ejournal8.com/journals\\_n/1445499510.pdf](http://ejournal8.com/journals_n/1445499510.pdf)>.

Bergmann, W.; Feeney, R.J. (1950) The isolation of a new thymine pentoside from sponges. **J. Am. Chem. Soc.** 72: 2809-2810.

Burton, R.S. (2009) Molecular Markers, Natural history and conservation of marine animals. **BioScience**. 59(10): 831-840. doi: 0.1525/bio.2009.59.10.5

Chauhan, T.; Rajiv, K. (2010) Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. 1, 281-291. doi: 10.4236/abb.2010.14037.

Felício, R.; Oliveira, A.L.L.; Debonsi, H.M. (2012) Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Cienc. Cult.** [online]. 64(3): 39-42.

Féral, J.-P. (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 268(2): 121-145, ISSN 0022-0981. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098101003823>>.

Gruenthal, K.M; Acheson, L.K; Burton, R.S. (2007) Evidence for low connectivity among populations of the red abalone (*Haliotis rufescens*) in California. **Marine Biology**. 152: 1237-1248.

Hoffman, J.I.; Clark, M.S; Amos, W; Peck, L. S. (2012) Widespread amplification of Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) in marine Antarctic animals. **Polar Biol**. 35: 919-929.

Huang, R-M; Chen, Y-N; Zeng, Z.; Gao, C-H; Su, X.; Pen, Y. (2014) Marine Nucleosides: Structure, Bioactivity, Synthesis and Biosynthesis. **Marine Drugs**. 12: 5817-5838.

Hyde, J.R; Lynn, E.E.; Humphreys, R.Jr; Musyl, M.; West, A.P; Vetter, R. (2005) Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlin, shortbill spearfish, and wahoo. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 286: 269-277.

Kochzius, M. et al. (2010) Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. **PLoS One**. 5 (9): e12620. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20838643>>.

Learn.Genetics – Genetic Science Learning Center. (2017) **DNA Microarray**. Disponível em: <<http://learn.genetics.utah.edu/content/microarray/>>.

genetics.utah.edu/content/labs/microarray/>. Acesso em: 13 jun.

Lorenz, T.C. (2012) Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. **J Vis Exp**. 63: e3998. ISSN 1940-087X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664923>>.

Lv, J. et al. (2014) Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). **Parasit Vectors** 7: 93. ISSN 1756-3305. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589289>>.

Magoulas, A.; Kotoulas, G.; Batargias, C.; Zouros, E. (1997) Genetic markers in marine biology and aquaculture research, when to use what. **Proceedings of the Symposium Genetics and Aquaculture in Africa**, Abidjan, 1-4.

Maheswaran, M. (2004) Molecular markers: History, Features and Applications. **Advanced Biotech**. 17-24. Disponível em: <<http://online.anyflip.com/wxlk/yglm/mobile/index.html#p=1>>.

Medlin, L.K. (2016) Mini review: Molecular techniques for identification and characterization of marine Biodiversity. **Ann. Mar. Biob. Res**. 3: 1015.

Moradi, A.; Keyvanshokoh, S. (2013) Microsatellite DNA marker in aquatic organisms. **Scientific Journal of Biological Sciences** 2 (9): 184-189.

O'Connor, C. (2008) Fluorescence in situ hybridization (FISH). **Nature Education** 1(1): 171. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>>.

Okumus, I; Çiftci Y. (2003) Fish population genetics and molecular markers: II - Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Turk J Fish Aquat Sci**. 3: 51-79.

Raupach, M.J; Barco, A.; Steinke, D.; Beermann, J.; Laakmann, S.; Mohrbeck, I.; Neumann, H.; Kihara, T.C.; Pointer, K.; Radulovici, A.; Segelken-Voigt, A.; Wesse, C.; Knebelberger, T. (2015) The application of DNA barcodes for the identification of marine crustaceans from the North Sea and adjacent regions, **PLoS ONE**, 10 (9): e0139421. doi: 10.1371/journal.pone.0139421

Schlötterer, C. (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nat Rev Genet** 5(1): 63-69. ISSN 1471-0056. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14666112>>.

Shank, T.M.; Halanych, K.M. (2007) Toward a mechanistic understanding of larval dispersal: insights from genomic fingerprinting of the deep-sea hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. **Marine Ecology** 28: 25-35. doi:10.1111/j.1439-0485.2007.00146.x

Singh, U.; Deb, R.; Alyethodi, R.R; Alex, R; Kumar, S; Chakraborty, S; Sharma, A. (2014) Molecular markers and their applications in cattle genetic research: a review. **Biomarkers and Genomic Medicine**. 6(2): 49-58. doi: 10.1016/j.bgm.2014.03.001

Sweijid, N.A; Bowie, R.C.K; Evans, B.S; Lopata, A.L. (2000) Molecular genetics and the management and conservation of marine organisms. **Hydrobiologia**. 420: 153-164.

Vasavirama, K. (2013) Molecular probe and their applications. **International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research**. 2(2). ISSN 2250-3137. Disponível em: <[http://new.ijlbpr.com/ijlbpradmin/upload/ijlbpr\\_51835623c403f.pdf](http://new.ijlbpr.com/ijlbpradmin/upload/ijlbpr_51835623c403f.pdf)>.

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res**, 23(21): 4407-4414. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501463>>.

Wu, S.; Xiong, J.; Yu, Y. (2015) Taxonomic resolutions based on 18S rRNA genes: a case study of subclass Copepoda. **PLoS One**. 10 (6): e0131498. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

pubmed/26107258>.

Zaha, A.; Ferreira, H.B.; Passaglia, L.M. (2014) **Biología Molecular Básica**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed.





# BIODIVERSIDADE MICROBIANA: BACTÉRIAS, ARQUEIAS E VÍRUS

Gustavo Bueno Gregoracci<sup>a</sup>

Cintia Paula Jandre Rua<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de São Paulo

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

## RESUMO

Micro-organismos por definição incluem todos os organismos (mais os vírus) que não são visíveis a olho nu. Seu estudo tradicional naturalmente exige o uso de lentes para visualização ampliada, os microscópios. Alguma diversidade pode ser aferida dessa forma, principalmente empregando corantes diferentes e variações da microscopia ótica simples. Outra vertente clássica envolve o emprego de meios de cultura. Os micro-organismos podem ser estudados em laboratório dessa forma, em nível de população. Uma enorme quantidade de testes bioquímicos e condições experimentais permite a determinação de muitas características de cada organismo, incluindo caracteres importantes para distinção entre indivíduos e sua classificação. Vírus podem ser estudados quanto à morfologia, empregando microscopia eletrônica, e quanto à capacidade de infecção de determinados hospedeiros, após cultivo destes. No entanto, esse olhar clássico, ainda amplamente difundido na atualidade, é bastante limitado e subestima drasticamente a diversidade microbiana. Metodologias moleculares, incluindo técnicas da biotecnologia como bibliotecas de DNA, perfis de macromoléculas (DNA e/ou proteínas) e marcadores moleculares, oferecem ferramentas mais adequadas para prospectar a diversidade microbiana em ambientes naturais. Ferramentas moleculares já estabelecidas, como reação em cadeia da polimerase e sequenciamento genético (e suas versões mais atuais, PCR em tempo real e sequenciamento de alto desempenho) encontram ampla aplicação em estudos modernos de biodiversidade. Tais técnicas permitem interrogar comunidades microbianas complexas, tanto em aspectos de composição de organismos, como de funções bioquímicas, potenciais e desempenhadas em condições específicas. A microbiologia moderna encontra-se em um momento único e empolgante de sua história, em que temos ferramentas adequadas para avançar na compreensão da biodiversidade microbiana. Esse conhecimento possibilita uma série de estudos ecológicos, permitindo o entendimento de padrões e processos que afetam as comunidades naturais, de forma sem precedentes no campo. Além disso, abre caminho para aplicações biotecnológicas múltiplas, incluindo prospecção orientada de micro-organismos, prospecção molecular (mesmo independente de isolamento microbiano) e entendimento de processos como fermentação e biorremediação.

# 1 | O QUE É BIODIVERSIDADE

## 1.1 HISTÓRICO

O termo biodiversidade é comumente atribuído a Walter G. Rosen na organização de um congresso fomentado pela Academia de Ciências dos EUA e a Instituição Smithsonian. Originalmente fora empregado como contração de diversidade biológica (BIOlogical DIVERSITY) visando simplificar textos do evento. No entanto, acabou se firmando como neologismo, em um primeiro momento associado ao campo de conservação biológica, e atualmente suplanta largamente seu sinônimo, diversidade biológica (Takacs, 1996).

## 1.2 DEFINIÇÃO

A definição mais aceita de biodiversidade talvez seja a da Convenção sobre Diversidade Biológica de 1992 (Takacs, 1996):

Biodiversidade significa a variabilidade entre organismos vivos de todas as fontes, entre elas terrestre, marinha e de outros ecossistemas aquáticos, e os complexos ecológicos dos quais fazem parte; isso inclui a diversidade dentro da espécie, entre espécies e em ecossistemas. (tradução livre)

Esses três níveis comumente são associados ao termo, o que pode conferir-lhe certo caráter vago. Diversidade dentro da espécie é exemplificada com diversidade genética; diversidade entre espécies trata dos indivíduos e/ou populações, e diversidade em ecossistemas trata de populações e/ou comunidades em ambientes distintos. É difícil apontar um desses níveis como mais importante em relação aos demais, já que todos abordam algum aspecto relevante de diversidade biológica que não é compreendido nos demais níveis. Entretanto, biodiversidade é um termo de ampla aplicação, incluindo no contexto de micro-organismos e vírus. São objeto de estudo da microbiologia todos os organismos (mais os vírus) que são inferiores a cerca de 200µm, o que os torna invisíveis a olho nu (embora haja exceções à regra). A biodiversidade microbiana estuda a variabilidade desses micro-organismos em algum dos três níveis previamente descritos. O avanço tecnológico foi fundamental para estudos de biodiversidade microbiana, uma vez que métodos distintos permitem encontrar micro-organismos distintos, influenciando dramaticamente nossa compreensão do que é observado. Metodologias tradicionais, originalmente em contexto de saúde e agropecuária, recuperavam poucos micro-organismos, embora fossem bem-sucedidos para abordagem de patógenos de interesse médico, veterinário e/ou agrícola. Quando novas metodologias passaram a ser empregadas, permitiram amostrar uma enorme diversidade natural oculta, o que desencadeou mudanças no pensamento sobre ecologia microbiana e sobre o papel dos micro-organismos no planeta.

### 1.3 ALGUNS EXEMPLOS DE ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA

Woese, C.R.; Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 74 (11): 5088-5090; doi: 10.1073/pnas.74.11.5088

Mincer, T.J.; Jensen, P.R.; Kauffman, C.A.; Fenical, W. (2002) Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. 68(10):5005-5011. doi: 10.1128/AEM.68.10.5005-5011.2002.

Hazen, T.C.; Dubinsky, E.A.; DeSantis, T.Z.; Andersen, G.L.; Piceno, Y.M.; Singh, N.; Jansson, J.K.; Probst, A.; Borglin, S.E.; Fortney, J.L.; Stringfellow, W.T.; Bill, M.; Conrad, M.E.; Tom, L.M. Havarria, K.L.; Alusi, T.R.; Lamendella, R.; Joyner, D.C.; Spier, C.; Baelum, J.; Auer, M.; Zemla, M.L.; Chakraborty, R.; Sonnenthal, E.L.; D'haeseleer, P.; Holman, H.Y.; Osman, S.; Lu, Z.; Van Ostrand, J.D.; Deng, Y.; Zhou, J.; Mason, O.U. (2010) Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. **Science**. Oct 8;330(6001):204-8. doi: 10.1126/science.1195979.

Gouveia, L.; Oliveira, A.C. (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 36(2):269-74. doi: 10.1007/s10295-008-0495-6.

Tender, L.M.; Reimers, C.E.; Stecher, H.A. 3rd; Holmes, D.E.; Bond, D.R.; Lowy, D.A.; Pilobello, K.; Fertig, S.J.; Lovley, D.R. (2002) Harnessing microbially generated power on the seafloor. **Nat Biotechnol**. 20(8):821-5. doi: 10.1038/nbt716.

## 2 | ABORDAGENS METODOLÓGICAS

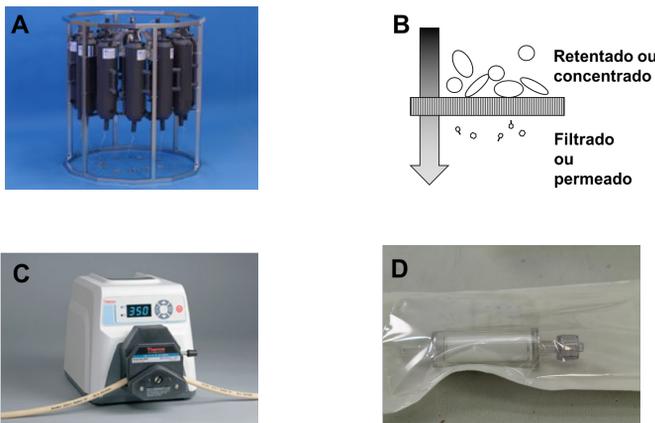
Há uma enorme variedade de métodos e técnicas para o estudo da biodiversidade microbiológica em seus diversos níveis, cada qual com particularidades, vantagens e limitações. Dessa forma, sem entrar em detalhes específicos, pode-se apenas ressaltar algumas linhas gerais. É importante notar que métodos novos permitem obter novos dados, que por sua vez modificam nossa compreensão sobre o mundo microbiano invisível que nos cerca, incluindo o vasto, dinâmico e multifacetado meio marinho.

### 2.1 COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS MARINHAS E ASSOCIADAS PARA MICROBIOLOGIA

O estudo da diversidade microbiana (vírus, arqueias e bactérias) no meio marinho envolve os mais diferentes materiais inorgânicos e orgânicos como fontes de amostras. É necessário imaginar que os micro-organismos, com dimensões extremamente reduzidas frente às nossas, lidam com o mundo em outra escala, com particularidades muito distintas do que estamos acostumados. Por exemplo, a coluna d'água, que nos parece uniforme (ainda que divisível em camadas [e.g. epi, meso, batipelágico] com características próprias), é heterogênea e desigual na escala microbiana. Forças difusivas são muito mais prevalentes, dado o reduzido coeficiente de Reynolds, e o próprio movimento das moléculas de água (browniano) influencia muito os micro-organismos, que permanecem constantemente em movimento passivo ou precisam desenvolver

estratégias de reorientação em movimentos ativos. O próprio metabolismo da comunidade microbiana complexa que habita tais microambientes, absorvendo nutrientes e excretando elementos de acordo com as condições ambientais, modifica constantemente esses locais. O papel desses micro-habitats heterogêneos ainda é alvo de estudos, e sua natureza dinâmica e efêmera é uma complicação adicional. Ainda assim, podemos descrever ao menos quatro tipos de amostras marinhas comuns para a microbiologia: água, sedimentos, biofilmes e amostras associadas a outros organismos (há certa sobreposição entre os dois últimos). Novas abordagens considerando micro-habitats certamente devem surgir nos próximos anos.

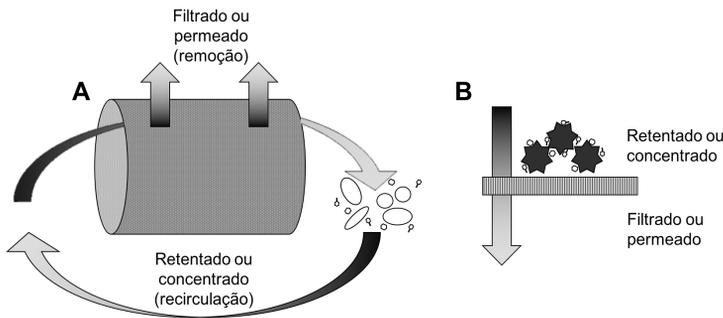
É relativamente fácil coletar amostras de água, embora águas profundas, sob pressão maior que a atmosférica, possam representar um desafio para recuperação de (micro-) organismos presentes. É possível empregar desde bombas manuais a garrafas de coleta em rosetas oceanográficas para recuperar volumes de amostra (Figura 1a). O desafio em geral é concentrar biomassa microbiana suficiente para estudos subsequentes, particularmente em relação aos vírus. Técnicas de filtração de impacto (Figura 1b), como filtros Sterivex® 0,22µm (Millipore) (Figura 1d), são frequentemente empregadas para células microbianas. É comum o emprego de seringas e bombas peristálticas (ou com diferença de pressão) (Figura 1c), para filtrar maiores volumes (litros a dezenas de litros) e concentrar mais biomassa.



**Figura 1.** A) Roseta oceanográfica contendo diversas garrafas para amostragem de água. B) Esquemas sobre métodos de filtração: filtração de impacto, com retenção de células, e passagem de partículas virais e água. C) bomba peristáltica para circulação de água. D) filtro Sterivex®.

Partículas virais planctônicas, por outro lado, possuem dimensões e biomassa ainda mais reduzidas, e necessitariam de poros muito reduzidos para ficarem no retentado, apesar de sua maior abundância em geral. Isso implica o rápido entupimento de filtros por partículas em suspensão antes da saturação do filtro com partículas virais. Por isso, foi necessário desenvolver alternativas à filtração de impacto convencional para o estudo dos vírus marinhos, além de requerer volumes ainda maiores de amostra (dezenas a centena de litros). A filtração em fluxo tangencial foi a primeira variante amplamente empregada (Figura 2a). Consiste em uma recirculação da amostra em uma membrana filtrante em formato de canudo, com poro que pode chegar à escala molecular (kDa). Como o fluxo de filtração é perpendicular à superfície da membrana, não há retenção na mesma, evitando o entupimento. A aplicação de leve pressão (até 5psi) permite que a água atravesse os poros (filtrado) e seja removida da amostra, enquanto células e eventualmente vírus (dependendo do poro do filtro) são retidos e recirculados. Ao fim

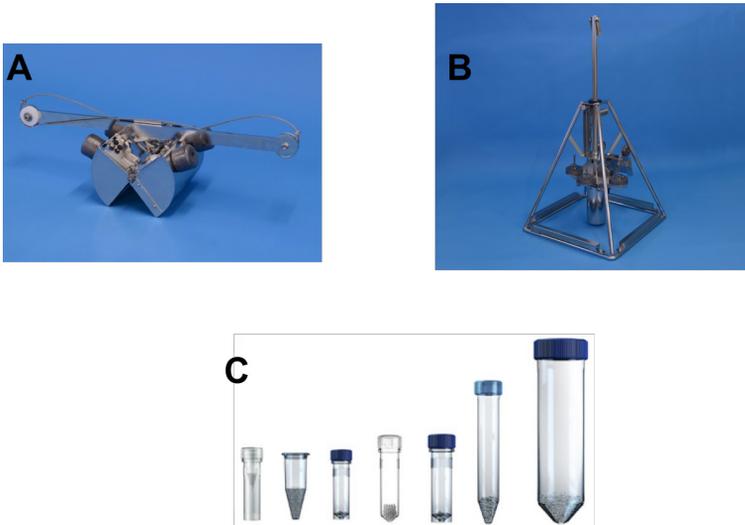
do processo é possível concentrar dezenas de vezes a amostra bruta e então submetê-la à filtração de impacto para separar diferentes células e partículas virais. Embora amplamente difundida, a filtração tangencial implica perdas consideráveis da amostra (John et al., 2011), uma vez que o processo requer comumente várias horas de filtração para completar a redução de volume. Assim, um método de floculação química (John et al., 2011) foi desenvolvido para concentrar de forma mais fiel as partículas virais presentes na água (Figura 2b). Esse protocolo emprega, após remoção de células, cloreto de ferro, composto particulado facilmente retido em filtros com maior poro, que adsorve partículas virais. As partículas adsorvidas ao cloreto de ferro (retentado) podem posteriormente ser eluídas com vitamina C, e tornam-se novamente suspensas na solução para posterior estudo. Esse processo, com alguns cuidados em relação à idade e ao pH das soluções, permite uma recuperação bastante próxima de partículas virais (tanto compostas por RNA como DNA) da amostra original, permitindo estudos quantitativos a respeito dos vírus marinhos (e possivelmente de outros meios também).



**Figura 2.** Esquemas sobre métodos de filtração. A) filtração tangencial, com retenção de células e partículas virais, e passagem de água. B) filtração após floculação química, com retenção das partículas virais adsorvidas ao ferro.

A coleta de amostras de sedimento pode ser mais complexa, dependendo da profundidade. Pode-se usar uma draga ou um amostrador Van Veen (Figura 3a) para amostrar sedimentos mais superficiais, mas geralmente o sedimento se desestrutura, misturando as várias camadas. Se é necessário coletar uma amostragem com preservação espacial, em que é possível diferenciar as sucessivas camadas de precipitação que formam o sedimento, é necessário coletar *cores*, empregando ferramentas como o *Box corer* ou *piston corer* (Figura 3b). Evitando-se porções que contatam as extremidades é possível recuperar amostras que mantêm as camadas sedimentares. Em geral, é necessário ainda efetuar uma etapa de eluição, em que os micro-organismos ou partículas virais são deslocados do sedimento e da água intersticial nele contida. Várias soluções podem ser empregadas para esse passo, como água do mar artificial, com ou sem suplementação (e.g. glicerol, peptona) ou pirofosfato de sódio. Sonicação pode ser empregada para contribuir com o processo de desorção das células e/ou partículas virais.

Biofilmes são complexos microbianos multicelulares e geralmente multiespécies que se formam sobre superfícies abióticas ou bióticas. A comunidade microbiana cresce de forma estruturada, com ampla comunicação celular e acompanhada por modificações fisiológicas. Tal crescimento é “cimentado” por uma camada predominantemente constituída por polissacarídeos extracelulares, que pode incluir restos de células (proteínas, DNA e outros), mas permanece



**Figura 3.** A) amostrador de VanVeen para sedimento. B) pistão corer para amostragem estruturada de sedimento. C) diversos tubos contendo beads para extração.

permeável à água por meio de poros e canais. Tal estrutura promove forte adesão à superfície se atingido o estágio maduro, e deve ser formada em possivelmente qualquer superfície nos oceanos, natural ou artificial. Muitos dos estudos são realizados depositando material artificial (como lâminas ou superfícies plásticas ou metálicas) em determinado local, e após incubação por dias a semanas, removendo-os para estudos em laboratório. Outros estudos com superfícies não-experimentais deverão obrigatoriamente ou destruir parte da superfície para removê-la ou empregar métodos mecânicos para raspar o biofilme. São usados desde bastões de algodão ou polipropileno a raspadores e facas (ou mesmo *beads* de vidro e materiais abrasivos) (Figura 3c). Posteriormente, o material coletado é submetido a breve sonicação, para desagregar a matriz do biofilme, se necessário.

Embora seja possível empregar a abordagem de biofilmes para superfícies bióticas, como a superfície de macro-organismos do bentos e nécton, amostras biológicas de tecidos são comumente empregadas para estudos de micro-organismos associados a macroalgas e animais. Biofilmes bióticos podem ser removidos com lavagens com seringa, tanto de superfícies como de porções específicas como brânquias, sem óbito do animal. Em certos casos, como com recifes “duros” de coral, são necessárias estratégias pouco sutis, como espigão e martelo. Nos demais, amostras de tecido, com ou sem sacrifício do organismo hospedeiro, podem ser usadas para estudos microbiológicos.

Uma distinção fundamental após a coleta envolve a preservação da amostra. Para tal decisão é fundamental ter clara a metodologia a ser empregada nos próximos passos do estudo. Se a preservação da estrutura como um todo é fundamental, para contagens por citometria ou visualização microscópica, por exemplo, é necessário fixar a amostra. Vários fixadores, como aldeídos, álcoois ou outros, podem ser empregados para prevenir autólise e deterioração do material biológico. Contudo, seu emprego efetivamente mata as células e em muitos casos impede estudos moleculares que requerem partes das células ou partículas virais. Estratégias que envolvam cultivo, atividades biológicas e muitas das técnicas de biologia molecular são incompatíveis com fixadores. Em muitos casos, são necessárias amostras vivas, e para prevenir

degradação, é recomendado no máximo refrigerar a amostra (4°C). O mais indicado, sem dúvida, é proceder com passos subsequentes do estudo com o menor intervalo disponível, preferencialmente logo após a coleta. Plaqueamentos e medidas de atividade comumente podem ser realizados de pronto, mesmo em embarcações, com planejamento adequado. Outras análises requerem materiais biológicos preservados, mas não fixados, como extrações de biomoléculas. Nessas situações é comum proceder com congelamento, com ou sem crioprotetores, conforme o caso. Uma exceção importante é o trabalho com vírus ambientais. É bastante comum um passo posterior de concentração adicional da amostra por ultracentrifugação. Tal estratégia é prejudicada após o congelamento, uma vez que há desestruturação das partículas virais, comprometendo a manutenção do capsídeo, necessária para o processo de ultracentrifugação.

Vale ressaltar novamente que a técnica ou estudo posterior à coleta é sempre o principal determinante do que deve ser feito e de como deve ser coletada a amostra. Estudos aplicados, visando ao isolamento de micro-organismos com características interessantes (e.g. produção de enzimas, degradação de compostos), raramente requerem amostras quantitativas e em condições completamente fiéis ao ambiente de coleta; desde que a característica de interesse seja encontrada, pouco importa se a amostra não é fiel ao ambiente. Por outro lado, levantamentos sobre biodiversidade *in situ*, nos mais variados materiais de origem (água, sedimento ou outros), comumente requerem bastante cuidado para prevenir a introdução de contaminantes (inclusive por parte de quem executa a coleta). Nesses casos são recomendadas soluções recém-preparadas e esterilizadas, bem como material descartável e esterilizado, ou na pior das hipóteses, material enxaguado amplamente com amostra. É importante manter em mente que o mundo microbiano nos cerca e é parte de nossa constituição como animais, bem como permeia nossos objetos e utensílios, inclusive material de pesquisa não esterilizado. Se o foco do estudo inclui comparações ou descrições sobre amostras ambientais, deve-se tomar muito cuidado para que micro-organismos de outras fontes não interfiram no resultado almejado.

## 2.2 MÉTODOS CLÁSSICOS PARA ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS

Uma vez que a principal limitação ao estudo de microbiologia é a dificuldade de visualizar organismos que por definição são microscópicos (< 200µm), uma primeira estratégia que permite sobrepujar tal limitação é o uso de "lentes de aumento", os microscópios. Mesmo com instrumentos rudimentares, logo após a invenção do microscópio já foi possível visualizar certa variação morfológica. Em um primeiro momento, imaginou-se que micro-organismos fossem pleomórficos, sem forma fixa, e que seriam todas variações de uma única espécie. Vírus não eram visualizáveis nessa época e ainda não o são, em geral, por microscopia ótica. Após cultivo de determinados micro-organismos, no entanto (ver trecho posterior desta seção), verificou-se que as formas costumam ser fixas por espécie, com raras exceções. Houve impressionantes avanços na microscopia desde então, com diversas variações que exigem preparações particulares da amostra; a maioria ainda envolve material fixado, embora algumas variantes recentes envolvam imagens de células vivas. Embora algumas variantes de microscopia comum permitam maior contraste e facilitem a visualização nos menores tamanhos possíveis (micrômetros),

algumas permitem outras formas de observar micro-organismos. A microscopia eletrônica, por exemplo, substitui a luz e as lentes empregadas para aumento e resolução na microscopia convencional, por feixes de elétrons em um tubo a vácuo e bobinas magnéticas, ampliando a possibilidade de visualização para nanômetros. Isso permite visualizações mais detalhadas de células, mesmo as menores, e permite a visualização de partículas virais. Duas variantes da microscopia eletrônica permitem a obtenção de informações distintas: a microscopia eletrônica por varredura observa apenas a superfície e estruturas externas das células e partículas virais; a microscopia eletrônica de transmissão, por outro lado, penetra nas estruturas e permite visualização do conteúdo destas. Outra importante variante da microscopia convencional é a microscopia confocal, que permite variação do plano focal. Isso possibilita a obtenção de imagens em diferentes profundidades de um material estruturado, efetivamente possibilitando um fracionamento ótico da amostra. Coletando diversas imagens é possível inclusive sobrepor-las para geração de uma imagem tridimensional. Cabe destacar que é possível aplicar microscopia confocal em amostras vivas, se devidamente preparadas.

Associado às lentes, surge outro problema para visualização. Alguns organismos apresentam pigmentos ou moléculas internas que lhes conferem cor ou fluorescência natural – por exemplo, a clorofila dos organismos fotossintetizantes. A maioria, contudo, é transparente e, portanto, não contribui para resolução em microscopia, principalmente em tamanhos mais reduzidos. Assim, faz-se necessário usar corantes, compostos que interagem com algum componente celular ou viral, aumentando o contraste com o meio circundante de forma a facilitar a visualização. A coloração de Gram, bastante popular, contrasta duas estruturas de paredes bacterianas: a Gram-positiva, rica em peptidoglicanos, e a Gram-negativa, rica em lipopolissacarídeos. Há também corantes fluorescentes, que absorvem luz em determinado comprimento de onda e emitem em outro. Com filtros apropriados, é possível empregar nesses casos microscopia de fluorescência, bastante empregada para contagens microbianas e virais, diferenciando células e partículas virais da sujeira de fundo da amostra. Outros compostos podem ser empregados como corantes em contextos próprios. É possível destacar partes específicas de bactérias (como o nucleóide ou cápsula), respiração celular, integridade da membrana celular, atividade enzimática, replicação de DNA, crescimento celular, entre outros.

Vale ressaltar que a morfologia é uma característica descritiva bastante usada, mas um tanto supervalorizada para micro-organismos. É útil como descrição, mas não representa uma característica filogeneticamente relevante para classificação, uma vez que morfologias idênticas são encontradas em ramos distintos da árvore da vida, enquanto morfologias distintas muitas vezes acontecem em diferentes espécies em um mesmo grupo. A exceção desse papel da morfologia na microbiologia são os vírus. A descrição da morfologia da partícula viral, sua forma e presença/ausência de envoltório (envelope), são características-chave ainda empregadas para a classificação taxonômica viral.

Outra abordagem clássica, amplamente utilizada na microbiologia médica, veterinária e afins, é a cultura microbiana. Uma vez que o tamanho e biomassa reduzidos ainda são limitações, essa estratégia visa compensar tais fatores com a obtenção de grande quantidade do(s) organismo(s) de interesse. Embora uma ou algumas bactérias permaneçam invisíveis a olho nu, milhões ou bilhões delas tornam-se visíveis, como turbidez em um meio líquido ou uma massa

celular em um gel sólido. Para estimular tal crescimento, acrescenta-se uma série de nutrientes, vitaminas e quaisquer outros requerimentos ao meio, além de incubá-lo em condições, como temperatura, pH e luminosidade, apropriadas para o crescimento do micro-organismo desejado. Se supomos ou conhecemos corretamente as necessidades nutricionais e condições ambientais de crescimento de determinado micro-organismo, é possível cultivá-lo em laboratório. O tempo necessário para tal processo pode ser bem variável, de minutos a horas, a dias, semanas ou meses, dependendo da velocidade de replicação do organismo em questão. Há ao menos duas vantagens e duas desvantagens associadas a essa abordagem. Se cultivado corretamente, o micro-organismo pode ser obtido quando desejado e na quantidade necessária, bastando algum planejamento. Assim, é possível sujeitá-lo a toda sorte de testes bioquímicos, fisiológicos e quaisquer outros que se imagina. Podemos determinar qual ou quais compostos podem alimentá-lo, ou qual a amplitude de condições ambientais que ele tolera. Podemos fazer testes genéticos, fenotípicos, incluindo observações morfológicas, e descrevê-los em todas as características de interesse, inclusive para fins de classificação. Em meio sólido, através da adição de ágar (um carboidrato derivado de algas que gelifica o meio de cultura, como uma gelatina), podemos obter certa resolução espacial. Dessa forma é possível diluir uma amostra ao ponto de distanciar micro-organismos distintos e obter massas celulares (colônias) separadas. Repicando essas colônias, ou seja, coletando cada uma de forma estéril e passando para novo meio sólido, é possível isolar micro-organismos distintos. Idealmente é necessário repetir essa diluição e passagem diversas vezes, mas, uma vez completado o processo, teremos uma população “pura” (axênica) daquele determinado micro-organismo para submeter aos mais diversos testes supracitados. Outra vantagem geralmente relacionada com o cultivo do micro-organismo em laboratório é a possibilidade de estocá-lo. Se é possível cultivá-lo em laboratório, podemos testar diversas condições para preservação dessa amostra, incluindo liofilização (dessecamento a frio) ou mesmo congelamento, geralmente associado a agentes crioprotetores. Compostos como DMSO, glicerol, entre outros, previnem a formação de cristais de gelo no citoplasma das células, possibilitando sua recuperação após virtualmente qualquer período de tempo. Isso permite que isolados microbianos efetivamente parem no tempo, e possam ser recuperados no futuro para estudo. É possível, portanto, fazer desenhos de estudos inviáveis em outros organismos, como comparar progenitor e descendentes em relação a adaptação, mesmo após décadas de intervalo, em ensaios evolutivos. De fato, um grupo de pesquisadores, liderados por Richard Lenski, replica algumas populações de *Escherichia coli*, desde 1988 (Lenski, 2017). Cultivar micro-organismos é parte da tradição da microbiologia, e avanços fundamentais na área foram e são obtidos através do cultivo de organismos. A taxonomia microbiana, por exemplo, ainda se baseia em testes que requerem culturas do micro-organismo alvo e de seus parentes próximos, embora existam propostas alternativas. A descrição de micro-organismos já classificados requer avaliação de uma série de características geralmente derivadas do cultivo do organismo.

### **Quadro 1 – Taxonomia de bactérias e arqueias**

A taxonomia de bactérias e arqueias, em geral, esteve em estado de fluxo por mais de 100 anos,

pois sistematas davam grande valor a testes fenotípicos e características morfológicas nos antigos esquemas de classificação (ver, por exemplo, o Manual Bergey's ed. 1957), resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e muitas vezes artificiais. A **taxonomia numérica** (Sneath; Sokal, 1962) surgiu com a possibilidade de análise de caracteres fenotípicos utilizando coeficientes numéricos que expressam similaridade entre linhagens. Sem dúvida, a taxonomia numérica veio proporcionar maior objetividade aos esquemas de classificação microbiana e a abordagem pressupunha a utilização de um grande número de testes bioquímicos (entre 100 e 200) e uma amostragem grande e diversificada de linhagens, sendo os resultados expressos em porcentagens.

A aplicação da **taxonomia polifásica** surgiu a partir de 1970, com o trabalho seminal realizado por Cowell (1970) que alavancou o conceito da taxonomia polifásica ainda utilizado atualmente. De acordo com esse conceito, **sistemas de classificação mais naturais devem integrar informação dos níveis molecular ao ecológico. A técnica de hibridização de DNA-DNA (HDD) é o padrão-ouro na definição de espécie bacteriana dentro da taxonomia polifásica.** Uma espécie bacteriana é definida como um grupo de linhagens que apresentam mais de 70% de similaridade na HDD. No entanto, essa técnica apresenta várias limitações, tais como a necessidade de incluir linhagens-de-referência a cada novo experimento e requer equipamentos especiais que estão disponíveis somente em poucos laboratórios internacionais.

Em 1987, Carl Woese publicou seu trabalho pioneiro sobre o uso do **gene RNAr 16S** como um **marcador filogenético** em bactérias e arqueias, abrindo novos rumos na taxonomia microbiana. O gene RNAr 16S codifica a subunidade ribossomal menor de bactérias; apresenta aproximadamente 1,5 Kb, sendo um tamanho adequado para análise comparativa, e é universalmente distribuído nestes micro-organismos, apresentando regiões conservadas e variáveis. A presença de regiões variáveis é uma característica explorada na distinção entre as espécies. Linhagens pertencentes à mesma espécie apresentam similaridade igual ou maior que 98,8%. Hoje, o arcabouço da taxonomia de bactérias é baseado na filogenia do gene RNAr 16S, embora este apresente algumas limitações. O número de cópias desse gene pode variar em diferentes espécies bacterianas. Além disso, o RNAr 16S não codifica uma proteína, e a presença de inserções ou deleções no gene gera problemas para o alinhamento das sequências. O gene RNAr 16S e a HDD apresentam correlação, porém a resolução taxonômica desse gene é baixa. Diferentes espécies bacterianas podem apresentar sequências do gene RNAr 16S muito similares ou até mesmo idênticas, como por exemplo, *Vibrio cholerae* e *V. mimicus*, ou *Escherichia coli* e *Shigella*. Por fim, existem muitos questionamentos a respeito do grau de resistência que esse gene apresenta à transferência lateral e até que ponto um único gene pode representar fidedignamente a filogenia de um organismo.

A taxonomia polifásica é um consenso entre a maioria dos sistematas. **A taxonomia polifásica integra dados fenotípicos, quimiotaxonômicos, moleculares, genômicos e filogenéticos, com o objetivo de representar a biodiversidade nos seus diferentes níveis, isto é, de linhagem a supra-famílias de uma forma mais natural.** A hibridização DNA-DNA (HDD) e as sequências de RNAr 16S têm papel central no delineamento de espécies neste contexto.

A unidade básica em taxonomia microbiana é a espécie. A definição atual de espécie bacteriana é pragmática e operacional, objetivando o estabelecimento de sistemas taxonômicos rápidos, confiáveis, reprodutíveis e úteis para uma variedade de aplicações e que sejam baseados na evolução microbiana. **Espécie de bactéria compreende um grupo de isolados geneticamente coerente que compartilha elevado grau de similaridade em diversas características independentes. Uma espécie bacteriana é definida como um grupo de linhagens que compartilham alto grau de similaridade fenotípica, > 70% de similaridade de**

hibridização DNA-DNA,  $> 5^{\circ}\text{C } \Delta T_m$ ,  $> 5\%$  de similaridade no conteúdo de G + C do DNA genômico,  $> 98\%$  de identidade nas sequências do gene RNAr 16S. Apesar de criticada, a hibridização de DNA-DNA ainda é o padrão-ouro para a definição de espécies em bactéria.

O advento de técnicas rápidas de sequenciamento de genomas e o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática que auxiliam na extração de informação taxonômica de genomas revolucionaram a taxonomia microbiana, lançando-a na nova era da **taxonomia genômica**, que vem sendo proposta como alternativa à taxonomia polifásica. A taxonomia genômica é fundamentada no estudo e na análise comparativa de genomas por meio do alinhamento e análise de genes conservados (ortólogos), Média da Identidade de Aminoácidos (AAI), Média da Identidade de Nucleotídeos (ANI), hibridização DNA-DNA *in silico* (GGD, do inglês *genome-to-genome distance*), assinatura genômica de Karlin (análise de di-tri-tetra nucleotídeos), conteúdo de G + C, predição do fenótipo baseado na análise de sequências genômicas, análise de vias metabólicas e análise do genoma *core* e do *pan* genoma, e tem como objetivo estabelecer a identificação e a classificação microbiana com base na informação taxonômica disponível em cada genoma. Neste contexto, uma espécie é definida como um grupo de linhagens que compartilham  $>95\%$  de identidade no AAI e no ANI,  $>95\%$  de identidade na análise de genes conservados (genoma *core*),  $<10$  na assinatura genômica de Karlin,  $> 5\%$  do conteúdo de G+C e  $> 70\%$  de similaridade na HDD *in silico* (ou GGD). Espécies do mesmo gênero formam grupos monofiléticos com base nas sequências do gene RNAr 16S e do genoma *core*. É necessário incluir sempre o genoma da espécie/linhagem tipo, pelo menos. Culturas de novas espécies tipo devem ser depositadas em coleções de culturas públicas. A sequência do genoma da nova espécie tipo deve ser depositada em bancos de dados públicos, como o EMBL e GenBank, a fim de permitir acesso à comunidade científica e identificação automática de espécies microbianas através da internet. O estabelecimento de uma nova definição de espécie de bactérias e arqueias e novos esquemas taxonômicos fundamentados em genomas aqui apresentados permitem o uso de genomas para definir grupos fenotípica e genomicamente coerentes e coesos.

Há limitações importantes em relação a essa abordagem, no entanto. A primeira é o fato de que as condições de cultivo em laboratório não são as mesmas do ambiente natural do organismo. Podemos fazer uma analogia com um peixe no aquário: é interessante saber se ele é capaz de comer isso ou aquilo, ou como se comporta frente a situações específicas, mas é possível apenas inferir (especular) que isso ocorre no ambiente natural dele. De forma similar, ter a capacidade de degradar um determinado composto ou explorar determinado nutriente apenas sugere papéis ecológicos do micro-organismo no meio natural. Tratamos, portanto, apenas de um possível papel ecológico, mas que deve ser testado *in situ*, de outras formas. A segunda limitação, ainda mais importante em termos de exploração da biodiversidade, é o fato de que apenas uma fração bem diminuta dos micro-organismos presentes na natureza é passível de ser cultivada em laboratório com a tecnologia atual. Estima-se, através de comparações entre observações microscópicas diretas e recuperação de micro-organismos em meios de cultivo, que em média menos de 1% do que habita ambientes naturais seja cultivável. Vários fatores são elencados para explicar essa discrepância tão notável, entre eles dificuldade de estabelecer nutrientes ou condições de cultivo, tempo de replicação muito lento, resistência a excesso de nutrientes, necessidade de interações ecológicas para cultivo, entre outros. De qualquer forma, essa limita-

ção representa uma barreira fundamental para a descrição da biodiversidade microbiana e para o entendimento de ecologia dos micro-organismos na natureza. De fato, antes da descrição desse fenômeno, apelidado de “grande anomalia de placas” (do inglês *great plate anomaly* ou GPA), havia o entendimento de que os micro-organismos eram pouco abundantes e relevantes ecologicamente. Hoje, o conhecimento científico aponta para um cenário completamente oposto a essa ideia, como veremos em seções posteriores.

Quanto aos vírus, cabe destacar que também são passíveis de cultivo, com vantagens e limitações similares, mas com uma distinção essencial. Como vírus são entidades biológicas obrigatoriamente simbiotes, para o cultivo viral é necessário oferecer a célula hospedeira correta em condições que permitam seu próprio crescimento (hospedeiro). Assim, frente à limitação de cultivo de hospedeiros previamente explicada (GPA), nota-se uma limitação importante em relação ao cultivo viral. Apenas cultivamos vírus cujos hospedeiros são passíveis de cultivo, e esses representam uma porção bastante limitada da natureza. Logo, nosso conhecimento sobre vírus, de forma geral, é deveras insuficiente, principalmente em relação aos vírus que infectam bactérias e arqueias (e eucariotos unicelulares), que representam a maioria dos vírus do planeta. Essa limitação se reflete nos estudos posteriores, empregando abordagens moleculares, como veremos adiante, que amostram, mas não reconhecem, o que está presente na natureza. Ainda assim, a classificação de vírus se baseia em conjuntos de características que requerem o cultivo prévio destes para obtenção, ainda que também existam propostas que prescindem dessa etapa.

## **Quadro 2 – Taxonomia de vírus**

Como qualquer área das ciências biológicas, a virologia também busca classificar – ou seja, categorizar e nomear – seu alvo de estudos. De forma similar às células, é desejável reconhecer se um determinado isolado representa um potencial patógeno, ou se é capaz de infectar determinado hospedeiro e como é o provável desfecho dessa infecção, com base no conhecimento prévio sobre o vírus específico. A taxonomia viral, como a microbiana, baseia-se em uma taxonomia polifásica, ou seja, congrega características fenotípicas, ecológicas e genéticas dos isolados que pretende classificar. Apresenta, no entanto, algumas diferenças fundamentais em relação às taxonomias celulares. As características bastante valorizadas para classificação incluem a morfologia da partícula viral (icosaédrica, helicoidal ou complexa), presença/ausência de envelope, tipo de ácido nucleico (DNA ou RNA, fita simples ou dupla, único ou segmentado), tipo de hospedeiro que infecta, e consequência dessa relação (doença, modo de replicação). Como são requeridas características relacionadas à interação do vírus com a célula hospedeira, é importante que uma cultura do vírus esteja estabelecida. Apenas assim, podemos experimentar a amplitude de hospedeiros infectáveis e obter detalhes da replicação. As diferenças em relação à taxonomia celular envolvem dois aspectos. Evolutivamente, não temos evidências que suportem uma origem única para todos os vírus, ao contrário das células. Assim, não é possível estabelecer uma única árvore filogenética dos mesmos. Considera-se que os vírus estabeleçam sim linhagens monofiléticas, mas múltiplas linhagens independentes, que requerem múltiplas características para fazer distinção entre elas. Uma classificação politética foi empregada por bastante tempo, onde nenhuma característica é exclusiva de determinado grupo, e uma proporção mínima

de características precisa ser apresentada para pertencimento ao grupo. Essa limitação ainda se reflete em estudos moleculares, em que fica clara a ausência de marcadores filogenéticos universais em vírus. Uma segunda diferença marcante entre taxonomia viral e celular é que a classificação dos vírus, como todo o campo da virologia, é recente, cientificamente. Assim, a língua universal empregada para nomenclatura viral é o inglês, no lugar do latim. Nota-se também uma diferença importante nos níveis taxonômicos, fruto da limitação evolutiva acima apresentada. Não há grupos taxonômicos superiores a ordem para os vírus, e muitos vírus ainda não apresentam uma descrição em todos os níveis. Exemplos de classificação viral seriam:

a) Ordem *Caudovirales*, Família *Myoviridae*, Subfamília *Tevenvirinae*, Gênero *Schizot4virus*, Espécie *Vibrio vírus KVP40*;

b) Ordem *Unassigned*, Família *Unassigned*, Gênero *Virtovirus*, Espécie *Tobacco virtovirus 1* (espécie tipo);

As definições sobre taxonomia viral são decididas pelo ICTV, o conselho internacional de taxonomia viral, composto por especialistas nos mais diversos grupos virais. Suas deliberações são disponibilizadas em relatórios periodicamente, sendo o último disponível online em <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/>.

Análises morfológicas e cultivos microbianos, embora de valor inestimável para o avanço da microbiologia, aplicam-se em geral a populações de micro-organismos. Podemos realizar contagens e observações de amostras ambientais, e são abordagens bastante necessárias, mas não permitem desdobramentos posteriores. Além disso, buscamos cultivos axênicos (puros) para poder realizar experimentos e descrições de um único tipo de micro-organismo. Esforços para cultivo de amostras ambientais são restritos pela GPA a poucos organismos. Dessa forma, tais abordagens foram limitadas para descrições de biodiversidade microbiana e viral na natureza, composta por comunidades (múltiplas populações interagindo com variáveis ambientais) complexas e dinâmicas.

### **2.3 ABORDAGENS CONTEMPORÂNEAS (INDEPENDENTES DE CULTIVO)**

Outras formas de prospectar micro-organismos foram necessárias para abordar a microbiologia ambiental e a maioria destas foi primeiramente implementada em amostras marinhas. O cultivo e o estudo morfológico de células ou partículas virais, explicado na seção anterior, apresenta limitações e para sobrepujar tais barreiras buscou-se o estudo de componentes celulares ou virais em vez do micro-organismo completo. Assim, inicia-se uma interface bastante prolífica entre microbiologia e biologia molecular, com produtos provenientes de partes de células microbianas ou partículas virais frequentemente resultando em novos produtos biotecnológicos com aplicações variadas. Diversas outras abordagens mais elaboradas e automatizadas também surgem em anos mais recentes, oferecendo ferramentas bastante inovadoras para responder questões antes inacessíveis.

As abordagens moleculares empregam diversas moléculas biológicas, frutos de avanços biotecnológicos. Enzimas são usadas para romper células, degradar macromoléculas e clivar sequências específicas de DNA. Polimerases são empregadas para produzir DNA a partir de RNA e para fazer cópias de DNA, de forma controlada ou inespecífica. Sequências de DNA e RNA tornam-se marcadores de atividades e da história filogenética de (micro-)organismos. Genomas inteiros, ou porções seletas, podem formar bibliotecas de DNA, após clonagem. Muitas dessas estratégias foram empregadas primeiramente de forma controlada para populações microbianas em laboratório, após cultivo. Partindo de um isolado, podemos obter perfis de suas macromoléculas, como DNA, RNA ou proteínas, descrevendo assim seu potencial genético (DNA) ou sua expressão em determinadas condições ambientais (RNA, proteínas). Podemos amplificar, por reação em cadeia da polimerase (PCR), regiões previamente conhecidas de genomas, empregando polimerases clonadas de micro-organismos termófilos (*Taq* polimerase e derivados). Podemos ler biomoléculas como DNA e RNA, obtendo suas sequências, com base em uma variante de PCR e bases nitrogenadas modificadas (metodologia de Sanger). Já conhecemos há algum tempo estratégias de recombinação de DNA, cortando com enzimas de restrição, produtos de co-evolução entre bactérias e seus vírus, e colando sequências iguais ou distintas com DNA ligases bacterianas, virais, entre outras. Empregando plasmídeos (elementos genéticos móveis circulares de bactérias) amplamente conhecidos e editados satisfatoriamente, possuímos ferramentas para amplificar e estocar quaisquer sequências de interesse, de forma relativamente simples. Lançando mão de promotores compatíveis com a célula que abriga o plasmídeo, podemos inclusive expressar biomoléculas em sistemas heterólogos (diferentes da célula original), fazendo mudanças que levem em consideração as diferenças conhecidas entre os tipos celulares. Combinando as abordagens de clonagem e sequenciamento podemos ainda acessar o conteúdo genético total dos (micro-) organismos e dos vírus, tendo acesso a todo potencial o genético contido em determinada espécie que possamos reconhecer.

Com algumas modificações, grande parte dessas abordagens podem ser adaptadas para exploração da biodiversidade microbiana, conseguindo lidar com comunidades complexas encontradas no ambiente. Embora seja possível extrair biomoléculas como DNA, RNA ou proteínas de amostras ambientais, um perfil direto de qualquer uma dessas moléculas é pouco informativo, uma vez que todos os diferentes micro-organismos de uma amostra comporão tal perfil, ainda que de forma desigual. Ainda assim, estratégias como polimorfismos de fragmentos terminais (t-RFLP) ou eletroforese em gel desnaturante (DGGE) permitem a obtenção de perfis de bandas de comunidades microbianas. Essas estratégias permitem estimar riqueza, equitabilidade e, por fim, a própria diversidade de amostras, de forma comparativa, inclusive. Avançando sobre essa temática, podemos ainda selecionar uma região filogeneticamente informativa, como o RNA ribossômico 16S, que possua sequência única para cada organismo distinto e permita descrever quais encontram-se em determinada amostra, após sequenciamento. Isso pode ser feito com sequências recuperadas dos perfis de banda acima citados, embora com alguma dificuldade, ou pode ser obtido diretamente por meio da clonagem do produto de PCR dessas regiões, seguida de sequenciamento. Monta-se, neste último caso, uma biblioteca de genes ribossomais, que pode ser explorada para determinar quantos e quais organismos encontram-se nas amostras ambientais. Comparando essa biblioteca com sequências desses marcadores

oriundas de organismos já conhecidos, podemos reconhecê-los em amostras ambientais variadas, dessa forma, inferindo a presença desses (micro-) organismos na natureza. Podemos obter bibliotecas de DNA, que revelam a presença de organismos, bem como de RNA (após conversão desse último em DNA utilizando enzimas derivadas de retrovírus), que nos traria informações sobre quais organismos estão ativos na amostra. Ainda na mesma temática, podemos clonar todo o DNA de uma comunidade, não apenas marcadores, sequenciando os fragmentos obtidos aleatoriamente. Poderíamos encontrar enzimas, proteínas estruturais e toda e qualquer informação presente nos genomas ou transcriptomas das comunidades microbianas, obtendo metagenomas ou metatranscriptomas no processo. Podemos dessa forma identificar informações variadas da comunidade, inclusive em níveis inferiores ao de espécie, portanto, iluminando aspectos pouco abordados previamente de diversidade microbiana (ver seção 1.2).

Novas tecnologias permitiram ampliar ainda mais as possibilidades de estudo seguindo essas estratégias. Atualmente, contamos com sequenciadores de nova geração (454, *Illumina*, *Ion Torrent*) que mudam a metodologia de sequenciamento e paralelizam drasticamente o processo. Permitem, assim, obter milhares-bilhões de sequências (DNA ou mesmo RNA convertido) em horas ou dias, sem requerer clonagem prévia. Basicamente, extraem-se as moléculas de interesse, como os genomas, por exemplo, e seguimos por duas abordagens: ou fragmentamos aleatoriamente esse DNA (*shotgun*) ou amplificamos por PCR regiões informativas (filogeneticamente ou de outra forma) (*amplicons*). A partir de um desses caminhos já é possível proceder, por meio de metodologias específicas, para o sequenciamento, e logo dispor de uma vasta quantidade de informações sobre as comunidades microbianas da amostra, com o mínimo enviesamento possível no caso do *shotgun* (o processo de PCR, necessário para produzir *amplicons* tem alguns vieses bem descritos). Novamente, podemos obter informações sobre presença de organismos e seu potencial genético codificado, a partir de DNA, e também de organismos ativos e seu potencial expresso nas condições específicas do momento, partindo do RNA. Podemos ainda obter informações genômicas de vírus, tanto com genomas de DNA como de RNA, com adaptações. Essas novas tecnologias fomentaram sobremaneira o crescimento de bancos de dados e demonstraram que pouco conhecíamos sobre microbiologia ambiental ou sobre a diversidade e o papel dos micro-organismos e vírus nos oceanos. Assim, os avanços foram acelerados nos últimos anos. Um avanço recente é a introdução de estratégias que permitem a separação física de células únicas, antes da extração e sequenciamento, este último mediante uma amplificação inespecífica com enzimas virais para obtenção de biomassa suficiente. Assim, podemos recuperar grandes porções genômicas de micro-organismos sem cultivo prévio dos mesmos, permitindo a identificação de grupos-chave anteriormente desconhecidos.

O principal gargalo atual é a etapa de análise desse grande volume de dados, por meio da bioinformática. Podemos identificar parte das sequências comparando com bancos de dados conhecidos (em programas como Blast, Blat, Diamond). Podemos agrupar sequências (*binning*) com algum critério de similaridade (conteúdo, assinatura de nucleotídeos) e trabalhar com esses agrupamentos, mesmo sem reconhecer seu conteúdo. Dessa forma, podemos obter grandes porções genômicas de micro-organismos mesmo sem cultivo prévio, denominados *genome bins*, através dos quais podemos obter informações sobre filogenia e potencial meta-

bólico, inclusive permitindo novas abordagens quanto ao cultivo e isolamento. Podemos ainda tentar encaixar sequências que se sobreponham (*assembly*), permitindo dessa forma a montagem de sequências maiores (*contigs*) e até eventualmente cromossomos ou genomas inteiros. Assim podemos reconstruir grandes porções de genomas sem cultivo, com informação sobre ordenação e organização do genoma, seja celular ou viral. Montagens são úteis inclusive para ter pistas sobre fragmentos genômicos desconhecidos, desde que estes sejam montados justapostos a porções conhecidas. Há maneiras de mapear fragmentos sem informações sobre conteúdo, há formas (ainda que imperfeitas) de separar sequências virais e celulares e há abordagens estatísticas particulares para esse tipo de dado, com ampla cobertura, mas poucas réplicas. Há propostas recentes como análises de redes ponderadas por conteúdo gênico (WGCNA) que visam correlacionar dados genéticos com parâmetros ambientais, que fornecem novas perspectivas sobre ecologia microbiana.

Outras tecnologias contemporâneas amplamente empregadas para estudos de diversidade microbiana incluem PCR em tempo real, que emprega fluorescência e detecção da mesma junto com a reação de PCR, permitindo a detecção da amplificação em tempo real. É uma estratégia bastante útil para quantificações de regiões específicas (DNA ou RNA), por meio de comparações. Permite, portanto, confirmar dados obtidos por outras estratégias, incluindo abundância de determinados micro-organismos ou de genes funcionais. Uma última abordagem bastante útil envolve a automação do processo de contagem de micro-organismos por citometria de fluxo. Empregando fluxo controlado de uma amostra líquida por um capilar (um tubo bastante pequeno onde apenas uma célula por vez pode passar, na diluição apropriada), podemos medir de forma automatizada diversos parâmetros. Um sensor incide luz sobre a amostra, e medidas de difusão do feixe, absorção do feixe e mesmo interações de determinados comprimentos de onda emitindo outros (fluorescência) são informações facilmente obtidas de milhares de células ou partículas virais em curto espaço de tempo. Automatizar a contagem e obtenção dessas características permite minimizar o erro humano de contagens microscópicas, resultando em comparações mais fiéis de amostras ambientais. É possível realizar medidas de células que sejam naturalmente fluorescentes (contendo pigmentos como a clorofila) ou de células ou partículas virais marcadas (especificamente ou não) com corantes artificiais, dependendo do objetivo. Adicionalmente, variações de citometria de fluxo tornam possível separar determinadas células (por suas características acima mencionadas), permitindo separação física de determinados grupos ou mesmo populações para outros fins, como estudos moleculares ou cultivo.

### 3

## APLICAÇÕES DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA NA BIOTECNOLOGIA MARINHA

Todas essas estratégias elencadas mudaram nossa percepção sobre biodiversidade microbiana e seu papel no mundo. Atualmente é claro o destaque da microbiologia em termos ecológicos, evolutivos e mesmo aplicados. Nossa visão antropocêntrica do mundo nos sugere

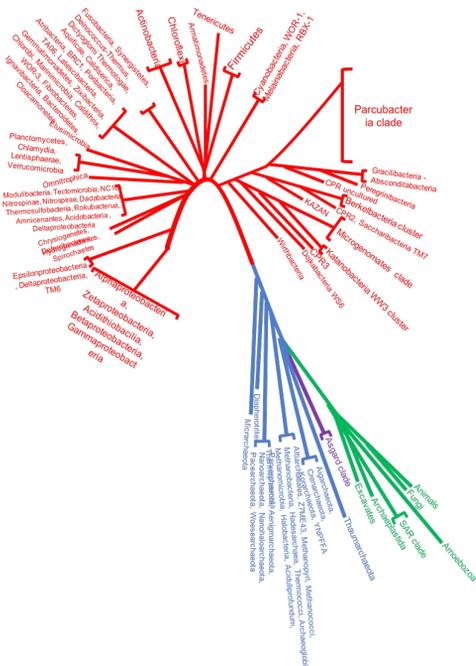
uma grande importância de nossa própria espécie como modificadores do ambiente e desencadeadores de mudanças globais, ainda que afetem negativamente nossa própria espécie e os demais coabitantes do planeta. Ainda assim, somos completamente supérfluos para o funcionamento do planeta, e possivelmente uma grande quantidade de outros organismos se beneficiariam amplamente com nossa extinção. Por outro lado, sabemos atualmente que micro-organismos foram essenciais para modificações drásticas da biosfera (como a oxidação global do planeta e estabelecimento da camada de ozônio), desempenham papéis essenciais em transformações químicas necessárias para as demais formas de vida no planeta e que a extinção de determinados grupos funcionais microbianos seria catastrófica para a vida no planeta.

Estudos moleculares, empregando ferramentas biotecnológicas contemporâneas, complementaram sobremaneira nosso entendimento sobre a evolução da vida no planeta. Bactérias, arqueias e vírus provavelmente foram os primeiros grupos a se diversificarem na Terra, remontando a mais de 3,5 bilhões de anos. Isso significa que esses micro-organismos ocupam o planeta por volta de 80% do tempo de existência deste (em contraste com ~12% desde o surgimento dos primeiros animais e ~0,0001% desde as primeiras civilizações humanas). Essa antiguidade implica resistência a extinções (como grupos) e torna bastante improvável que venhamos a eliminar a vida microbiana do planeta, independentemente de quanto alteremos o ambiente em detrimento nosso e de outros organismos; é bem provável que micro-organismos sobrevivam e floresçam mesmo no caso de nossa própria extinção como espécie.

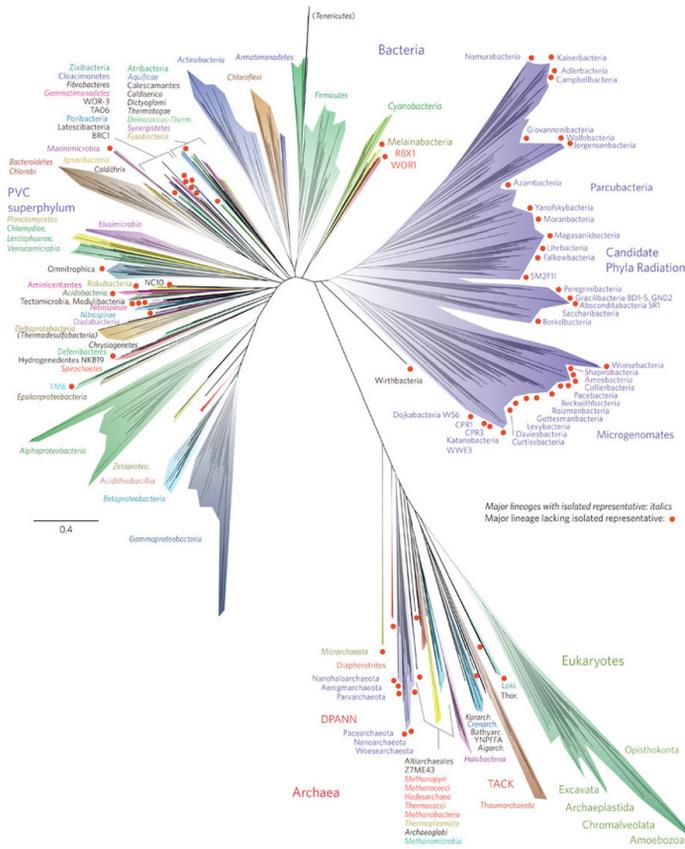
Outras consequências importantes dessa antiguidade microbiana dizem respeito à evolução e diversificação dos micro-organismos. Árvores filogenéticas recentes (Figura 4) mostram claramente o destaque filogenético (relacionado à história evolutiva) dos micro-organismos, com ampla diversidade bacteriana documentada. As estratégias independentes de cultivo mencionadas anteriormente, como genomas montados a partir da metagenômica e genômica de células únicas, estão permitindo a descrição de novos grupos microbianos inéditos e exigindo concomitantemente a reavaliação de relações evolutivas, normalmente reduzindo destaques prévios para a vida multicelular (consequência de nosso antropocentrismo). Fica bastante óbvia a divisão da vida do planeta em domínios (*Bacteria* e *Archaea*, principalmente, e suas dezenas de superfilos e filós) e a supervalorização da vida multicelular de tentativas anteriores de classificação como reinos. Embora ainda possam ter utilidade, tais agrupamentos ignoram a diversidade filogenética microbiana conhecida na atualidade, e representam apegos a conceitos já claramente inadequados frente a conhecimentos atuais (e nem tão atuais – Woese já apontava o fim dos reinos com a descrição de arqueias). Inclusive, estudos recentes (Williams et al., 2013) questionam o status de domínio do grupo *Eukaryota*, tentativamente rebaixando-o a subgrupo de *Archaea*. Novas descobertas posteriores reforçam essa noção (Spang et al., 2015; Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017), atacando adicionalmente nossa autovalorização antropocêntrica. Sob essa nova visão, eucariotos seriam uma variação de arqueias que incorporaram características preexistentes em bactérias, vírus e arqueias, eventualmente aplicando-as para outras funções. Contudo, segundo essa linha, alguns autores defendem que eucariotos não inovaram significativamente em termos evolutivos e toda inovação bioquímica seria proveniente de grupos como bactérias, arqueias e vírus (Falkowski, 2015). Cabe ressaltar de qualquer forma que micro-organismos incluem todas as bactérias, arqueias e vírus e uma vasta gama de euca-

riotos unicelulares e microscópicos, descritos no próximo capítulo; compreendem, portanto, todos os tipos de organismos celulares e entidades acelulares associadas (vírus).

O novo olhar ecológico sobre a biodiversidade microbiana já foi pontuado gradualmente em seções anteriores. As metodologias clássicas foram inicialmente empregadas na microbiologia aplicada, para entender e combater infecções, muitas das quais podem ressurgir nos próximos anos, devido ao mau uso de antibióticos e pouco investimento na descoberta de novos medicamentos. As mesmas estratégias contribuíram para o isolamento e entendimento de milhares de outras bactérias e algumas arqueias. As novas ferramentas independentes de cultivo complementaram nosso conhecimento prévio baseado nas metodologias clássicas, inclusive apontando novas direções para cultivo e visualização de micro-organismos. Permitiram, adicionalmente, direcionar estudos para comunidades microbianas nos mais diversos ambientes marinhos, provendo formas de descrever padrões e processos nesses ambientes. Sabemos que há padrões biogeográficos para diversos grupos de micro-organismos marinhos e vírus, variando com latitude, distância da costa e profundidade. Embora não haja muitas limitações para dispersão passiva microbiana e viral, implicando que os mesmos grupos possam ser encontrados em regiões distintas, a abundância relativa de cada grupo de micro-organismos e vírus geralmente varia. É bem provável que nossa compreensão limitada dos fatores ambientais em microescala que afetam diretamente as comunidades microbianas e virais interfira em nossa capacidade de compreender adequadamente os padrões e processos ecológicos microbianos. A natureza dinâmica e complexa dessas comunidades certamente tem seu papel adicional como complicação. É clara, no entanto, a ampla abundância e biomassa microbiana em todos os ambientes marinhos, logo estudá-los e compreender seus papéis nos oceanos é essencial para estudar a ecologia desses locais. As ferramentas contemporâneas disponíveis permitem responder a essas questões hoje em dia.



**Figura 4.** Árvore da vida atual. Fonte: Hug et al., 2016; Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017.



**Figura 4 (continuação).** Árvore da vida atual.

É conhecimento sólido na microbiologia marinha a ampla biodiversidade microbiana, nos mais variados aspectos (genéticos, bioquímicos/metabólicos, filogenéticos e de habitats). Há micro-organismos e vírus que se adaptaram às mais variadas condições de temperatura, pH, salinidade, luminosidade, pressão e condições de óxido-redução. Em todo local onde é possível a vida encontram-se micro-organismos e, potencialmente, vírus acompanhando-os. É fácil entender essa ampla distribuição e diversidade molecular e de habitats no contexto de tempo de sua existência no planeta; micro-organismos colonizaram um planeta estéril ao longo de bilhões de anos, evoluindo para ocupar todos os locais habitáveis (mesmo que não intuitivamente agradáveis em nossa perspectiva antropocêntrica) e explorar todos os recursos disponíveis (mesmo que não pareçam recursos aproveitáveis sob nossa perspectiva). Para tal, diversificaram suas moléculas e testaram combinações de genes e proteínas, globalmente, em uma escala sem precedentes. Todas essas biomoléculas provenientes de micro-organismos e vírus, revisadas nos primeiros capítulos do livro, são bioprodutos tecnológicos potenciais, para aplicações das mais diversas, incluindo medicamentos, vitaminas ou outros. Os próprios micro-organismos e seus processos metabólicos, tanto básicos como seus subprodutos metabólicos (metabolismo secundário), também são fontes de prospecção tecnológica de bioprocessos. Podemos elencar como exemplos a fermentação produzindo álcoois e outros biocombustíveis, a transformação de metais (biolixiviação) e a degradação de compostos naturais ou artificiais (biorremediação).

De fato, muitas das moléculas que permitiram o avanço da biologia molecular, que ampliou nossa possibilidade de estudo da diversidade microbiana e viral ambiental, foram provenientes dos próprios micro-organismos. Polimerases, enzimas de restrição, ligases, transcriptases reversas, proteases, lisozimas e muitas outras moléculas, foram obtidas inicialmente de micro-organismos ou vírus e hoje já são produzidas industrialmente, por meio de micro-organismos geneticamente modificados, empregando clonagem. Esses produtos por sua vez contribuíram para financiamentos na área de biodiversidade microbiana em um primeiro momento. A própria clonagem é amplamente baseada em plasmídeos bacterianos “domesticados”. Esses elementos genéticos bacterianos extracromossômicos têm replicação e regulação independente; e os empregados comercialmente já foram amplamente editados empregando as enzimas supracitadas e estão minuciosamente mapeados, permitindo edições posteriores bastante dirigidas. É possível estocar DNA de outros organismos (formando bancos de DNA), expressar proteínas de forma heteróloga em condições bastante amplas (manipulando promotores gênicos artificiais), ou mesmo editar diretamente genes, misturando, deletando ou substituindo sequências de interesse. Naturalmente existem outros vetores para clonagem, como cromossomos artificiais bacterianos para bactérias, ou de levedura (e até humanos!), para eucariotos, mas plasmídeos representam uma alternativa relativamente fácil, barata e bastante difundida e estudada globalmente.

Os próximos capítulos ilustram produtos (farmacêuticos) e processos biotecnológicos (biorreatores, biorremediação), muitos dos quais baseados nessa diversidade microbiana e viral. A seguir, temos alguns outros exemplos.

### 3.1 VÍRUS COMO BIORREMIADOR

Estimativas atuais determinam que a quantidade de fósforo (P) que chega aos oceanos, causando eutrofização e comprometendo a qualidade das águas, é dez vezes maior que na era pré-industrial. A contaminação por P vem principalmente da eliminação de águas residuais da indústria e de sociedades urbanas, escoamento e lixiviação de solos enriquecidos em P por fertilizantes. Existem formas de tratar as águas residuais para a minimização do teor de P antes de sua chegada aos oceanos, baseadas em métodos químicos e biológicos. Os métodos químicos consistem na precipitação do P por agentes coagulantes, geralmente sais de ferro ou alumínio. O processo é bastante eficiente e igualmente caro. Os métodos biológicos consistem na remoção do P por bactérias que acumulam grande quantidade desse elemento. Infelizmente, o sistema perde sua eficiência ao longo do tempo. A utilização de vírus para remoção de P se baseia na descoberta recente de um gene que codifica uma proteína ligadora de P (*pstS*) em dois fagos (cianomiofagos P-SSM2 e P-SSM4) da cianobactéria ubíqua nos oceanos (*Prochlorococcus marinus*). A captação de P por cianobactérias infectadas pelo fago contendo esse gene é facilitada, ajudando a remover o P do meio e contribui para o início do ciclo lítico, que por sua vez produz e libera novas partículas virais que poderão infectar mais bactérias.

### 3.2 VÍRUS COMO PRODUTORES DE COSMÉTICOS

O vírus EhV-86 infecta e se replica em algas da espécie *Emiliania huxleyi*, uma alga unicelular com distribuição mundial e capaz de formar vastos *blooms* que podem cobrir extensões de até 100.000km<sup>2</sup>. EhV-86 tem em seu genoma um *cluster* de pelo menos sete genes que codificam esfingolípideos requeridos na formação da ceramida. A ceramida é incorporada na membrana celular e tem a função de facilitar a entrada e saída da partícula viral na célula hospedeira. Na indústria de cosméticos, a ceramida é utilizada em produtos para pele, cabelos e unhas, devido a sua capacidade de formar uma barreira contra a perda de água e sua associação com processos de envelhecimento, apoptose e repressão do ciclo celular. A ceramida utilizada atualmente pela indústria cosmética tem diversas origens e em parte é obtida de micro-organismos. A ceramida de origem vegetal provém de extratos de soja, trigo, sementes de arroz e espinafre; a de origem animal, de cérebro de bovinos, medula espinhal, ovo e pele e uma parte é de origem sintética. Cada caso apresenta suas desvantagens: a obtenção por meio microbiano é de alto custo; fontes vegetais produzem quantidades muito pequenas; a de origem animal apresenta riscos de contaminação por agentes patógenos e a produção sintética gera compostos indesejados e impactantes ao meio ambiente. Assim, a expressão e produção de ceramida pelo vírus EhV-86 representa uma fonte promissora de ceramida natural, sem as desvantagens já conhecidas.

### 3.3 VÍRUS COMO VACINA EM AQUACULTURA

*Penaeus stylirostris densovirus* (PstDNV) é responsável por grandes surtos letais em camarões do gênero *Penaeus*, cultivados em aquacultura em diversos países. Apesar do grande impacto econômico, não existe um meio efetivo de evitar tais surtos. Por outro lado, existem evidências que sugerem que o uso de vírus recombinante seria promissor como terapia gênica contra doenças em cultivos de camarão. Recentemente foi mostrado que a introdução de RNA de interferência (RNAi) reduziu efetivamente a replicação do PstDNV em grilos experimentalmente infectados (La Fauce; Owens, 2009). E partículas virais geneticamente modificadas (PstDNV-VLP - *Penaeus stylirostris densovirus* virus-like-particles) são capazes de encapsular quantidades substanciais de ácidos nucleicos, principalmente RNA, e capazes de se ligar e entrar em hemócitos (células do sistema imune de invertebrados) de camarão. Dessa forma, uma solução promissora sugere a inserção de RNAi em PstDNV recombinantes para atuarem como vetores de RNAi.

### 3.4 VÍRUS E SEU POTENCIAL POUCO EXPLORADO EM NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia envolve o desenvolvimento e manipulação de materiais e estruturas de tamanhos entre 1nm e 100nm. Diversas áreas do conhecimento investem em nanotecnologia com interesses que vão de novas tecnologias, materiais até nanocompartimentos para aplicações em tratamentos médicos e diagnósticos. Características virais têm chamado a atenção dessa área para o potencial das partículas virais como *nanocontainers*: seu tamanho e sua capacidade de reunir e liberar o conteúdo de seu capsídeo espontaneamente, que ainda pode ser modificada por engenharia genética, com adaptação das condições em que a

encapsidação ocorre, bem como incluindo funcionalidades (Fischlechner; Donath, 2007). A diversidade viral nos oceanos atinge níveis sem precedentes, encerrando um potencial genético imensurável para a nanotecnologia. Esse potencial genético inclui as diversas formas (esférico, icosaédrico, filamentosos, formato de bastão, fusiforme e caudado) e tamanhos que o capsídeo pode assumir permitindo adequar-se à função – por exemplo, na entrega de substâncias terapêuticas.

### **3.5 BACTÉRIAS COMO SOLUÇÃO PARA O LIXO DE PLÁSTICO**

Atualmente o mundo produz mais de 320 milhões de toneladas de lixo plástico por ano (2015), resultado de pouca reciclagem e do uso de produtos descartáveis, principalmente embalagens. O plástico já é apontado como o maior poluidor de águas marinhas, causando grande dano à vida selvagem e às comunidades humanas que dependem de recursos do mar. A porcentagem de plástico biodegradável utilizada é muito baixa (feito de ácido polilático [PLA] e de poli-hidroxialcanoato [PHA], compondo 5,1 e 1,6%, respectivamente, dos plásticos totais produzidos), embora a melhor maneira de minimizar o problema seja evitar a produção de mais lixo plástico, substituindo os materiais utilizados atualmente por outros biodegradáveis de custo efetivo. Uma alternativa ainda não alcançada seria o desenvolvimento de métodos de degradação do plástico recalcitrante (de difícil degradação). Recentemente, hidrolases microbianas emergiram como solução promissora para reinserção do lixo plástico no ciclo de biodegradação. Poliésteres hidrolases se mostraram capazes de degradar plástico sintético de origem fóssil (feito de polietileno, poliestireno, poliuretano e polietileno tereftalato [PET]), produzindo compostos que retornam ao ciclo de biodegradação. Além disso, os genes dessas enzimas puderam ser expressos de forma heteróloga, possibilitando a manipulação e engenharia genética em favor de um sistema eficiente (Wei; Zimmermann, 2017).

### **3.6 BACTÉRIAS COMO PRODUTORAS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO**

A produção de nanopartículas de ouro é de interesse de diversas áreas, como optoeletrônica, fotônica, tecnologia de imageamento, administração de drogas terapêuticas e ciência espacial. Atualmente, as nanopartículas de ouro utilizadas pela indústria e pesquisa são produzidas por vias químicas, envolvendo solventes orgânicos tóxicos, prejudiciais ao ambiente e com baixo rendimento. Embora se saiba que os oceanos são as fontes de ouro mais ricas da natureza e que bactérias interagem com diversos metais, especialmente no que concerne a biorremediação e biolixiviação, só recentemente mostrou-se que a bactéria *Marinobacter pelagius* foi capaz de sintetizar nanopartículas de ouro a partir de solução de  $\text{HAuCl}_4$  (Sharma et al., 2012).

## **4 | CONCLUSÕES**

## 4.1 PERSPECTIVAS

É provável que nossa compreensão da biodiversidade microbiana continue a se expandir e se aprimorar nos próximos anos. Certamente novos grupos (incluindo filós) serão descobertos, e provavelmente influenciarão nosso entendimento da árvore filogenética da vida como um todo, como vem acontecendo nos últimos anos. É bem provável que no meio acadêmico, ao menos, essa proeminência dos micro-organismos em termos evolutivos se estabeleça melhor. Estudos ecológicos dessa diversidade microbiana também deverão continuar a ser produzidos e refinados. Novas ferramentas e técnicas ainda estão sendo inventadas e desenvolvidas para responder perguntas nessa área. Em paralelo, alguns avanços conceituais já começam a ser desenvolvidos, igualmente revendo conceitos ecológicos tradicionais, restritos a plantas e animais, expandindo-os para incluir as demais formas de vidas dominantes no planeta, os micro-organismos, em toda sua diversidade, complexidade e importância.

Novos bioprodutos e bioprocessos derivados de micro-organismos e vírus – ou contendo-os – certamente devem surgir na área aplicada. Explorando mais a biodiversidade microbiana encontramos mais biomoléculas de interesse que podem gerar produtos biotecnológicos interessantes, se devidamente exploradas. O emprego dessas novas ferramentas também avança em nosso conhecimento de bioprocessos como o funcionamento de biorreatores, ou fermentação, ou biorremediação, e permitem que esses processos tecnológicos de interesse sejam otimizados.

Em suma, vemos um futuro amplamente promissor em termos de exploração de biodiversidade microbiana em contexto biotecnológico.

## 4.2 OPORTUNIDADES E DESAFIOS

O futuro promissor, rapidamente vislumbrado acima, sugere grandes oportunidades para estudos em biodiversidade microbiana, envolvendo (e resultando em novas) ferramentas biotecnológicas. Trata-se de um campo dinâmico e bastante orientado por tecnologias, em avanço constante e ainda sem sinal de saturação. Apesar dos avanços consideráveis, é claro como nosso entendimento de biodiversidade e ecologia microbiana ainda é inicial e novos estudos certamente adicionarão conteúdos à área que devem inclusive forçar revisões de outros conceitos clássicos já incorporados.

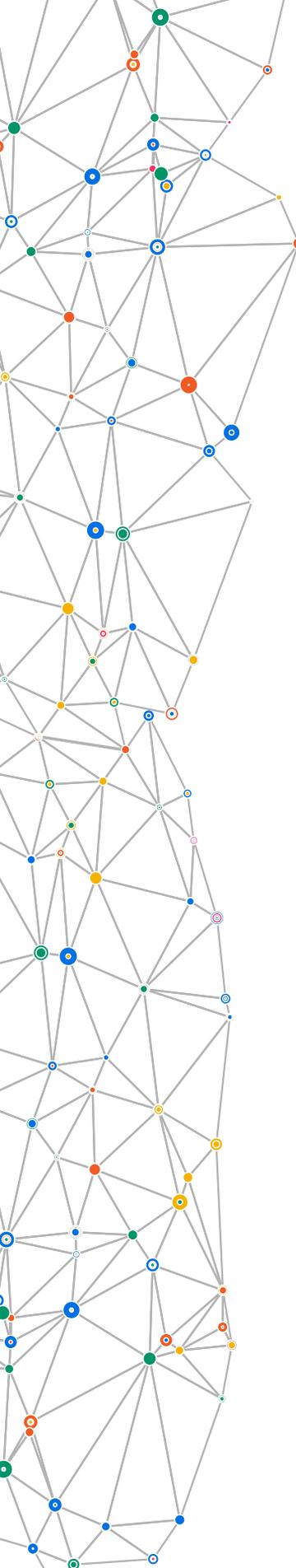
Esse dinamismo e ampla atuação, no entanto, também representam desafios consideráveis. É essencial a atualização constante em termos de ideias e metodologias para ao menos acompanharmos esses avanços. No Brasil, ainda precisamos lidar com um atraso na disponibilização e incorporação dessas novas tecnologias, o que implica competição desigual com grupos de destaque nos Estados Unidos e Europa. No entanto, criatividade, perguntas bem embasadas e parcerias internacionais permitem superar tais desafios.

## REFERÊNCIAS

- Falkowski, P.G. (2015) **Life's Engines: How Microbes Made Earth Habitable**. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Fischlechner, M.; Donath, E. (2007) Viruses as building blocks for materials and devices. **Angew. Chem. Int. Ed Engl.** 46: 3184-3193. doi:10.1002/anie.200603445
- Hyman, P.; (2012) Bacteriophages and nanostructured materials. **Adv. Appl. Microbiol.** 78: 55-73. doi:10.1016/B978-0-12-394805-2.00003-8
- Hug, L.A.; Baker, B.J.; Anantharaman, K.; Brown, C.T.; Probst, A.J.; Castelle, C.J.; Butterfield, C.N.; Hermsdorf, A.W.; Amano, Y.; Ise, K.; Suzuki, Y.; Dudek, N.; Relman, D.A.; Finstad, K.M.; Amundson, R.; Thomas, B.C.; Banfield, J.F. (2016) A new view of the tree of life. **Nat Microbiol.** 1:16048. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.48.PMID: 27572647.
- John, S.G.; Mendez, C.B.; Deng, L.; Poulos, B.; Kauffman, A.K.M.; Kern, S.; Brum, J.; Polz, M.F.; Boyle, E.A.; Sullivan, M.B. (2011) A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation. **Environ. Microbiol. Rep.** 3: 195-202. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00208.x
- La Fauce, K.A.; Owens, L. (2009) RNA interference reduces PmergDNV expression and replication in an in vivo cricket model. **J. Invertebr. Pathol.** 100: 111-115. doi:10.1016/j.jip.2008.10.006
- Lenski, R.E. (2017) Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. **ISME J.** 11: 2181-2194. doi:10.1038/ismej.2017.69
- Sharma, N.; Pinnaka, A.K.; Raje, M.; Fnu, A.; Bhattacharyya, M.S.; Choudhury, A.R. (2012) Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles. **Microb. Cell Factories** 11; 86. doi:10.1186/1475-2859-11-86
- Spang, A.; Saw, J.H.; Jørgensen, S.L.; Zaremba-Niedzwiedzka, K.; Martijn, J.; Lind, A.E.; van Eijk, R.; Schleper, C.; Guy, L.; Ettema, T.J.G. (2015) Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. **Nature.** 521: 173-179. doi:10.1038/nature14447
- Takacs, P.D. (1996) **The Idea of Biodiversity: Philosophies of Paradise**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Wei, R.; Zimmermann, W. (2017) Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? **Microb. Biotechnol.** n/a-n/a. doi:10.1111/1751-7915.12710.
- Williams, T.A.; Foster, P.G.; Cox, C.J.; Embley, T.M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. **Nature.** 504: 231-236. doi:http://dx.doi.org/ 10.1038/nature12779.
- Zaremba-Niedzwiedzka, K.; Caceres, E.F.; Saw, J.H.; Bäckström, D.; Juzokaite, L.; Vancaester, E.; Seitz, K.W.; Anantharaman, K.; Starnawski, P.; Kjeldsen, K.U.; Stott, M.B.; Nunoura, T.; Banfield, J.F.; Schramm, A.; Baker, B.J.; Spang, A.; Ettema, T.J.G. (2017) Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. **Nature.** 541: 353-358. doi:10.1038/nature21031.







# BIODIVERSIDADE DE MICRO- ORGANISMOS EUCARIONTES

Melissa Fontes Landell<sup>a</sup>  
Leonardo Broetto<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Alagoas

## RESUMO

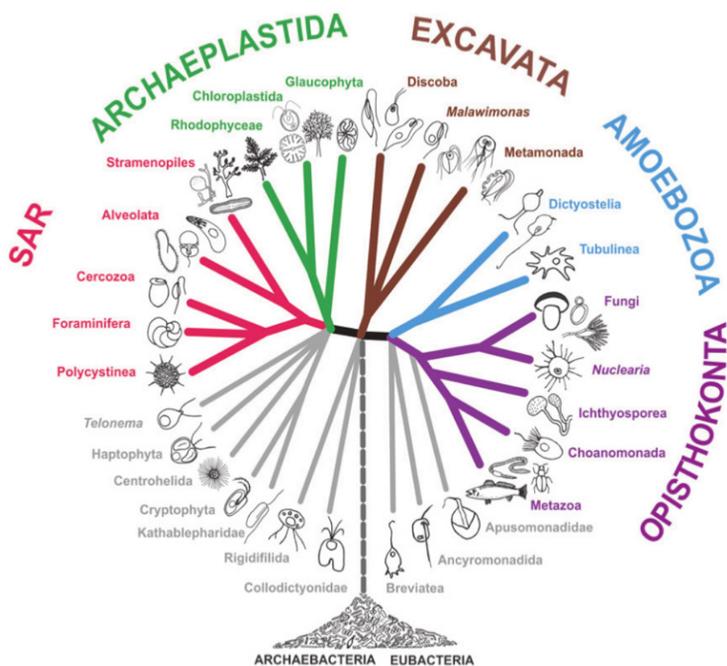
Micro-organismos eucariontes são encontrados em diferentes habitats do planeta, incluindo ambientes terrestres, de água doce e marinhos. Estudos recentes indicam grande diversidade desses organismos em ambientes marinhos, que era desconhecida antes do desenvolvimento de técnicas de identificação molecular. O reino dos fungos compreende uma grande porção dos micro-organismos da Terra, possuindo importante diversidade de filos e subfilos, assim como diversidade morfológica, de habitats e em relação às funções por eles desenvolvidas, distribuindo-se por todo o planeta. Embora concentrem todas essas características, a diversidade dos fungos é pouco estudada e conhecida no ambiente marinho, o que justifica a importância de estudos nesse ambiente. Microalgas são organismos fotossintetizadores, não necessariamente relacionados filogeneticamente, responsáveis pela produtividade primária em diversos ecossistemas marinhos. Foram desenvolvidas abordagens metodológicas bem definidas para a coleta, isolamento, preservação e identificação de micro-organismos, possibilitando exploração sistemática da biodiversidade desses grupos. A capacidade para a produção de diversos compostos com aplicações biotecnológicas faz de fungos e microalgas importantes alvos para a prospecção de recursos naturais. Soma-se a isso a diversidade de condições físicas e químicas no ambiente marinho, que permite evolução de moléculas com grande variedade de funções e, conseqüentemente, potenciais aplicações para o homem. A grande variedade de produtos naturais já descobertos e com aplicação prática na indústria, derivados de fungos marinhos e microalgas, é um forte incentivo para o continuado esforço na prospecção desses micro-organismos. Muitos destes são bons produtores de compostos, podendo ser manipulados para máxima produção unicamente por modulação dos nutrientes a eles oferecidos. Em alguns casos, esses micro-organismos podem ser manipulados geneticamente de forma a obter-se uma produção mais eficiente desses compostos. Por fim, produtos naturais de origem gênica obtidos de outros organismos e micro-organismos marinhos podem ser expressos ou produzidos, principalmente em leveduras, com o auxílio de ferramentas de biologia molecular.

1

# BIODIVERSIDADE E TAXONOMIA DE MICRO-ORGANISMOS EUKARIOTES

Os seres vivos em três grandes domínios: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*. Organismos eucariotes surgiram há aproximadamente 2,1 bilhões de anos e são caracterizados pela presença de um envoltório nuclear, além de organelas celulares delimitadas por membranas, como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Evidências moleculares e na estrutura celular indicam que o eucariote ancestral se formou a partir da endossimbiose entre uma bactéria e uma arqueia, tendo um segundo evento de endossimbiose, entre o eucariote ancestral e uma Alphaproteobacteria, levando à formação da mitocôndria, a organela respiratória presente em virtualmente todos os eucariotes.

Ainda não há consenso formal sobre a classificação filogenética dos organismos eucarióticos. Entretanto, são reconhecidos cinco grandes grupos monofiléticos (Figura 1, Adl et al., 2012): Archaeplastida, que inclui as algas verdes e plantas terrestres; Opisthokonta, que inclui os animais e fungos; Excavata, que inclui membros como os parasitas *Trichomonas vaginalis* e *Giardia lamblia*; Amoebozoa, que inclui os organismos amebóides, como o modelo *Dictyostelium* sp.; e o supergrupo SAR, incluindo Stramenopila (Diatomáceas, Chrysophyceas e algas pardas), Alveolata (Ciliados, Dinoflagelados e Apicomplexa) e Rhizaria (Radiolários e Foraminíferos) (Adl et al., 2012).



**Figura 1.** Classificação filogenética do domínio Eukarya, com os cinco grandes grupos monofiléticos destacados. Retirado de Adl et al., 2012.

Organismos multicelulares ocorrem apenas dentro do domínio eucariótico, tendo linhagens multicelulares surgido independentemente em animais (Opisthokonta: Animalia), fungos (Opisthokonta: Fungi), plantas terrestres (Archaeplastida: Embriophyta) e nas algas verdes (Archaeplastida: Chlorophyta), vermelhas (Archaeplastida: Rhodophyta) e pardas (Stramenopila: Phaeophyta) (Keeling, 2004). Entretanto, a associação do domínio eucariótico a organismos multicelulares reflete um viés do nosso conhecimento sobre o grupo: a maior parte dos filos eucarióticos são compostos por espécies exclusivamente unicelulares. Estudos recentes de diversidade molecular têm revelado uma enorme diversidade não estudada de micro-organismos eucariontes, indicando que esse viés é ainda maior do que se esperava. Micro-organismos eucariontes estão presentes em todos os habitats do planeta, em grande diversidade ecológica e funcional, havendo espécies autotróficas e espécies heterotróficas, espécies de vida livre, simbiotes e parasitas. Neste capítulo, estudaremos dois grupos de micro-organismos eucariontes com especial interesse biotecnológico: fungos e microalgas.

## 1.1 FUNGOS

O reino Fungi é constituído por organismos eucariotos, heterotróficos, que possuem diversas funções ecológicas importantes no ambiente, sejam elas como saprófitas, patógenos ou mutualistas. São organismos-chave para o ambiente, intimamente envolvidos com a ciclagem dos nutrientes, e em alguns ecossistemas são os principais decompositores, mas também existem espécies que atuam como parasitas e simbiotes. Por sua diversidade de nichos, os fungos representam uma porção significativa dos micro-organismos na Terra.

O reino era tradicionalmente classificado em quatro grupos principais: Ascomycota, Basidiomycota, Zigomycota e Chytridiomycota. Esse modelo taxonômico foi revisto por vários autores ao longo dos últimos anos e a atual classificação é composta pelo sub-reino Dikarya (filos Ascomycota e Basidiomycota) e o filo irmão Entorrhizomycota, além dos subfilos Glomeromycota, Mucoromycotina, Mortierellomycotina, Entomophthoromycota, Kickxellomycotina, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota e Microsporidia. Alguns dos subfilos acima citados faziam parte do filo Zygomycota e hoje são chamados de fungos basais (Hibbett et al., 2007; Bauer et al., 2015). Entretanto, no ano de 2018, Tedersoo e colaboradores propuseram uma nova classificação, baseada principalmente em dados genômicos obtidos por meio de sequenciamento de nova geração. Assim, os autores propuseram nove sub-reinos: Dikarya (Basidiomycota, Ascomycota e Entorrhizomycota), Mucoromycota (Calcarisporiellomycota, Glomeromycota, Mortierellomycota e Mucoromycota), Zoopagomycota (Entomophthoromycota, Kickxellomycota, Zoopagomycota), Chytridiomycota (Chytridiomycota, Monoblepharomycota, Neocallimastigomycota) com vários filos, e Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Blastocladiomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota, com um filo cada. Os autores também propuseram o Reino Nucleariæ (Filos Nucleariida e Fonticulida) como um grupo irmão dos Fungos. Apesar de se estimar a existência de 3,5 a 5,1 milhões de espécies, ainda está muito distante de se conhecer a diversidade de fungos. O aumento no conhecimento sobre a diversidade de fungos deve-se, principalmente, às novas abordagens independentes de cultivo.

Os fungos apresentam grande diversidade morfológica, de habitat e funcional. Muitos

fungos são cosmopolitas e se distribuem por praticamente todo o planeta em diversos ecossistemas, alguns bem singulares e extremos, como desertos e ambientes hipersalinos, geleiras, plantas tropicais, manguezais, solo e ambientes marinhos. A distribuição geográfica dos fungos está relacionada a fatores climáticos como temperatura e precipitação, e edáficos, como o pH e a disponibilidade e concentração de nutrientes.

No ambiente marinho, já foram relatados, além de fungos saprofiticos, vários gêneros de parasitas terrestres, como: *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cordyceps*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Histoplasma*, *Malassezia*, *Sporothrix*, *Taphrina* e *Ustilago* (Richards et al., 2012; Jones et al., 2015). Muitos desses gêneros tiveram sua presença generalizada em ambientes marinhos através de técnicas independentes de cultivo. Fungos oportunistas também são encontrados e infectam principalmente invertebrados marinhos que estão debilitados por causas antropogênicas e mudanças climáticas.

### 1.1.1 FUNGOS FILAMENTOSOS MARINHOS

Apesar de ser uma das formas de vida mais bem sucedidas também nos oceanos e mares, a diversidade de fungos marinhos ainda é pouco conhecida, em comparação, por exemplo, com o ambiente terrestre. Os fungos são raros no ambiente marinho, por isso são poucas as espécies que se consegue recuperar em meios de cultura. Entretanto, podem ser encontrados desde a superfície até quilômetros de profundidade. Kis-Papo (2005) sugere que entre as espécies cultivadas em laboratório existem cerca de 467 isolados pertencentes a 244 gêneros isolados de ambientes marinhos. O autor estima que apenas 0,6% dos fungos estudados são oriundos do ambiente marinho, contrastando com a grande extensão que os habitats marinhos cobrem na Terra (~70%). Jones e colaboradores (2015) descrevem 1112 espécies de fungos marinhos, pertencentes a 129 famílias, 65 ordens e classificadas em 472 gêneros, sendo 805 espécies (352 gêneros) pertencentes ao filo Ascomycota e 21 espécies pertencentes ao filo Basidiomycota (17 gêneros), 26 espécies pertencentes ao Chytridiomycota e relacionados (incluindo 13 gêneros), três espécies de Zygomycota (dois gêneros), uma espécie pertencente ao filo Blastocladiomycota e leveduras marinhas pertencentes aos filios Ascomycota (138 espécies e 35 gêneros) e Basidiomycota (75 espécies e 26 gêneros).

No que diz respeito ao papel desses micro-organismos no ambiente marinho, sabe-se que são os principais decompositores de restos de animais em ambientes marinhos costeiros e de superfície, além de contribuir na decomposição de substratos herbáceos e lenhosos, considerados importantes cicladores de nutrientes, bem como parasitas de produtores primários. Essa capacidade é uma consequência da evolução da biologia celular dos fungos. A parede celular das células fúngicas é robusta e rica em quitina, além de suas estratégias de alimentação exclusivamente osmotrófica. O processo de alimentação osmotrófica envolve a secreção de enzimas hidrolíticas que degradam o substrato presente naquele habitat, seguida pelo transporte dos nutrientes, geralmente como monômeros digeridos para dentro da célula. Assim, os fungos prosperam em ambientes nutricionalmente ricos, tais como plantas e animais hospedeiros, solo, sedimentos e detritos, onde podem se aderir ao substrato, secretar as enzimas necessárias, hidrolisar polímeros complexos e absorver os nutrientes.

A parede celular, por ser rica em quitina, reforça a célula fúngica, permitindo resistência à pressão osmótica, não só do ambiente em que se encontra, mas também aquela produzida durante o processo de alimentação osmotrófica, resistência estrutural que ocorre durante o crescimento e desenvolvimento celular, e ambiental devido à diversidade de ambientes em que esses micro-organismos podem se desenvolver. Essas adaptações os auxiliam a ter sucesso ecológico, devido às altas taxas metabólicas e rápido crescimento. Essas características, ao mesmo tempo em que conferem sucesso aos fungos em alguns ambientes, podem explicar por que são pouco diversos e pouco abundantes no ambiente marinho, principalmente em colunas de água. Entretanto, em regiões onde há matéria particulada e sedimento, há a possibilidade de encontrar fungos, principalmente sapróbios e parasitas de animais marinhos.

### 1.1.2 LEVEDURAS MARINHAS

Leveduras são fungos predominantemente unicelulares, porém algumas espécies alternam entre fase unicelular e fase filamentosa. Outras podem variar da fase unicelular para uma fase em que há a formação de pseudo-hifas, sendo conhecidas como fungos dimórficos, *yeast-like* ou fungos leveduriformes. Assim como os demais fungos, leveduras também são importantes decompositores nos ecossistemas e, frequentemente, um dos primeiros grupos a colonizar substratos ricos em nutrientes.

As leveduras se reproduzem principalmente de forma assexuada por brotamento ou fissão. Porém, podem apresentar também estágios de reprodução sexual. São amplamente distribuídas ao redor do planeta e estão presentes em múltiplos habitats e nichos. De acordo com a lista de espécies na última edição do livro *The Yeasts: a Taxonomic Study*, estima-se que existam aproximadamente 1500 espécies descritas de leveduras (Kurtzman; Fell; Boekhout, 2011). Esse número representa apenas 1% da riqueza existente (Fell, 2001). Estão agrupadas em dois filos do reino Fungi: Ascomycota e Basidiomycota. Dentro do filo Ascomycota, estão presentes nos subfilos Pezizomycotina, Taphrinomycotina e Saccharomycotina. No filo Basidiomycota também estão presentes em três subfilos: Pucciniomycotina, Agaricomycotina e Ustilaginomycotina.

As leveduras são distribuídas em quase todo o ambiente aquático, incluindo oceanos e mares, estuários, lagos e rios. Entretanto, são chamadas leveduras marinhas aquelas que sobrevivem melhor em água do mar, assim como crescem melhor em meios de cultura que contenham água do mar em sua composição. Os principais gêneros representantes de leveduras marinhas e costeiras pertencem ao filo Ascomycota. *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* são alguns dos gêneros mais comuns. Além destes, leveduras de gêneros pertencentes ao filo Basidiomycota, como *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* também podem ser encontradas no ambiente marinho. São divididas em facultativas ou obrigatórias quanto ao seu desenvolvimento no habitat. Ocorrem frequentemente em regiões com altas concentrações de matéria orgânica, como a zona costeira. Entretanto, Fatores ambientais, tais como luz, pH, salinidade e temperatura, também podem afetar a composição da comunidade de leveduras (Kutty; Philip, 2008).

As leveduras têm sido utilizadas na indústria para a produção de etanol e CO<sub>2</sub>; são im-

portantes para a fabricação de bebidas fermentadas, como cerveja e vinho, e destiladas, como a cachaça, e na indústria de panificação. Também são importantes na indústria por atuar na conversão de açúcares de plantas, por exemplo, em biomassa e outros subprodutos com valor comercial. Algumas leveduras são patogênicas para plantas e animais, incluindo o homem, e são conhecidas por serem ricas em proteínas, lipídeos e vitaminas.

As primeiras leveduras marinhas foram isoladas por Bernhard Fischer, em 1984, no Oceano Atlântico, e identificadas como *Torula* sp. e *Mycoderma* sp. A partir dessa descoberta, várias outras leveduras marinhas foram isoladas ao redor do mundo em diferentes locais e fontes, incluindo de água salgada, de algas marinhas, de peixes e mamíferos marinhos, assim como de pássaros. Dentre essas leveduras, algumas leveduras marinhas foram originadas de habitats terrestres (agrupadas como leveduras marinhas facultativas), as quais foram encontradas sobrevivendo em ambiente marinho (Kutty; Philip 2008).

## 1.2 MICROALGAS

Algas são definidas como organismos fotossintetizantes, com clorofila a, que não possuem diferenciação de tecidos (Guiry, 2012). Essa classificação agrupa organismos distantes filogeneticamente, representantes de diferentes divisões dentro do domínio eucariótico (Figura 1), como Archaeplastida (que inclui as clorófitas, glaucófitas e rodófitas), Stramenopila (incluindo diatomáceas – Bacillariophyceae – e algas pardas – Phaeophyceae –, entre outras classes), Haptophyta (coccolitoforídeos, como a microalga *Emiliana huxley*) e Cryptophyta (que inclui as criptomonas), além de linhagens fotossintetizantes de Alveolata (que incluem o filo Chromerida e dinoflagelados fotossintetizantes, como *Karenia brevis*, responsável pela formação de marés vermelhas no Caribe, e o simbiote de corais *Symbiodinium* sp.) (Keeling, 2004; Guiry, 2012; Janouskovec et al., 2013). Até mesmo cianobactérias, organismos procarióticos fotossintetizantes, podem ser classificadas como microalgas. Estima-se que existam em torno de 70.000 espécies de algas descritas formalmente no mundo (Guiry, 2012). Apesar da grande variação entre as estimativas realizadas, estas são certamente subestimativas da diversidade biológica total do grupo. Análises de diversidade molecular indicam que esse número corresponda a apenas 1% da diversidade total de microalgas marinhas. Estudos do recente cruzeiro global *Tara Oceans* indicam que o número de dinoflagelados e Bacillariophyta (diatomáceas) na zona fótica dos oceanos pode passar de 20.000 e 3.000 espécies, respectivamente, mesmo não considerando as áreas costeiras (De Vargas et al., 2015).

O polifiletismo das algas é explicado pela forma como esses organismos evoluíram. Os primeiros organismos fotossintetizantes na Terra, ancestrais das cianobactérias modernas, surgiram há aproximadamente 3,6 bilhões de anos (Gould; Waller; McFadden, 2008). Os primeiros eucariotos fotossintetizantes surgiram há aproximadamente 1,6 bilhões de anos, a partir de uma endossimbiose entre um ancestral eucarioto e cianobactérias, dando origem aos cloroplastos na célula eucariótica. Esse evento de endossimbiose primária deu origem às linhagens de clorófitas, rodófitas e glaucófitas. Posteriormente, eventos independentes de endossimbiose secundária, em que um ancestral eucarioto retém o cloroplasto de um eucarioto fotossintetizante, deram origem às linhagens de algas em Stramenopila, Alveolata, Haptophyta, Cryp-

tophyta e Euglenas. Há ainda evidências de novos eventos de endossimbiose em linhagens de dinoflagelados que retiveram o cloroplasto de um ancestral das diatomáceas ou Haptophyta, sendo assim uma endossimbiose terciária. Por fim, há casos em que os plastídeos foram perdidos ou então degenerados, como no filo Apicomplexa (Alveolata), que inclui importantes patógenos humanos, como o *Plasmodium falciparum*, causador da malária. Esses parasitas são filogeneticamente relacionados a linhagens das algas *Chromera velia* e *Vitrella brassiformis* (Chromerida), porém o plastídeo (apicoplasto) não possui função fotossintetizante, sendo assim um importante alvo de pesquisas médicas (Janouskovec et al., 2013). Do ponto de vista biotecnológico, a complexa evolução das microalgas pode ser vista como um grande experimento natural de expressão heteróloga, em que um conjunto de genes de interesse é introduzido em diferentes hospedeiros. Assim, há uma grande potencial biotecnológico do grupo.

Microalgas são encontradas em ambientes marinhos, de água doce e até mesmo terrestres e em geleiras. Por serem fotossintetizantes, a distribuição desses organismos é determinada pela incidência de luz no ambiente, estando concentrada na região fótica dos ambientes marinhos. Não apenas a incidência, mas também comprimento de onda da luz, são importantes fatores que determinam a distribuição de microalgas: organismos com pigmentos fotossintéticos acessórios como peridina ou ficoeritrina são capazes de habitar regiões mais profundas da coluna d'água, devido à absorção de luz por esses pigmentos, que é complementar à absorção da clorofila. Além da luz, fatores ambientais como temperatura, salinidade, concentração de nutrientes e poluentes são determinantes para a estrutura das comunidades de fitoplâncton. Florações de microalgas podem ser observadas em regiões costeiras, onde há maior disponibilidade de nutrientes, favorecendo as espécies de crescimento rápido. Muitas vezes, essas florações são causadas por espécies capazes de produzir toxinas, como *Karenia brevis* (Dinoflagellata), *Aureococcus* sp. (Stramenopila, Pelagophyceae), *Heterosigma akashiwo* e *Chattonella* sp. (Stramenopila, Raphidophyceae) (Hallegraeff, 2003). Toxinas produzidas por dinoflagelados são responsáveis pela mortalidade de peixes e animais marinhos, acarretando prejuízos ambientais e econômicos. Essas toxinas também podem ser transferidas pela cadeia alimentar, causando intoxicação em humanos, com efeitos neurológicos e gastrointestinais.

Microalgas possuem diversas aplicações biotecnológicas (Tabela 1), como suplementos alimentares para humanos e animais (ex.: *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella salina*), cosméticos (*D. salina*), além do potencial para a produção de biocombustíveis (*Botryococcus braunii*, *Schizochytrium* sp.). Muitos dos produtos naturais extraídos de algas estão relacionados à absorção de luz, à atividade fotossintetizante e fixação de carbono, como polissacarídeos, ácidos graxos e pigmentos. O controle e modulação dos fatores ambientais serão determinantes para uma eficiente produção do produto natural a ser extraído da microalga: como um exemplo, sabe-se que altas salinidades e irradiância solar induzem a produção de  $\beta$ -caroteno em *D. salina* (Chlorophyta).

## 2 | ABORDAGENS METODOLÓGICAS PARA O ESTUDO DE MICRO-ORGANISMOS EUKARIOTES MARINHOS

## 2.1 MÉTODOS DE COLETA, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO

### 2.1.1 COLETA

As técnicas para coleta devem ser adaptadas ao micro-organismo e ao ambiente em que se quer amostrar. A maioria dos fungos marinhos, incluindo fungos filamentosos e leveduras, são aeróbios obrigatórios e necessitam de oxigênio para crescimento e reprodução. Já as microalgas dependem de uma fonte de luz e nutrientes inorgânicos para a sobrevivência.

Amostras de águas rasas podem ser coletadas manualmente em frascos estéreis e sacos plásticos. Para análise, geralmente 250ml são adequados. Entretanto, o volume a ser coletado deve ser analisado de acordo com o objetivo da pesquisa. Amostras oceânicas de 1 litro ou mais são rotineiramente necessárias. Para amostras de sedimentos, volumes de aproximadamente 50ml são suficientes. O planejamento de amostragem deve reconhecer a distribuição desigual das populações microbianas para incluir réplica das amostras.

A amostragem de organismos presentes na coluna d'água também pode ser feita pela filtração da água do mar com redes de plâncton. A abertura da malha do filtro é escolhida de acordo com o tamanho esperado do organismo a ser amostrado. Microalgas são encontradas nas classes de tamanho do picoplâncton (0,2–2µm), nanoplâncton (2–20µm) e micropoplâncton (20–200µm), com a maior abundância concentrada no nanoplâncton. Fungos, apesar de mais raros na coluna d'água, serão encontrados no micropoplâncton. Para otimizar a coleta, é aconselhável fazer uma pré-filtração, com redes de malha maior, a fim de eliminar organismos plancônicos como crustáceos e pequenos invertebrados.

Os sedimentos e águas profundas podem ser remotamente coletados por meio de garrafas oceanográficas. Os aparelhos mais comuns são as garrafas de Niskin, Van Dorn e Kemmerer. Van Dorn é um amostrador horizontal; enquanto Kemmerer e Niskin são amostradores verticais. Esses equipamentos podem coletar amostras a 6000m de profundidade (Zaky et al., 2014).

### 2.1.2 ISOLAMENTO

Os métodos tradicionais de isolamento e cultivo de micro-organismos utilizam meios de cultura e condições de crescimento seletivos, uma vez que espécies de crescimento rápido podem superar as espécies de crescimento mais lento. É também necessário o controle de populações bacterianas, uma vez que, de modo geral, o crescimento bacteriano é muito mais acelerado que o de micro-organismos eucariotos. As bactérias são inibidas pela adição de antibióticos como cloranfenicol, penicilina, kanamicina, ampicilina e estreptomomicina ou rifampicina ao meio.

Esses métodos tradicionais apresentam limitações no que diz respeito ao número máximo de colônias que podem ser acomodadas numa placa de cultivo. Conseqüentemente, espécies raras podem não estar representadas. Para superar essas limitações, é necessária uma consideração cuidadosa das condições ambientais. Meios de cultura e condições de cultivo que favoreçam micro-organismos diferentes podem ser empregados pelo pesquisador.

Geralmente o método mais utilizado para a amostragem de fungos marinhos (fungos filamentosos e leveduras) emprega a filtração da água através de membranas de nitrocelulose de 0,22µm ou 0,47µm de diâmetro e com poro de 0,45µm, utilizando um sistema de filtração de vidro ou plástico autoclavável, com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após a filtração, a membrana de nitrocelulose é colocada virada para cima na superfície do meio de cultura escolhido.

Para o isolamento de fungos filamentosos, geralmente utilizam-se meios sólidos com alguma fonte de carbono e de nitrogênio, como o Ágar Extrato de Malte 3% (3% de extrato de malte, 0,5% de peptona e 1,5% de ágar), Ágar Batata Dextrose ou Ágar Fubá, todos preparados utilizando água do mar artificial ou coletada no próprio ambiente que será amostrado para o isolamento dos fungos. Para o isolamento de leveduras já foram descritos vários meios de cultura. Entretanto, um meio amplamente utilizado é o meio Wickerham's YM (contém 0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1% de glucose e 2% de ágar) preparado com água do mar a uma salinidade equivalente ao local da amostra (Wickerham, 1951).

Para amostras de sedimento, as partículas do sedimento podem ser colocadas diretamente sobre o meio de cultura ou quantidades conhecidas de sedimento podem ser colocadas em um tubo de ensaio com um determinado volume de água do mar estéril, agitada e diluída 1:10 numa série de água do mar estéril, seguida da inoculação no meio de cultura escolhido. A sonicação (submissão da amostra a ondas de ultrassom) pode ser usada para isolar organismos epibiontes ou que estejam mais fortemente aderidos ao sedimento.

Cultivos de microalgas mantidos em água do mar apresentam um rendimento inadequado para a manutenção da cultura. Uma solução é o enriquecimento da água do mar com os nutrientes necessários para o crescimento de microalgas, como nitratos, fosfatos e, no caso de diatomáceas, uma fonte de silício para a formação das frústulas (Andersen; Kawachi, 2005). Além desses macronutrientes, microalgas também dependem de fontes externas de vitaminas (B1 - tiamina, B7 - biotina, e B12 - cianocobalamina) e micronutrientes (ferro, manganês, zinco, cobre, cobalto e molibdênio). O uso de quelantes metálicos como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é necessário para manter o ferro em solução durante o processo de autoclave, além de evitar a toxicidade de metais-traço. Os meios mais utilizados para o cultivo de microalgas (ex.: Provasoli, F2, K) adicionam uma combinação desses macro e micronutrientes sobre uma base de água do mar estéril (Harrison; Berges, 2005). É importante ter uma boa fonte de água do mar, a fim de garantir a composição do meio. Em geral utilizam-se águas mais afastadas da costa, uma vez que regiões costeiras estão mais sujeitas a entradas de nutrientes e florações de fitoplâncton, alterando assim a composição da água. Pode-se utilizar água do mar artificial, em que se reconstitui a composição da água do mar a partir de água destilada, porém esses meios de cultivo tendem a ser mais complexos. Essa é uma alternativa quando não há um fácil acesso a água do mar natural. Entre os meios artificiais, destacam-se as variações da série ASP, além de formulações comerciais, como *Instant Ocean* e *Red Sea Salt*.

O isolamento e o cultivo de microalgas podem ser feitos em meios líquidos ou sólidos, com adição de ágar (1%). No caso dos meios sólidos, o isolamento é feito de forma semelhante ao isolamento de leveduras, com o espalhamento da amostra no ágar e o re-espalhamento de colônias isoladas até obter uma cultura pura. Entretanto, é comum que a microalga não se adapte bem ao meio sólido, sendo necessário fazer o isolamento e o cultivo em meio líquido.

Novamente, o enriquecimento da amostra pode ser feito com condições de cultivo que favoreçam a espécie-alvo, mas, com a impossibilidade de separar fisicamente a amostra, novas técnicas são necessárias para controlar o potencial crescimento de micro-organismos competidores ou predadores. Diatomáceas são microalgas que apresentam altas taxas de crescimento e boa adaptação a condições de cultivo, e podem facilmente se sobrepor à microalga de interesse. Nesse caso, o controle do crescimento de diatomáceas pode ser feito com o dióxido de germânio, um análogo do dióxido de silício, que impedirá a formação das frústulas das diatomáceas (Harrison; Berges, 2005).

O isolamento com micropipeta é o método mais popular de isolamento de microalgas. Nesse método, a amostra é observada ao microscópio e as células das espécies de interesse são transferidas para o meio de cultivo, com auxílio de uma micropipeta. Uma transferência intermediária pode ser realizada, para a limpeza e isolamento do material. Esse é um método que submete as células a baixo estresse, mas é bastante laborioso, sendo impossível ser automatizado (Andersen; Kawachi, 2005). A diluição seriada consiste em diluir a amostra sequencialmente até que se esgote a amostra, ou seja, que não sejam mais observadas microalgas na diluição. Os isolados serão buscados na diluição imediatamente anterior. Tomando por base a densidade média de fitoplâncton na água do mar (aproximadamente 10<sup>4</sup> células/ml), seriam necessárias de 5 a 6 diluições de 10 vezes para esgotar a amostra. Esse é um procedimento rápido, de baixo estresse e bastante eficiente quando buscamos organismos abundantes na amostra. Por fim, pode-se usar a citometria de fluxo para o isolamento automático de microalgas com sinais de fluorescência diferentes. Microalgas com diferentes pigmentos acessórios emitem fluorescência em diferentes faixas do espectro luminoso, sendo selecionadas após a leitura no citômetro (Sieracki; Poulton; Crosbie, 2005). Comparado ao isolamento com micropipeta, o isolamento com citometria de fluxo é mais rápido e pode ser automatizado, porém submetem-se as células a um estresse maior, diminuindo assim a viabilidade das células. Em experimentos de exploração da biodiversidade, é comum o emprego de uma combinação das técnicas de isolamento, a fim de maximizar o número e a diversidade de cultivos obtidos.

Independentemente do método, as placas de cultivo são incubadas a temperaturas projetadas para manter as condições ambientais, devendo ser inspecionadas diariamente. Para microalgas é importante também ajustar as condições de iluminação, como a intensidade da luz e o fotoperíodo. As colônias crescidas podem ser colhidas e transferidas do meio de isolamento para um meio de crescimento (mesmo meio utilizado para o isolamento com água do mar e sem antibióticos). As colônias representativas podem ser transferidas para um tubo de ensaio com meio de cultura inclinado (bisel) apropriado para conservação e mantido a temperatura ambiente ou sob refrigeração.

### **2.1.3 PRESERVAÇÃO**

Existem vários métodos para a preservação de fungos marinhos. Esses métodos podem ser de curto, médio ou longo prazo. A escolha do método de preservação deve levar em consideração a manutenção das propriedades originais dos isolados, a manutenção da viabilidade celular, tamanho e importância do acervo da micoteca, a pureza das culturas e o custo.

O método de repique contínuo é um método de curto prazo e requer manutenção contínua dos isolados mantidos geralmente em meios mínimos, cobertos ou não por óleo mineral estéril e sob refrigeração, para que ocorra diminuição do metabolismo. Esse método é bastante utilizado para a preservação de leveduras. O método de preservação em água (ou Método de Castellani) é de médio prazo e consiste em colocar pedaços do meio de cultura sólido com o fungo submersos em um frasco com água destilada estéril. Esse método tem a vantagem de apresentar boa taxa de viabilidade. É amplamente utilizado principalmente para fungos filamentosos. Já o método de secagem em sílica ou em solo consiste em fazer uma suspensão de esporos fúngicos, adicionar à sílica ou ao solo, ambos estéreis, e manter em banho de gelo (no caso da sílica) ou sob refrigeração (solo).

A liofilização também é bastante utilizada para a preservação de fungos filamentosos e leveduras marinhas. Esse é um método de longo prazo e está baseado na remoção da água por sublimação. Alguns cuidados devem ser tomados: as culturas devem estar metabolicamente ativas, a concentração celular e a concentração/quantidade do criopreservante devem estar em consonância. No caso dos criopreservantes, utiliza-se leite desnatado 10%, leite desnatado 10% com inositol 5% e sacarose 7% com a peptona 7%. Outros dois métodos de preservação a longo prazo são o congelamento em ultrafreezer -80 e em nitrogênio líquido dos esporos de fungos filamentosos e das células de leveduras. O princípio desses métodos está baseado na indução do estado de dormência do micro-organismo. Também deve-se utilizar um agente crioprotetor. Os mais utilizados são glicerol 10% a 30% ou dimetilsulfóxido - DMSO 10%.

Análogo à técnica de repique contínuo, o estabelecimento e manutenção de bancos de cultivo de microalgas é uma forma de preservação de curto prazo, em que os isolados são mantidos vivos. Os cultivos são periodicamente transferidos para frascos com meio de cultura renovado, possibilitando o constante crescimento dos isolados. Usualmente, os isolados são mantidos em temperaturas subótimas, de modo a limitar o seu crescimento e facilitar a manutenção dos bancos de cultivo. Técnicas de preservação de longo prazo são necessárias, uma vez que a manutenção de extensos bancos de cultivo por longo período de tempo é laboriosa e cara.

A preservação de estágios de dormência ou cistos de resistência é uma alternativa para espécies como *Haematococcus pluvialis* ou cianobactérias, como *Nostoc commune*. Entretanto, a maior parte das microalgas não formam cistos de resistência, sendo a criopreservação uma alternativa para a preservação a longo prazo. Os crioprotetores mais usados para a preservação de microalgas são o DMSO (5%-20%), glicerol (5%-20%) e metanol (5%-20%), sendo o DMSO preferível devido a sua baixa toxicidade. De modo geral, obtém-se maior eficiência na recuperação dos isolados quando o congelamento é realizado gradativamente, em duas etapas (a -20°C e -80°C), minimizando a formação de cristais de gelo e o choque osmótico causado pela perda de água (Day, 2007). Para novos isolados, é importante testar diferentes crioprotetores e protocolos, pois espécies diferentes podem responder diferentemente aos protocolos de congelamento e recuperação. Apesar dos recentes esforços no desenvolvimento de novos protocolos, ainda não é viável a criopreservação de alguns grupos de microalgas, em especial células maiores e com estruturas mais complexas, como flagelos.

Independentemente do(s) método(s) escolhido(s), é importante fazer o controle de qua-

lidade da preservação através da contagem de células viáveis antes e após a preservação, e da verificação da pureza em representantes daquele grupo de micro-organismos preservados.

## 2.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRO-ORGANISMOS EUKARIOTES

O conhecimento sobre a real diversidade de micro-organismos marinhos é restrito, principalmente porque os principais estudos do ambiente marinho utilizam técnicas dependentes de cultivo. Essas abordagens são limitadas, pois amostram preferencialmente micro-organismos que são mais facilmente cultivados nas condições de laboratório e de identificação morfológica mais fácil. Essas abordagens trazem limitações específicas para o estudo de fungos em ambientes marinhos, devido à dificuldade de reproduzir as preferências ecológicas desses fungos, como a associação com animais hospedeiros ou com sedimentos em ambientes de profundidade. Dificuldades semelhantes na reprodução dos micro-habitats ocorrem no estudo de microalgas, limitando assim a diversidade de organismos capazes de serem cultivados. Além da dificuldade de reproduzir, esses habitats muitas vezes são difíceis de serem amostrados devido às limitações ao acesso.

Nesse sentido, abordagens moleculares para o estudo da diversidade e identificação de micro-organismos marinhos vêm contribuir para o preenchimento da lacuna deixada por métodos dependentes de cultivo. O uso de métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) para a amplificação de genes marcadores e que são filogeneticamente informativos, a partir de amostras de DNA ambientais, combinada ao sequenciamento e análises filogenéticas, tem demonstrado que a diversidade microbiana é muito maior do que se pensava. Abordagens moleculares também permitem que grupos pouco conhecidos ou raros no ambiente marinho sejam conhecidos e estudados.

Os genes ribossomais são os mais utilizados como regiões alvo para estudos de diversidade molecular. Em eucariotos, os genes ribossomais se organizam em *clusters* gênicos que se repetem no genoma do organismo. Nesses *clusters* estão os genes ribossomais 18S, 5.8S e 28S, que formarão as subunidades dos ribossomos SSU (18S) e LSU (28S e 5.8S). Esses genes são separados pelas regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 (*internal transcribed spacer*), que são transcritas, mas não compõem a estrutura dos ribossomos. Os ribossomos possuem uma função biológica essencial (síntese de proteínas), justificando a baixa taxa de evolução e alto grau de conservação dos genes ribossomais entre diferentes espécies. Por sua vez, a taxa de evolução das regiões espaçadoras é maior, havendo maior divergência entre espécies diferentes. Assim, os genes ribossomais são mais apropriados para estudar a diversidade em maiores níveis taxonômicos (filos, classes, ordens e famílias), mas apresentam pouca resolução para o estudo de gêneros, espécies e linhagens. Nesses casos as regiões ITS são mais apropriadas. Como o *cluster* ribossomal é codificado no genoma nuclear, é comum o uso de genes mitocondriais, como os genes de citocromo oxidase (COX1) e citocromo b (CYTB), de forma a corroborar a delimitação de espécies em eucariotos.

Para o estudo de fungos, a região ITS foi escolhida como *barcode* (fragmento curto de DNA, presente em todos os organismos do grupo e com variação suficiente para identificar espécies). Apesar de o gene 18S rDNA ser também utilizado para investigar a diversidade de

fungos, este não consegue discriminar espécies mais relacionadas e é geralmente menos amostrado do que a região ITS, o que dificulta a comparação a partir de bancos de dados de domínio público. Os problemas relacionados às duas regiões podem ser diminuídos se usarmos abordagens que utilizem a combinação das duas regiões (18S e ITS), mais as sequências de 28S. Essa análise multigênica leva a um suporte filogenético maior, principalmente para grupos com poucos dados moleculares ou que não apresentem dados de sequências de ITS em bancos de dados.

Para a diferenciação das espécies de leveduras, o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rDNA, além dos espaçadores internos transcritos 1 e 2 (região ITS), é o mais utilizado. Essa região contém cerca de 600 nucleotídeos, e isolados de uma mesma espécie de levedura apresentam geralmente diferenças em torno de 1%. No entanto, algumas exceções são encontradas; nesses casos, têm sido propostas análises multigênicas, utilizando além das sequências nucleotídicas da região ITS e região D1/D2 do gene 26S rDNA, o gene da subunidade menor do rRNA, das duas subunidades da RNA polimerase II (RPB1 e RPB2), do fator de alongamento  $\alpha$  (TEF1) e citocromo oxidase (CYTB) (Liu et al., 2015a, 2015b; Wang et al., 2015a, 2015b, 2015c).

Para o estudo de microalgas, os genes ribossomais também são os mais usados. O gene 18S rDNA é o mais utilizado para exploração da diversidade em larga escala, enquanto que as regiões ITS são usadas para táxons específicos (Moon-van der Staay et al., 2001). Entretanto, assim como ocorre com os fungos, muitas vezes é necessária uma abordagem multigênica para a delimitação de espécies de microalgas. Presentes em todos os organismos do grupo, os genes da proteína D1 do fotossistema II (*psbA*), da RuBisCo (*rbcL*) e 23S rDNA são codificados no genoma do cloroplasto, sendo assim potenciais *barcodes* para microalgas (Pichard et al., 1997; Zeidner et al., 2003). Esses genes permitem entender melhor a evolução do grupo e são especialmente úteis para identificação de microalgas em amostras ambientais, em meio a outros organismos eucariotes. Assim como os genes mitocondriais (como o COX1), genes dos cloroplastos fornecem evidências independentes do genoma nuclear para delimitação de espécies em microalgas.

### 2.3 AMOSTRAGEM MOLECULAR EM AMBIENTE MARINHO

O uso de técnicas moleculares para investigar a diversidade microbiana do ambiente marinho está crescente e cada vez mais difundido. Os dados moleculares contribuíram para o entendimento sobre a importância dos fungos no ambiente marinho, que além de apresentarem uma baixa abundância, a taxa de recuperação em meios de cultura é mais baixa ainda. Entretanto, apesar de os dados moleculares serem consistentes com os resultados obtidos a partir de técnicas dependentes de cultivo, diferentes perfis de diversidade são revelados por métodos moleculares, reforçando a necessidade de sua utilização. Mas o que contribui para que os dois métodos, apesar de abordarem diversidades diferentes, reflitam a baixa abundância dos fungos no ambiente marinho? Alguns autores relatam que ainda é preciso elucidar questões-chaves da ecologia e biologia desses micro-organismos, como: esta diferença encontrada tanto na diversidade quanto na abundância pode ser devida a um esforço amostral diferente

entre os dois ambientes? Será que existe algum limite biogeográfico que impediu essa diversificação dos fungos marinhos? A evolução dos fungos está intimamente ligada à dispersão e evolução das plantas terrestres, fazendo como que as plantas dominem a diversidade no reino Fungi? Ou ainda, outros micro-organismos desempenham funções semelhantes às dos fungos no ambiente marinho, tornando desnecessário evolutivamente o aumento da diversidade? (Richards et al., 2012; Jones et al., 2015).

Apesar de serem “semelhantes” os dados obtidos a partir dos dois métodos (dependentes e independentes de cultivo), ainda assim o uso de ferramentas moleculares para análises de DNA ambientais é aplicado e indicado, uma vez que essas ferramentas vêm a ajudar nos estudos de diversidade de fungos marinhos principalmente em ambientes “inacessíveis”, como em profundidade. No ambiente marinho em profundidade, a grande maioria dos fungos amostrados estão próximos ou nos mesmos clados de fungos terrestres, o que sugere que fungos associados à superfície ou ao ambiente terrestre são capazes de fazer, de forma relativamente fácil, a transição entre esses ambientes. Os fungos apresentam uma série de adaptações celulares, genômicas e fisiológicas que lhes permitem viver em ambientes anóxicos ou parcialmente anóxicos, participando, por exemplo, de processos como a desnitrificação anaeróbica (Shoun et al., 1992; Richards et al., 2012).

### 3

## APLICAÇÕES DA BIODIVERSIDADE NA BIOTECNOLOGIA MARINHA

Os micro-organismos estão presentes em todos os ambientes do planeta e são parte essencial de toda a vida na Terra, atuando como uma fábrica de compostos químicos que transforma os compostos do ambiente (carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre) em moléculas biologicamente mais acessíveis, as quais então são utilizadas pelos organismos superiores. Todas as formas de vida superior, incluindo plantas e animais, hospedam na ordem de milhões a trilhões de micro-organismos. Alguns destes produzem nutrientes e vitaminas ou auxiliam a digerir e converter os alimentos. Os ambientes marinhos compreendem cerca de 70% da superfície terrestre, com uma amplitude que varia desde os ambientes ártico e antártico até os de águas mornas dos trópicos. A evolução dos micro-organismos nos últimos 3,5 bilhões de anos produziu alta diversidade genética e variação fenotípica. Os micro-organismos prosperam nos oceanos, alcançando profundidades de 11 quilômetros (profundidade média de 3,2 quilômetros) com pressões excedendo 100 Mpa e temperaturas superiores a 100°C em fontes hidrotermais de regiões abissais. Além disso, micro-organismos unicelulares e multicelulares são responsáveis por 98% da produtividade primária dos ecossistemas marinhos, o que os faz imprescindíveis para a cadeia alimentar e, especificamente, para os ciclos energéticos e ciclo do carbono (Kodzius; Gojobori, 2015).

A grande diversidade microbiana e os papéis ecológicos vitais sugerem que os micro-organismos marinhos constituem um rico reservatório de biocatalisadores. Os biocatalisadores têm atraído muita atenção para várias aplicações na indústria, pois são considerados

ambientalmente corretos, econômicos e não geradores de poluentes, produzindo uma ampla variedade de substâncias químicas. A alta eficiência e seletividade de enzimas mediadoras de reações faz os biocatalisadores apropriados para o uso em muitos processos industriais, como a conversão relacionada à indústria de alimentos, detergentes e processamento de papel, por exemplo. Por esse motivo, não é surpreendente que a demanda industrial por novas enzimas para melhorar a eficiência ou para estabelecer novos processos tem aumentado muito nos últimos anos. O interesse particular de algumas indústrias tem se concentrado em novas enzimas capazes de mediar reações químicas que são de difícil processo ou que são muito dispendiosas para serem alcançadas por catalisadores químicos ou síntese orgânica tradicional. A abordagem mais comum para a obtenção de biocatalisadores microbianos desejados se baseia nos métodos microbiológicos tradicionais dependentes de cultivo. Essa abordagem clássica inclui o enriquecimento de micro-organismos de amostras ambientais, isolamento de culturas puras, triagem de isolados microbianos expressando uma determinada atividade enzimática desejada, caracterização da enzima de interesse isolada e otimização da produção e da purificação da enzima. Avanços recentes nas técnicas de sequenciamento de DNA contribuíram para um grande acúmulo nos bancos de dados públicos de novos genomas sequenciados derivados de bactérias e arqueias. A investigação e prospecção desses genomas fornece uma fonte vasta de oportunidades para a descoberta de genes que codificam novas enzimas de valor comercial com propriedades interessantes. A descoberta de novas enzimas a partir de metodologias dependentes de cultivo apresenta grande limitação; menos de 1% dos micro-organismos em muitos ambientes podem ser cultivados por métodos convencionais (Zilda; Uria, 2016).

As abordagens de sequenciamento de nova geração, como a metagenômica, permitem que genes e vias de micro-organismos cultiváveis e não cultiváveis possam ser descobertos. Nas triagens realizadas pela comparação de sequências de DNA com bancos de dados, a identificação de novas enzimas é baseada na homologia de sequências, que frequentemente revela apenas sequências parciais, isto é, limitada a sequências conhecidas de interesse que não permitem a descoberta de informação sobre as funções bioquímicas de enzimas codificadas. Ensaio baseado em atividade podem ser realizados para identificar genes que codificam novas biomoléculas ou novas atividades biológicas.

### **3.1 PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS A PARTIR DE LEVEDURAS E MICROALGAS MARI-NHAS**

A evolução da agricultura começou há cerca de 10.000 a.C., quando os humanos realizaram a transição de caçadores e coletores para plantadores, e ao longo dos tempos o beneficiamento da produção agrícola foi artificialmente selecionado. Embora inicialmente não houvesse a compreensão da presença do DNA genômico nas células, os avanços da biologia molecular no último século permitiram uma maior manipulação dos organismos cultivados pelo homem. Como consequência, o material genético pode ser alterado ou por eventos aleatórios de mutação, como irradiação por raio-X, ou por tecnologias de edição de genoma sítio dirigidas, obtendo assim melhoramento de uma determinada linhagem em curto período de tempo. Dessa forma, o desenvolvimento de linhagens microbianas foi, de muitas formas, melhorado ao

longo do tempo, de mutações aleatórias a metodologias avançadas, tais como engenharia metabólica com alteração de genes e vias.

### 3.1.1 PRODUÇÃO DE ALIMENTOS PARA A POPULAÇÃO HUMANA

A produção de alimentos para populações humanas é a aplicação econômica mais antiga para as microalgas. As cianobactérias *Nostoc* sp. e *Arthrospira* sp. (*Spirulina*) são exploradas independentemente por populações nativas de diversas partes do mundo, havendo registros em populações na América do Norte, Ásia e África (Hamed, 2016). A partir de meados do século XX, o crescimento populacional após a Segunda Guerra Mundial e as perspectivas de escassez de alimentos estimularam o desenvolvimento de cultivos em larga escala de microalgas para alimentação humana, em especial como fonte de proteínas. O conteúdo proteico nas células de *Arthrospira maxima*, *Synechococcus* sp., *D. salina* e *Chlorella vulgaris* pode passar de 50%, superando o conteúdo proteico de fontes tradicionais de proteínas como carne e leite (Hamed, 2016). O uso de microalgas como fontes alternativas de proteínas é reforçado pela capacidade desses micro-organismos de sintetizar todos os aminoácidos essenciais para a nutrição humana. Produtos de biomassa seca de *Arthrospira* sp. e *Chlorella* sp. como tabletes são comercializados como suplemento alimentar.

O uso de microalgas na alimentação humana revelou uma série de benefícios para a saúde, que vão além do valor nutricional em proteínas e polissacarídeos. Por serem organismos fotossintetizantes, microalgas estão constantemente sujeitas ao estresse oxidativo e aos efeitos da formação de radicais livres, como, por exemplo, espécies reativas de oxigênio. Assim, esses organismos são ricos em compostos capazes de neutralizar radicais livres, conferindo um valor nutracêutico aos produtos derivados de microalgas. Entre os compostos com ação antioxidante comprovada, destacam-se os pigmentos naturais, em especial os carotenoides, abundantes nas microalgas. Existe também um grande potencial para o uso de microalgas como ração animal, solução para a escassez de alimentos frente ao aumento populacional.

### 3.1.2 PIGMENTOS NATURAIS

Pigmentos naturais são compostos biológicos capazes de absorver a energia luminosa, podendo ou não estar diretamente associados à fotossíntese. Clorofilas e ficobiliproteínas (ficoeritrinas e ficocianinas) são produzidas apenas por organismos fotossintetizantes, diretamente associados à fotossíntese. O estabelecimento de cultivos em massa torna a cianobactéria *Arthrospira platensis* e a clorófito *Chlorella* sp. importantes fontes de clorofila, cuja produção industrial ainda depende de plantas terrestres. A cianobactéria *A. platensis* e a rodófito *Porphyridium aeruginosum* são também importantes fontes de ficoeritrinas. Além da aplicação como corantes de alimentos e cosméticos, ficoeritrinas possuem alto valor comercial como reagentes para ensaios imunológicos.

Os pigmentos carotenoides possuem distribuição mais ampla na natureza, sendo produzidos também por algumas bactérias e fungos, além dos organismos fotossintetizantes. Apesar de ocorrerem em animais, estes adquirem os carotenoides da dieta. O  $\beta$ -caroteno

é o carotenoide mais comumente encontrado em plantas e possui importante função na nutrição humana, como fonte de pró-vitamina A. Apesar de presente em diversos alimentos, como a cenoura, a microalga *Dunaliella salina* é a principal fonte para produção industrial de  $\beta$ -caroteno. *D. salina* é uma clorófitas halotolerante, capaz de sobreviver desde em ambientes de baixa salinidade (em torno de 1 ppm) até em lagunas hipersalinas (até 25 ppm, concentração oito vezes maior que a água do mar). A capacidade de *D. salina* sobreviver a uma ampla faixa de salinidade está associada a sua eficiente produção de glicerol e a respectiva função osmorreguladora (Raja et al., 2007). Entretanto, apesar do seu potencial biotecnológico, a produção de glicerol a partir de cultivos de *D. salina* ainda não se mostrou economicamente eficiente.

Acredita-se que o  $\beta$ -caroteno possua uma função fotoprotetora em *D. salina*, uma vez que sua produção é maximizada em condições de alta luminosidade. A limitação de nitrogênio é outro fator a induzir a produção de  $\beta$ -caroteno em *D. salina*, pois inviabiliza a reprodução das microalgas, induzindo o metabolismo secundário. O conteúdo de  $\beta$ -caroteno em *D. salina* pode chegar a 14% do seu peso seco, em condições ótimas de alta irradiância, salinidade e limitação de nitrogênio (Raja; Hemaiswarya; Rengasamy, 2007). A resistência a altas salinidades possibilita o cultivo extensivo de *D. salina* ao ar livre, em que lagunas são salinizadas artificialmente, evitando assim a proliferação de micro-organismos consumidores da alga. Apesar de induzir um crescimento mais lento da microalga e menor taxa de produção de  $\beta$ -caroteno, os baixos custos de operação tornam esse sistema atrativo em regiões quentes e com pouca nebulosidade, como o Oeste australiano, Oriente Médio e Sudoeste asiático (Borowitzka, 2005). Cultivos intensivos têm maior custo de operação e também maior produção de  $\beta$ -caroteno. Nesses sistemas, a microalga é cultivada em reservatórios menores, com maior controle sobre as condições ambientais, e a produção de  $\beta$ -caroteno geralmente é maximizada pela limitação de nitrogênio.

A astaxantina é o principal carotenoide utilizado na indústria de aquicultura em todo o mundo, sendo o composto responsável pela coloração laranja-avermelhada de alguns organismos, como salmões e crustáceos (Lorenz; Cysewski, 2000). Atribui-se a ela um amplo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo atividade antioxidante e antimicrobiana, podendo auxiliar na resposta imune a infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasíticas, além do controle de risco de certos cânceres e doenças cardiovasculares. A produção em larga escala da astaxantina teve início em 1990, entretanto uma demanda cada vez maior por alimentos naturais e o alto custo da síntese do pigmento estimularam a pesquisa com fontes naturais alternativas de astaxantina (Zaky et al., 2014).

Espécies de microalgas clorófitas do gênero *Haematococcus* são eficientes fontes de astaxantina, em que o conteúdo por peso seco pode ficar entre 1,5 e 3% (Lorenz; Cysewski, 2000). A produção de astaxantina em *H. pluvialis* é induzida por condições de estresse ambiental (aumento de luminosidade ou temperatura) e limitações de nutrientes (fósforo). Nessas condições, as células perdem os flagelos e a capacidade de locomoção, formando cistos de resistência com paredes celulares mais espessas (Boussiba; Vonshak, 1991). A deposição de cistos de resistência de *Haematococcus* sp. leva à formação dos tapetes microbianos avermelhados observados em rochas costeiras. Devido a riscos de contaminação por outros micro-organismos, o cultivo em larga escala de *H. pluvialis* é geralmente feito em ambientes fechados,

como fotobiorreatores. A produção de astaxantina é feita em duas etapas: primeiro, a fase de crescimento do cultivo até que atinja a biomassa suficiente; posteriormente, o cultivo é submetido a uma combinação de estresse ambiental e limitação de nitrogênio, induzindo a produção de astaxantina.

### **3.1.3 VITAMINAS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

A riboflavina (vitamina B2) é necessária para vários grupos de organismos, incluindo animais, bactérias, plantas e seres humanos. Atua como um precursor para as coenzimas flavina adenina dinucleotídeo e flavina mononucleotídeo e é sintetizada apenas por plantas e micro-organismos. Apesar de os processos de síntese química dominarem o mercado, a biossíntese da riboflavina oferece diversas vantagens: menor demanda energética e geração de resíduos químicos, além da facilidade de recuperação do produto final. Leveduras terrestres das espécies *Meyerozyma guilliermondii* e *Candida famata* foram testadas quanto à produção de riboflavina. Observou-se que a superprodução apenas foi alcançada em meios deficientes de ferro, uma vez que o ferro reprime a biossíntese da riboflavina (Boretsky et al., 2005; Zaky et al., 2014).

### **3.1.4 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS - BIOETANOL**

A produção de bioetanol aumentou gradualmente em todo o mundo na última década para cerca de 85 bilhões de litros em 2011. Devido ao aumento da demanda por energia em um mundo em crescente expansão populacional e fornecimento limitado de combustíveis fósseis, espera-se que a contribuição do bioetanol aumente ainda mais na próxima década. Atualmente, é realizada utilizando meio contendo água doce e linhagens terrestres de leveduras. A água do mar representa uma alternativa de recurso hídrico promissora para a produção de bioetanol em cidades litorâneas e também em zonas áridas. Além disso, por conter amplo espectro de minerais, a utilização de água do mar pode evitar a adição de nutrientes essenciais necessários para os meios de fermentação comerciais, melhorando a economia geral do processo (Zaky et al., 2014).

Vários materiais biológicos foram investigados para a geração de bioetanol, tais como a palha do trigo, o bagaço da cana e a palha do milho. Recentemente, fontes de biomassa marinha, em especial microalgas, têm atraído atenção como matéria-prima promissora na produção de bioetanol, uma vez que elas não competem com plantações em termos de recursos de terra e água doce. A hidrólise de biomassa marinha pode resultar em um hidrolisado com altas concentrações de sal, que demandaria dessalinização antes do processo fermentativo quando são utilizadas leveduras terrestres. Contudo, leveduras halofílicas, especialmente as isoladas do ambiente marinho, estariam aptas a fermentar diretamente o hidrolisado com altas concentrações de sal a bioetanol. Dessa forma, o passo de intenso consumo energético, a dessalinização, poderia ser evitado, tornando o processo fermentativo como um todo economicamente competitivo.

### **3.1.5 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS - BIODIESEL**

Além de servir como biomassa para a produção de bioetanol, microalgas marinhas são também potenciais fontes para a produção de biodiesel. Como o uso de linhagens ricas em óleos tende a aumentar a eficiência na produção de biodiesel, a prospecção da biodiversidade de microalgas é fundamental para tornar viável a produção em larga escala de biocombustíveis. O percentual de óleos no conteúdo celular varia bastante entre diferentes linhagens celulares, podendo chegar a 70% do peso seco na clorófito dulcícola *B. braunii* e em linhagens das stramenópilas marinhas *Nannochloropsis* sp. e *Schizochytrium* sp. (Chisti, 2007). Observa-se que o conteúdo celular de lipídeos pode dobrar em condições de limitação de nitrogênio em uma linhagem de *Nannochloropsis* sp. (Ajjawi et al., 2017). Como o nitrogênio é essencial para a reprodução de microalgas, nesse caso também se propõe a exploração do cultivo em duas etapas, a fim de garantir um rápido crescimento celular e alta produção de lipídeos de reserva como os triglicerídeos, que servirão de substrato para a produção de biodiesel. A engenharia genética também pode ser usada para aumentar a eficiência da produção: observou-se recentemente que uma linhagem mutante de *Nannochloropsis gaditana*, na qual o nível de expressão do fator de transcrição *ZnCys* foi reduzido, produziu duas vezes mais lipídeos que a linhagem selvagem, sem ter a taxa de crescimento afetada (Ajjawi et al., 2017).

Triglicerídeos são as principais fontes de biodiesel de microalgas. Um eficiente processo de produção de biodiesel é a transesterificação, em que uma molécula de triglicerídeo reage sucessivamente com três moléculas de metanol, liberando glicerol e três moléculas de biodiesel (éster metílico de ácido graxo). A composição de ácidos graxos nos triglicerídeos é também importante para a geração de um biodiesel de qualidade: ácidos graxos poli-insaturados são vulneráveis a oxidação, mas apresentam melhores propriedades em baixas temperaturas (Chisti, 2007). Assim, tende-se a buscar uma maior concentração de ácidos graxos monoinsaturados. Em geral, temperaturas altas induzem a formação de ácidos graxos insaturados e, em *Nannochloropsis* sp., observou-se o mesmo efeito com maior intensidade luminosa.

Estima-se que a demanda por área para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas marinhas seja até 100 vezes menor que a demanda das lavouras tradicionais, como cana-de-açúcar e soja. Entretanto, limitações técnicas tornam o preço do óleo derivado de microalgas ainda cinco vezes maior que o custo do biodiesel de palmito ou do diesel de petrolíferas (Chisti, 2007). Além da prospecção da biodiversidade e da engenharia genética, a viabilidade econômica também pode ser obtida por meio do estabelecimento de biorrefinarias microalgas, aproveitando os potenciais produtos da biomassa de microalgas, como proteínas para ração animal e substrato para geração de metano ou bioetanol (Zaky et al., 2014).

### 3.1.6 ENZIMAS DE APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Assim como as leveduras terrestres, as leveduras marinhas também já foram investigadas para a produção de enzimas tais como amilase, inulinase, lipase e superóxido dismutase. Como elas vivem em ambientes com alta salinidade, espera-se que as suas enzimas possuam propriedades distintas como, por exemplo, alta tolerância a salinidade.

A inulina é um polímero linear formado por monômeros de frutose com ligações  $\beta$ -1,2 e pode ser utilizada como aditivo em alimentos, como matéria-prima para biocombustível e em

outras aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Este polímero pode ser hidrolisado quimicamente. Entretanto, o processo químico está associado à formação de subprodutos indesejados, como o anidrido di-frutose, enquanto a hidrólise enzimática da inulina pela enzima inulinase produz frutose com grau de pureza de 95% (Zaky et al., 2014).

Além dos exemplos citados, as leveduras marinhas apresentam também grande potencial em vários outros campos – biorremediação, probióticos, entre outros (ver Tabela 1).

**Tabela 1.** Produtos biotecnológicos produzidos por leveduras e microalgas marinhas e suas aplicações (modificado de Zaky et al., 2014 e Hamed, 2016).

PROCESSO/PRODUTO		MICRO-ORGANISMOS
<b>Leveduras Marinhas</b>		
Combustíveis	Bioetanol	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum</i> sp., <i>Pichia capsulata</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia salicaria</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> , <i>Vishniacozyma dimennae</i> e <i>Yarrowia lipolytica</i>
	Óleo microbiano	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> e <i>Yarrowia lipolytica</i>
Farmacêuticos	Alginato liase	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	Exo- $\beta$ -1,3 glucanase	<i>Williopsis saturnus</i> WC91-2
	Riboflavina	<i>Candida membranifaciens</i> subsp. <i>flavinogenie</i> , <i>Candida tropicalis</i>
	Nanopartículas de prata	<i>Yarrowia lipolytica</i> NCYC 789
	Cu-Zn superóxido dismutase	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Enzimas industriais	Lipase	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Leucosporidium scottii</i> , <i>Naganishia adeliensis</i>
	Celulase	<i>Aureobasidium pullulans</i> e <i>Pichia salicaria</i>
	Inulinase	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	Protease ácida	<i>Metschnikowia reukaufii</i> W6b
	$\alpha$ glicosidase	<i>Leucosporidium antarcticum</i>
	Protease	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
	Endoxilase	<i>Candida davisiana</i> , <i>N. adeliensis</i> , <i>Guehomyces pullulans</i>
	Fitase	<i>Kodamea ohmeri</i>
Outros produtos	Nanopartículas	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	Degradantes de poluentes	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	Caroteno	<i>Rhodotorula</i> sp., <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Blastobotrys adeninivorans</i>
<b>Microalgas</b>		
Alimentação humana	<i>Chlorella</i> sp., <i>Spirulina</i> sp., <i>Nostoc</i> sp., <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	
Alimentação animal	<i>Chlorella</i> sp., <i>Tetraselmis</i> sp., <i>Isochrysis</i> sp., <i>Pavlova</i> sp., <i>Phaeodactylum</i> sp., <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Spirulina</i> sp., <i>Dunaliella</i> sp., <i>Skeletonema</i> sp., <i>Thalassiosira</i> sp.	
Fertilizante agrícola	<i>Anabaena</i> sp., <i>Nostoc</i> sp.	

PROCESSO/PRODUTO		MICRO-ORGANISMOS
<b>Microalgas</b>		
<b>Biodiesel</b>		<i>Nannochloropsis</i> sp., <i>Botryococcus braunii</i>
<b>Pigmentos</b>	Clorofila	<i>Arthrospira maxima</i> , <i>Chlorella</i> sp.
	Ficoeritrina	<i>Porphyridium aeruginum</i> , <i>Arthrospira maxima</i>
	Beta-caroteno	<i>Dunaliella salina</i>
	Astaxantina	<i>Haematococcus</i> sp.
<b>Cosméticos</b>		<i>Spirulina</i> sp., <i>Chlorella</i> sp.
<b>Farmacêuticos</b>		<i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Tolypotrix byssoidea</i> , <i>Chlamydomonas</i> sp.

### 3.2 A ENGENHARIA GENÉTICA COMO FERRAMENTA NA PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS ORIUNDAS DO AMBIENTE MARINHO

A engenharia genética sempre teve um papel determinante na geração de produtos biotecnológicos e farmacêuticos em escala industrial, e com o passar do tempo e o avanço tecnológico na área da biologia molecular, a manipulação genética de micro-organismos e organismos tem sido bastante facilitada. Várias linhagens de bactérias, leveduras e algas são utilizadas na produção industrial e muitos são os critérios de escolha desses micro-organismos para atingir uma produção eficiente. Aspectos genéticos e químicos da natureza dos modelos biológicos, como a facilidade de modulação de vias metabólicas, facilidade de manutenção e cultivo e pureza e quantidade do produto final obtido, são aspectos importantes a serem ponderados. Alguns desses micro-organismos mais frequentemente utilizados na produção de biomoléculas recombinantes são: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Arthrospira*, *C. vulgaris*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre muitos outros (Kodzius; Gojbori, 2015). O escalonamento dos volumes produzidos é um aspecto de essencial importância na escolha e uso dos micro-organismos para uso em escala industrial.

#### 3.2.1 ELEMENTOS ENVOLVIDOS EM EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS

A expressão heteróloga permite a caracterização de vias biossintéticas em hospedeiros geneticamente manipuláveis e a modificação dessas vias para a geração de produtos naturais derivados. O aumento da produção a partir de produtores selvagens pode ser alcançado pela otimização das condições de produção. Tradicionalmente, métodos clássicos para aumento da produção a partir de linhagens produtoras selvagens são empregados para melhoria da produção, entretanto esses métodos são laboriosos e consomem muito tempo, envolvendo múltiplos rounds de mutagênese química ou de irradiação seguidos da triagem dos mutantes para o fenótipo desejado.

Apesar do crescente número de produtos naturais aos quais o acesso vem sendo facilitado pela produção heteróloga, é evidente que não existe uma abordagem única que será bem-sucedida sempre. Existem elementos-chave que devem ser considerados, tais como a

mobilização da via biossintética ou gene em um vetor estável que seja apropriado, a seleção do hospedeiro heterólogo apropriado, a exigência e a adequação da manipulação das vias em questão e métodos que permitam a estabilidade dos hospedeiros heterólogos e otimização dos procedimentos de construção dos mesmos. Contudo, mesmo levando em consideração todos esses fatores, não há garantia da expressão funcional de enzimas heterólogas complexas ou do sucesso da síntese de um produto final de uma determinada via. Como uma consequência disso, é difícil prever o grau de sucesso da expressão heteróloga de um produto. Enquanto algumas enzimas podem expressar bem com poucos passos de otimização, outras podem exigir extensivas otimizações para atingir um nível adequado de expressão (Lee et al., 2012).

Para a expressão heteróloga de um *cluster* gênico ou de um único gene, por exemplo, os genes precisam ser isolados, para que então possam ser mobilizados em um hospedeiro heterólogo adequado. Em abordagens tradicionais, grandes bibliotecas genômicas eram construídas utilizando cosmídeos/fosmídeos com capacidade de inserção de regiões de 30-35 kb por clone ou em cromossomos artificiais de bactérias (Bacterial Artificial Chromosome ou BACs) que podem conter regiões de até 100 kb. Recentemente, com a expansão do número de genomas sequenciados, existe a possibilidade da clonagem direta a partir do organismo estudado. Devem ser feitas considerações para assegurar que o vetor de clonagem selecionado para receber o cluster é adequado para as aplicações seguintes e compatível com o hospedeiro heterólogo escolhido. Uma vez que o gene tenha sido clonado, é necessário mobilizá-lo no hospedeiro, e a manutenção do gene ou genes nesse hospedeiro determina a "dose gênica", ou o número de cópias de um determinado gene ou genes presente no hospedeiro. Isso, por sua vez, afeta o nível de expressão da enzima ou proteína produzida, podendo influenciar o rendimento do produto (Wang; Pfeifer, 2008).

A escolha do hospedeiro heterólogo deve considerar a natureza do produto gênico que será expresso, considerando também o substrato adequado, assim como as características genéticas e fisiológicas tanto do produtor selvagem ou nativo como do produtor heterólogo. Espera-se que o uso de hospedeiros heterólogos estreitamente relacionados à espécie produtora nativa resultará em uma expressão mais eficiente do que o uso de um produtor hospedeiro filogeneticamente distante. Geralmente, quanto maior a proximidade entre produtor selvagem e heterólogo, maior a probabilidade de adequação do sistema quanto à funcionalidade dos elementos transcricionais nativos, tais como elementos regulatórios, promotores e sítios de ligação ao ribossomo (Wenzel; Müller, 2005; Eppelmann; Doekel; Marahiel, 2001). Quando a transcrição de um *cluster* gênico não pode ser alcançada com sucesso, por exemplo, em espécies estreitamente relacionadas, isso pode ocorrer devido à ausência de ativadores transcricionais (Von Mulert et al., 2004).

Uma espécie estreitamente relacionada também exibirá uma utilização preferencial de códons similar (*códon usage*), possibilitando maior eficiência de tradução em comparação com espécies geneticamente distantes. Nos hospedeiros nativos, códons raros podem estar presentes em posições estratégicas do mRNA para permitir o enovelamento da proteína parcialmente traduzida sem a interferência de outras sequências peptídicas. A discrepância na abundância relativa de tRNAs no hospedeiro heterólogo, em comparação com aquela do hospedeiro nativo, influencia fortemente a eficiência de tradução, com a possibilidade de mais códons raros pre-

sententes em posições críticas. Além de afetar a eficiência de tradução, essa característica mostrou influenciar diretamente também a estabilidade do mRNA, particularmente em transcritos longos (>10 kb) (Nilsson et al., 1987). A co-expressão de tRNAs não usuais presentes em genes do hospedeiro nativo, mas não no hospedeiro heterólogo, pode aumentar significativamente a eficiência da tradução. Outro fator importante relacionado à tradução é o enovelamento; a proteína precisa assumir uma conformação terciária apropriada para permitir a sua função enzimática correta. A co-expressão de chaperonas (proteínas que promovem o enovelamento de outras proteínas) pode auxiliar no enovelamento durante a expressão, aumentando o rendimento do produto.

A expressão de vias de biossíntese apresenta ainda maior complexidade do que a expressão de genes isoladamente. Após a expressão heteróloga bem-sucedida de um grupo de enzimas, a produção com um rendimento considerável dependerá de fatores como a disponibilidade dos precursores e a estabilidade das enzimas expressas, as quais podem ser susceptíveis à atividade proteolítica. Contudo, o produto da via de biossíntese é a soma de suas partes e pode ser que um ou mais dos precursores para a geração do produtor da via possa ser produzido em quantidades insuficientes, criando gargalos na via, e conseqüentemente, baixa produção.

Alternativamente, os precursores podem ser produzidos em quantidades suficientes, mas serem canalizados para vias endógenas do hospedeiro heterólogo. Esse problema pode ser contornado pela suplementação com um determinado precursor necessário no meio de cultura, a introdução no hospedeiro de genes codificando o precursor (ou as vias biossintéticas que o produzem) ou ainda pela deleção (remoção) dos genes para o catabolismo do precursor.

### 3.2.2 PRODUÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS POR EXPRESSÃO HETERÓLOGA

A execução de um número cada vez maior de projetos genoma de micro-organismos e de projetos de metagenômica suporta a noção de que a grande maioria dos produtos naturais e de suas vias biossintéticas são subexplorados. Contudo, a expressão de genes em níveis baixos ou a ausência de sua expressão em condições laboratoriais resulta em baixa ou nenhuma produção do produto natural, o que impede que eles, os genes, sejam descobertos durante triagens convencionais (Zotchev; Sekurova; Katz, 2012). Além disso, muitos produtores nativos não podem ser cultivados em condições laboratoriais normais.

As abordagens genômicas empregadas atualmente para a investigação de genes crípticos conta com a indução da expressão em hospedeiros nativos através da otimização das condições de cultivo ou pela modificação de genes regulatórios. Entretanto, muitas vezes é difícil prever quais as condições necessárias para a indução, ou ainda, a modificação de genes e vias só pode ser alcançada em hospedeiros de fácil manipulação genética.

Existe grande discrepância entre a diversidade de micro-organismos existentes no ambiente, que são determinados ou por inspeção visual ou por análises metagenômicas, e a diversidade de micro-organismos que são determinados por cultivo em condições padrão de laboratório. Com o aumento da prevalência de micro-organismos resistentes a drogas e com a escassez, cada vez mais frequente, de novos compostos bioativos, novos métodos como a

expressão heteróloga de proteínas são necessários para aproveitar o potencial dos produtos naturais de toda a diversidade microbiana. O uso de dados obtidos por sequenciamentos de metagenomas e o emprego da biologia molecular computacional para a identificação de genes e *clusters* gênicos que codificam produtos naturais putativos se mostraram muito efetivos para a caracterização de vias de biossíntese de alguns compostos de interesse (Piel, 2002).

Quando um composto é de interesse farmacêutico, nutricional ou agroquímico, um aumento na sua titulação reduz os custos da sua produção e, dessa forma, é altamente desejado da perspectiva biotecnológica. A expressão heteróloga também permite a caracterização de genes e *cluster* de genes envolvidos na biossíntese de produtos derivados de micro-organismos não cultiváveis ou com desenvolvimento fastidioso, permitindo também o acesso a potenciais novos compostos codificados por genes crípticos. Com a urgência na procura por novos antibióticos para o combate de resistências emergentes, assim como o combate de infecções recorrentes e de novas doenças infecciosas, a procura por novos produtos naturais exibindo atividade biológica ganha cada vez mais importância. A manipulação de vias conhecidas como abordagem alternativa para a geração de novos compostos continua sendo uma opção viável.

### 3.2.3 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA A CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGAS DE VIAS EM *Saccharomyces cerevisiae*

Policetídeos e outros metabólitos secundários de origem marinha, por exemplo, são sintetizados por uma série de enzimas codificadas por genes que são tipicamente agrupados (*cluster*) nos genomas dos organismos e micro-organismos que os produzem. O agrupamento ou a clusterização de genes relacionados tem se mostrado um padrão de ocorrência na descoberta de vias de produtos naturais em fungos, principalmente. Devido a esse padrão, a clonagem e a expressão de enzimas policetídeos sintases (PKS) podem ser realizadas apenas com fragmentos genômicos contínuos contendo o *cluster* inteiro. Entretanto, a clonagem e montagem da via em vetores adequados ainda é um desafio, devido ao grande tamanho de muitos dos genes pertencentes a esses agrupamentos; mesmo um único gene codificando uma PKS é normalmente muito grande para ser amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) de forma eficiente e sem erros.

Uma estratégia para a captura de agrupamentos gênicos inteiros é a construção de bibliotecas genômicas com um vetor apropriado seguido de triagem dos clones que possam carregar um agrupamento funcional. Por exemplo, na primeira expressão heteróloga da penicilina, um cosmídeo contendo o *cluster* gênico da biossíntese da penicilina de *Penicillium chrysogenum* foi selecionado a partir de uma biblioteca de cosmídeos utilizando uma sonda heteróloga de DNA para o gene isopenicilina N sintase (sonda de DNA utilizando um gene ortólogo ao gene de interesse em *P. chrysogenum*) de *Flavobacterium* sp. Esse cosmídeo foi então transformado em *Neurospora crassa* e em *A. niger* (fungos modelos para estudos de biologia molecular), que levou à produção da penicilina V em ambos os hospedeiros transformados (Smith et al., 1990).

As leveduras têm sido extensamente desenvolvidas como ferramenta para a clonagem e a captura de agrupamentos gênicos inteiros. Uma vantagem significativa das leveduras é a maior eficiência de recombinação homóloga do material genético exógeno, principalmente

*S. cerevisiae*. Essa característica tem sido explorada para a construção de vetores contendo extensos grupamentos gênicos. Fragmentos de DNA e vetores linearizados possuindo regiões de sobreposição (regiões complementares) podem ser unidos ou fusionados por recombinação homóloga, originando, assim, vetores para a expressão de proteínas. Esse método pode ser chamado de transformação associada à recombinação, apresentando-se excepcionalmente simples e eficiente, especialmente quando empregado na clonagem rápida de grandes grupamentos gênicos sem a necessidade do uso de enzimas de restrição e sem limitação quanto ao tamanho dos produtos de DNA gerados por PCR para a clonagem.

A levedura *S. cerevisiae*, como um hospedeiro para a expressão de proteínas de origem eucariótica, possui muitas vantagens, comparada com hospedeiros procarióticos ou hospedeiros eucarióticos mais complexos. Diferentemente de hospedeiros procarióticos, como de *E. coli*, *S. cerevisiae* possui o maquinário para vias de secreção e modificações pós-traducionais e ainda, em comparação com células de mamíferos ou células vegetais, *S. cerevisiae* é de desenvolvimento rápido e de fácil manipulação genética. Contudo, algumas modificações genéticas devem ser feitas na levedura para assegurar a expressão funcional de determinadas proteínas. Para a expressão funcional de PKS, por exemplo, é realizada a deleção de dois genes codificando proteases vacuolares (PEP4 e PRB1), os quais codificam uma aspartil protease e uma proteinase B, respectivamente. A deleção dessas proteases leva a um aumento significativo nos níveis de expressão das PKSs recombinantes (Jones, 1991).

Leveduras das espécies *S. cerevisiae* e *Pichia pastoris* foram utilizadas como hospedeiros para a produção comercial de proteínas farmacêuticas, tais como a insulina, a vacina contra a hepatite B e caseinomacropéptidos. De forma semelhante, mas ainda incipiente, leveduras marinhas dos gêneros *Yarrowia* e *Candida* foram descritas como potenciais sintetizadoras de diferentes produtos farmacêuticos, como mostrado na Tabela 1.

### 3.3 BIOMOLÉCULAS PRODUZIDAS POR MICRO-ORGANISMOS EUKARIOTES MARINHOS

A descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, derivada inicialmente do fungo *Penicillium notatum*, por Alexander Fleming, deu início a uma nova era no uso de drogas, alterando para sempre a qualidade de vida do ser humano. Desde o desenvolvimento da penicilina na década de 40, que iniciou a era de ouro do uso de antibióticos naturais de espécies do gênero *Streptomyces*, a humanidade tem se beneficiado com o uso de antibióticos de diversas classes químicas principalmente contra bactérias patogênicas. Mais de 350 agentes alcançaram o mercado mundial como antimicrobianos, incluindo produtos naturais, antibióticos semissintéticos e químicos sintéticos. O amplo uso dos antibióticos, entretanto, resultou no desenvolvimento de micróbios resistentes, devido à pressão seletiva por eles imposta. O número de medidas terapêuticas efetivas contra bactérias e fungos patogênicos diminuiu drasticamente, devido ao aparecimento de patógenos resistentes a múltiplas drogas (MDR – *Multiple drug resistance pathogens*). Atualmente, as doenças infecciosas são listadas como a segunda maior causa de morte no mundo e consideradas um dos maiores desafios globais do século. De modo alarmante, muitas companhias farmacêuticas reduziram significativamente ou terminaram por com-

pleto seus programas de P&D (pesquisa e desenvolvimento) em antibióticos. Os fluxogramas de descoberta de novas drogas são muito escassos, com apenas poucos candidatos em registro ou desenvolvimento. Só recentemente, o aumento dramático da incidência de infecções MDR levou a um reavivamento dos programas de pesquisa com antibióticos. Novas medidas e estratégias são necessárias com urgência em todo o mundo para atacar a resistência às drogas e promover a pesquisa de drogas antibióticas, incluindo aquelas oriundas de fontes naturais (Forsyth, 2013).

Fontes de origem microbiana já demonstraram ser abundantes produtores de milhares de antibióticos naturais. Mais de metade de todos os antibióticos são produzidos por Actinomycetes, 10 a 15% por bactérias não filamentosas e cerca de 20% por fungos filamentosos. Entretanto, isso possivelmente representa apenas uma pequena porção do repertório de compostos microbianos bioativos, uma vez que o esforço para a descoberta de drogas frequentemente envolve um foco específico ou em um grupo taxonômico ou em um hábitat específico. Nesse sentido, os ecossistemas marinhos permanecem quase inexplorados, embora micro-organismos marinhos possam acumular produtos naturais bioativos estruturalmente únicos, que não são encontrados nos seus correspondentes terrestres. Algumas pesquisas detalhadas demonstraram que porções grandes de esqueletos químicos de origem marinha são descobertas novas. Auranomidas A e B, quinazolina-4-1 substituída por uma molécula de pirrolidina-2-imino derivado do fungo marinho *Penicillium aurantiogriseum*, ou aspergilol A e B com uma fusão covalente de uma unidade de antraquinona e uma de orcinol de *Aspergillus versicolor* isolado de profundezas abissais, representam novos esqueletos químicos que são exclusivamente produzidos por organismos marinhos. A diversidade microbiana dos ambientes marinhos é enorme, mas ainda não foi explorada e caracterizada, nem taxonomicamente, nem quimicamente (Himaya; Kim, 2013).

Desde a década de 80, o número de compostos antibióticos isolados de fungos marinhos tem aumentado rapidamente. Muitas das amostras são provenientes de algas marinhas, esponjas, e de mangues que mostraram abrigar fungos com alta capacidade para a produção de produtos naturais. As razões ecológicas para essa alta capacidade de produção permanecem hipotéticas para a maioria dos casos, e embora os fungos marinhos atraíam uma parcela considerável de esforço de pesquisa, muitos dos estudos são limitados à descrição de novas estruturas químicas, com determinação de atividades biológicas *in vitro*. A descoberta de novos compostos é apenas o primeiro passo da longa, dispendiosa e arriscada linha de desenvolvimento na descoberta de drogas, que necessita de um grande fornecimento da droga de interesse.

A descoberta da penicilina motivou a exploração dos micro-organismos como fonte de antibióticos. Esse movimento levou a uma explosão no desenvolvimento de técnicas de biotecnologia aplicadas a uma grande variedade de produtos. A década passada testemunhou um renovado interesse nos fungos para o desenvolvimento de compostos anti-infectivos, aumentando a consciência sobre a importância da biotecnologia. Infelizmente, a grande impossibilidade de cultivo dos micro-organismos em condições padrão de laboratório restringe a descoberta e o subsequente desenvolvimento biotecnológico de compostos antibacterianos possivelmente codificados em fungos até então desconhecidos. A descrição molecular de micro-organismos

por abordagens independentes de cultivo de uma série de habitats naturais tem possibilitado a descoberta de uma riqueza microbiana antes desconhecida, mostrando uma nova dimensão da diversidade dos fungos de ambientes marinhos (Richter et al., 2014).

Em contraste aos macro-organismos, os micro-organismos possuem a vantagem da produção factível e sustentável de grandes quantidades de produtos naturais com atividade anti-infectiva em cultivos de larga escala com custos razoáveis. Isso é um reflexo da proporção de produtos de fermentação da produção de antibióticos no mundo, que soma 100.000 toneladas por ano, incluindo 60.000 toneladas de penicilinas, 5.500 toneladas de tetraciclinas e 2.500 toneladas de cefalosporinas. Antibióticos naturais ou derivados de produtos naturais incluem  $\beta$ -lactâmicos e ampicilina (5.000 toneladas por ano), cefalexina (4.000 toneladas), amoxicilina (16.000 toneladas) e cefadroxil (1.000 toneladas). Macrolídeos produzidos em alta tonalagem compreendem a azitromicina (1.500 toneladas por ano) e a claritromicina (1.500 toneladas). Os glicopeptídeos tais como a vancomicina e a teicoplanina são produzidos em total de 9.000 toneladas por ano. Contudo, histórias de sucesso em biotecnologia marinha são bem menos numerosas do que em outros campos da biotecnologia comercial. Das muitas centenas de compostos bioativos descritos a partir de fungos marinhos, apenas poucos alcançam a comercialização (Bhadury; Mohammad; Wright, 2006).

## 4 | CONCLUSÕES

A diversidade de aplicações biotecnológicas de micro-organismos eucariotes, por exemplo, na alimentação humana, na produção de enzimas de interesse industrial, na produção de compostos farmacêuticos e na área médica, comprova o grande potencial biotecnológico desse grupo. Apesar dos avanços observados, grande parte do sucesso atual tem se baseado em produtos extraídos de poucas espécies, capazes de serem cultivadas e exploradas em larga escala.

Assim, podemos afirmar que ainda estamos longe de esgotar o potencial econômico do grupo. Se para algumas aplicações a falta de conhecimento da diversidade biológica impede o desenvolvimento de aplicações comerciais, em outros casos é necessária a otimização de processos existentes para que a exploração se torne viável economicamente. Esforços diversificados em pesquisa básica e no desenvolvimento e aperfeiçoamento de processos biotecnológicos serão necessários para que se possa concretizar esse potencial.

## 5 | PERSPECTIVAS, OPORTUNIDADES E DESAFIOS

O aumento populacional e a crescente demanda por recursos (alimentos, energia, água doce, entre outros) tornam a prospecção e exploração de recursos marinhos uma atividade estratégica para o próximo século. Essa exploração será ainda mais importante frente às recen-

tes crises hídricas observadas, mesmo em um país bem abastecido de água doce como o Brasil. Entre as abordagens necessárias para o desenvolvimento do potencial biotecnológico do grupo, destacam-se:

### **Estabelecimento e diversificação dos bancos de cultivo de micro-organismos**

Apesar das dificuldades inerentes ao cultivo de micro-organismos, é preciso diversificar as coleções de cultivos, corrigindo o viés geográfico e taxonômico observado atualmente nas coleções. O aumento da representatividade de regiões geográficas (em especial a costa brasileira), de habitats (incluindo ambientes de profundidade e de difícil acesso) e de táxons permitirá a exploração de novos produtos naturais. Além disso, uma maior representatividade taxonômica permite potencialmente identificar linhagens mais eficientes para uma determinada aplicação biotecnológica.

### **Prospecção de genes e vias metabólicas de interesse a partir de métodos independentes de cultivo**

Sabe-se que será impossível cultivar toda a diversidade biológica existente. A prospecção da biodiversidade por meio de bibliotecas de DNA ambiental e metagenomas é fundamental para preencher as lacunas existentes nas coleções biológicas. A expressão heteróloga de proteínas recombinantes em vetores conhecidos. A descoberta de novos genes e vias metabólicas de interesse deve guiar novos esforços de cultivo de micro-organismos. Essa descoberta também possibilita a introdução desses (as) genes (vias) em vetores competentes, possibilitando a produção de compostos de interesse.

### **Estabelecimento e diversificação de cultivos de micro-organismos marinhos competentes para a atuação como vetores de expressão heteróloga de proteínas**

Como a afinidade do organismo hospedeiro é fundamental para o sucesso da expressão heteróloga de proteínas, o estabelecimento de diversos sistemas de expressão é fundamental para a exploração de recursos descobertos por métodos independentes de cultivo, bem como para o aumento da eficiência na produção de compostos produzidos por espécies de crescimento lento.

### **Estabelecimento de biorrefinarias**

A ação combinada de diversas atividades de biotecnologia permite um melhor aproveitamento dos recursos empregados, melhorando a eficiência do processo global. Devido aos altos custos, atividades como a produção de biocombustíveis a partir de micro-organismos não são economicamente viáveis. A otimização desses processos é importante para evitar a dependência do processo a incentivos governamentais.

Apesar da grande linha de costa, a diversidade de micro-organismos eucariontes marinhos ainda é pouco explorada no Brasil. Frente a esses desafios, o recente estabelecimento de grupos e redes de pesquisa em biotecnologia indica uma perspectiva otimista para o próximo século.

## REFERÊNCIAS

- Adl, S. et al. (2012) The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 59(5): 429-514.
- Ajjawi, I.; Verruto, J.; Aqui, M.; Soriaga, L.B.; Coppersmith, J.; Kwok, K.; Carlson, T.J. (2017) Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. **Nature Biotechnology**. 35(7), 647-652.
- Andersen, R.A.; Kawachi, M. (2005) Microalgae isolation techniques. **Algal Culturing Techniques**. 83.
- Bauer, R.; Garnica, S.; Oberwinkler, F.; Riess, K.; Weiß, M.; Begerow, D. (2015) Entorrhizomycota: a new fungal phylum reveals new perspectives on the evolution of fungi. **PLoS ONE**. p. 1-19.
- Bhadury, P.; Mohammad, B.T.; Wright, P.C. (2006) The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 33: 325-37.
- Boretsky, Y.R.; Kapustyak, K.Y.; Fayura, L.R.; Stasyk, O.V.; Stenchuk, M.M.; Bobak, Y.P.; Drobot, L.B.; Sibirny, A.A. (2005) Positive selection of mutants defective in transcriptional repression of riboflavin synthesis by iron in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*. **FEMS Yeast Research**. 5: 829-837.
- Borowitzka, M. (2005) Culturing Microalgae in Outdoor Ponds. Automated Isolation. **Algal Culturing Techniques**. 205:218.
- Boussiba, S.; Vonshak, A. (1991) Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant and Cell Physiology**. 32(7):1077-82.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. 25(3), 294-306.
- Day, J.G. (2007) Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. 141-151.
- De Vargas, C.; Audic, S.; Henry, N.; Decelle, J.; Mahé, F.; Logares, R.; Lara, E.; Berney, C. et al. (2015) Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. **Science**. 348.6237: 1261605.
- Eppelmann, K.; Doekel, S.; Marahiel, M.A. (2001) Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**. 276(37):34824-31.
- Fell, J.W. (2001) Collection and identification of marine yeasts. In: John HP, ed. **Methods in Microbiology**. Burlington, VT: Academic Press: 347-356. Vol. 30.
- Forsyth, C. (2013) **Repairing the antibiotic pipeline: Can the gain act do it?** Wash. J. Law Technol. Arts.
- Gould, S.B.; Waller R.F.; McFadden, G.I. (2008) Plastid evolution. **Annual Review of Plant Biology**. 59.
- Guiry, M.D. (2012) How many species of algae are there? **Journal of Phycology**. 48(5): 1057-1063.
- Hallegraeff, G.M. (2003) Harmful algal blooms: a global overview. **Manual on Harmful Marine Microalgae**. 33:1-22.
- Hamed, I. (2016) The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 15(6), 1104-1123.
- Harrison, P.J., Berges, J.A. (2005) Marine culture media. **Algal Culturing Techniques**. 4:21-34.
- Hibbett, D.S; Binder, M.; Bischoff, J.F.; Blackwell, M.; Cannon, P.F.; Eriksson, O.E.; Huhndorf, S.; James, T. et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**. 111(5): 509-547.
- Himaya, S.W.A.; Kim, S.-K. (2013) Marine symbiotic microorganisms: A new dimension in natural pro-

ducts research. InL Kim, S.-K. Ed. **Marine Microbiology—Bioactive Compounds and Biotechnological Applications**. Wiley-VCH: Singapore: 295–306.

Janouškovec, J.; Horák, A.; Barott, K.L.; Rohwer, F.L.; Keeling, P.J. (2013) Environmental distribution of coral-associated relatives of apicomplexan parasites. **The ISME Journal**. 7(2):444.

Jones, E.W. (1991) Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in Enzymology**. 428-453.

Jones, E.B.G.; Suetrong, S.; Sakayaroj, J.; Bahkali, A.H.; Abdel-Wahab, M.A.; Boekhout, T.; Pang, K. (2015) Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. **Fungal Diversity** 73(1):1-72.

Keeling P.J. (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. **American Journal of Botany**. 91(10):1481-93.

Kodzius, R.; Gojobori, T. (2015) Marine metagenomics as a source for bioprospecting. **Marine Genomics**. 24: 21-30.

Kis-Papo, T. (2005) Marine fungal communities. In: Dighton, J.; White, J.F.; Oudemans, P. eds. **The Fungal Community: Its Organisation and Role in the Ecosystem**. Boca Raton, FL: Taylor & Francis: 61-92.

Kutty, S. N.; Philip, R. (2008) Marine yeasts – a review. **Yeast**. 25(7): 465-483.

Kurtzman, C.; Fell, J.W.; Boekhout, T. (2011) **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5. ed. Elsevier.

Lee, S.Y.; Mattanovich, D.; Villaverde, A. (2012) Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories. **Microbial Cell Factories**. 11:156.

Liu, X.Z.; Wang, Q.M.; Theelen, B.; Groenewald, M.; Bai, F.Y.; Boekhout, T. (2015a) Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. **Studies in Mycology**. 81:1-26.

Liu, X.Z.; Wang, Q.M.; Göker, M.; Groenewald, M.; Kachalkin, A.V.; Lumbsch, H.T.; A.M.M; Wedin, M.; Yurkov, A.M.; Boekhout, T. (2015b) Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**. 81:85-147.

Lorenz, R.T.; Cysewski, G.R. (2000) Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**. 18(4):160-7.

Moon-van der Staay, M.; Yeo, S.; De Wachter, R.; Vaulot, D. (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. **Nature**. 409.6820: 607.

Nilsson, G.; Belasco, J.G.; Cohen, S.N.; von Gabain, A. (1987) Effect of premature termination of translation on mRNA stability depends on the site of ribosome release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 84(14):4890-4.

Pichard, S.L.; Campbell, L.; Paul, J.H. (1997) Diversity of the ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase form I gene (rbcL) in natural phytoplankton communities. **Applied and Environmental Microbiology**. 63(9): 3600-3606.

Piel, J. (2002) A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 99(22):14002-7.

Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Rengasamy, R. (2007) Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 74(3):517-23.

Richards, T.A.; Jones, M.D.M.; Leonard, G.; Bass, D. (2012) Marine Fungi: their ecology and molecular diversity. **Annual Review of Marine Science**. 4:495-522.

Richter, L.; Wanka, F.; Boecker, S.; Storm, D.; Kurt, T.; Vural, Ö.; Süßmuth, R.; Meyer, V. (2014) Engineering of *Aspergillus niger* for the production of secondary metabolites. **Fungal Biology and Biotechnology**. 1: 1-13.

Shoun, H.; Kim, D.H.; Uchiyama, H.; Sugiyama, J. (1992) Dentrification by fungi. **FEMS Microbiology Letters**. 94:277-81

Sieracki, M., Poulton, N., Crosbie, N. Automated isolation techniques for microalgae. In: **Algal Culturing Techniques**. New York: Academic Press; 2005:101-116.

Smith, D.J.; Burnham, M.K.; Edwards, J.; Earl, A.J.; Turner, G. (1990) Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. **Nature Biotechnology**. 8: 39-41.

Tedersoo, L.; Sánchez-Ramírez, S.; Kõljalg, U. et al. (2018) **Fungal Diversity**. 90: 135.

Von Mulert, U.; Luzhetskyy, A.; Hofmann, C.; Mayer, A.; Bechthold, A. (2004) Expression of the landomycin biosynthetic gene cluster in a PKS mutant of *Streptomyces fradiae* is dependent on the coexpression of a putative transcriptional activator gene. **FEMS Microbiology Letters**. 230(1):91-7.

Wang, Y.; Pfeifer, B.A. (2008) 6-deoxyerythronolide B production through chromosomal localization of the deoxyerythronolide B synthase genes in *E. coli*. **Metabolic Engineering**.10(1):33-8.

Wang, Q.M.; Begerow, D.; Groenewald, M.; Liu, X.Z.; Theelen, B.; Bai, F.Y.; Boekhout, T. (2015a) Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina. **Studies in Mycology**. 81:55-83.

Wang, Q.M.; Groenewald, M.; Takashima, M.; Theelen, B.; Han, P.J.; Liu, X.Z.; Boekhout, T.; Bai, F.Y. (2015b) Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within *Pucciniomycotina* determined from multi-gene sequence analyses. **Studies in Mycology**. 81:27-53.

Wang, Q.M.; Yurkov, A.M.; Göker, M.; Lumbsch, H.T.; Leavitt, S.D.; Groenewald, M.; Theelen, B.; Liu, X.Z.; Boekhout, T.; Bai, F.Y. (2015c) Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Pucciniomycotina*. **Studies in Mycology**. 81:149-189.

Wenzel, S.C.; Müller, R. (2005) Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. **Current Opinion in Biotechnology**. 16(6):594-606.

Wickerham, L.J. (1951) Taxonomy of yeasts. **Technical Bulletin of the U. S. Department of Agriculture**. 1029:1-56.

Zaky, A.S.; Tucker, G.A.; Daw, Z.Y.; Du, C. (2014) Marine yeast isolation and industrial application. **FEMS Yeast Research**.14(6): 813-825.

Zeidner, G.; Preston, C.M.; DeLong, E.F.; Massana, R.; Post, A.F.; Scanlan, D.J.; Bèjà, O. (2003) Molecular diversity among marine picophytoplankton as revealed by psbA analyses. **Environmental Microbiology**. 5(3): 212-216.

Zilda, D.S.; Uria, A.R. (2016). Metagenomics-guided mining of commercially useful biocatalysts from marine microorganisms. **Advances in Food and Nutrition Research**, 78:1-26.

Zotchev, S.B.; Sekurova, O.N.; Katz, L. (2012) Genome-based bioprospecting of microbes for new therapeutics. **Current Opinion in Biotechnology**. 23(6):941-7.



# DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR PCR EM TEMPO REAL

Luciane Alessandra Chimetto Tonon<sup>a</sup>  
Ana Paula Barbosa Moreira<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade de São Paulo

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

## RESUMO

O uso da reação da polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction* – PCR) no diagnóstico molecular vem sendo considerado o padrão-ouro na detecção de ácidos nucleicos de diversas origens, além de ser ferramenta essencial na pesquisa laboratorial. A PCR em tempo real (*real-time* PCR) ampliou o uso dessa técnica, devido à superioridade nos quesitos rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade, e porque reduz o risco de contaminação ao dispensar o processamento pós-PCR. A *real-time* PCR monitora o progresso da amplificação durante seu curso (ou seja, em tempo real). Os dados são coletados ao longo da reação, enquanto, na PCR, são coletados apenas ao final do processo. A *real-time* PCR detecta a amplificação do alvo no primeiro ciclo da reação, em que esta (a amplificação) se inicia, dispensando a necessidade de acumular o alvo após um número fixo de ciclos. Quanto maior o número inicial de cópias do alvo, mais rapidamente será observado o aumento significativo na fluorescência. Essa inovação revolucionou a quantificação de DNA e RNA pela PCR.

# 1 | O QUE É DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR REAL-TIME PCR

O diagnóstico molecular é um dos segmentos de mercado que mais vêm crescendo nos últimos anos, tendo atingido a taxa de 25% ao ano, com movimentações monetárias de cerca de 6 bilhões de dólares. Os principais fatores que impulsionam esse crescimento se relacionam à crescente necessidade de técnicas automatizadas e de fácil manuseio, capazes de otimizar as etapas de preparação das amostras, análise e avaliação de dados. O diagnóstico de doenças infecciosas e a triagem de sangue, seguidos da genética tradicional, da medicina personalizada e do diagnóstico de câncer, representam cerca de 70% das atividades nesse segmento. A medicina laboratorial vem utilizando cada vez mais a biologia molecular por meio da detecção, identificação e quantificação de ácidos nucleicos (DNA/RNA). Os dados permitem, por exemplo, a detecção de doenças genéticas, genotipagem, estudos de vínculo genético, análise da expressão gênica pela quantificação de RNA, determinação do número de cópias de DNA (dosagem gênica), farmacogenômica, tipagem de HLA<sup>1</sup>, testes pré-implantacionais, análise das condições fetais pela avaliação do sangue materno, assim como a detecção, identificação e quantificação de micro-organismos, para diagnóstico ou monitoramento de infecções (HIV, HCV, *Micobacterium tuberculosis* e outras). Essas análises auxiliam o diagnóstico e o prognóstico de doenças infecciosas e genéticas, criando soluções para pesquisas clínicas e científicas.

## 1.1 DEFINIÇÃO

A PCR é o método que amplifica exponencialmente sequências de DNA específicas, a partir de uma mistura complexa de sequências genômicas ou DNA complementar, imitando o processo de replicação do DNA.

A PCR é uma das mais poderosas tecnologias em biologia molecular. Através da PCR, sequências específicas de DNA, cDNA ou RNA podem ser copiadas, ou “amplificadas”, de muitos milhares a milhões de vezes. O advento da técnica da *real-time* PCR foi um marco na área do diagnóstico molecular, uma vez que possibilitou o acompanhamento da amplificação do DNA molde concomitantemente aos ciclos térmicos, através da coleta contínua de sinal – fluorescência – durante a reação. O sistema se baseia no emprego de fluoróforos intercalantes de cadeia do DNA ou de sondas específicas marcadas com um repórter fluorescente que, nos dois casos, emitem fluorescência a cada ciclo de amplificação. SYBR® Green é um exemplo de fluoróforo, que reage com DNA dupla fita, utilizado para emitir fluorescência durante a reação. Outras ferramentas químicas são: as sondas de hidrólise TaqMan®, *molecular beacons* e *primers* (Sunrise™ e DzyNA).

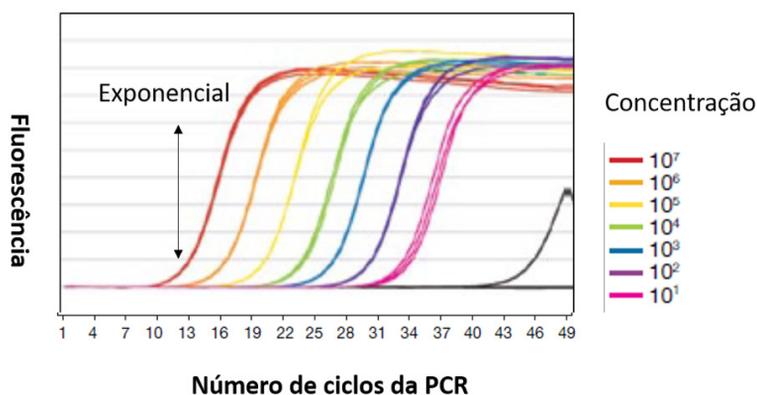
<sup>1</sup> HLA (antígenos leucocitários humanos) são produtos de genes encontrados no complexo principal de histocompatibilidade humano. São mais conhecidos por sua importância em transplantes, porém algumas moléculas estão associadas a doenças específicas, como doenças reumáticas, artrite, enteropatias e síndrome uretro-oculo-articular.

A eficácia e a eficiência da PCR, isto é, a amplificação do alvo e a magnitude da amplificação, respectivamente, só podem ser avaliadas horas depois do seu início, ou seja, no fim dos ciclos de amplificação. Na PCR os reagentes e o DNA molde são misturados em um tubo que é inserido no termociclador onde a programação térmica é executada. Ao final do programa uma alíquota da solução contida no tubo é submetida a eletroforese em gel de agarose em presença de brometo de etídio ou outro corante de DNA. Os fragmentos resultantes da amplificação podem ser visualizados como bandas no gel sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos (moléculas geradas pela PCR ou *amplicons*) é inferido pela comparação com um padrão de massa molecular que deve ser incluído na corrida. A *real-time* PCR possibilita acompanhar a eficácia da reação em tempo real, como se fosse possível “ver” o que ocorre com o DNA molde dentro do tubo à medida que vai sendo amplificado durante os ciclos. Na fase exponencial da reação (Figura 1) o aumento da fluorescência é diretamente proporcional ao número de *amplicons*. A alteração na fluorescência ao longo da reação é medida por um instrumento que inclui tanto um sistema ótico, que emite e capta luz, quanto um bloco que executa o programa térmico concomitantemente. Dessa forma, a plataforma de *real-time* PCR traça a intensidade da fluorescência ao longo dos ciclos, gerando um gráfico de amplificação que reflete a acumulação do produto amplificado durante toda a reação. Os resultados podem ser analisados de forma qualitativa ou quantitativa. O primeiro caso pode ser exemplificado por situações em que é suficiente saber se o DNA alvo está presente na amostra. Se houver amplificação, a resposta é positiva; se não houver, é negativa. A quantificação do DNA alvo na amostra requer uma curva-padrão de amplificação que permite a conversão da fluorescência em valores numéricos para as amostras avaliadas. Quando a amplificação e análise são combinadas numa única etapa, o processamento pós-PCR é eliminado. As vantagens advindas da *real-time* PCR são: o aumento na faixa dinâmica<sup>2</sup> da análise de  $10^3$  (PCR convencional) para  $10^7$ , maior precisão na quantificação dos *amplicons* a cada ciclo, possibilidade de monitorar o progresso da reação, redução ou eliminação da contaminação do ambiente de laboratório com produtos de PCR, ensaios mais confiáveis e mais rápidos, redução do tempo de liberação dos resultados de exames laboratoriais. Atualmente a *real-time* PCR é a principal ferramenta para a detecção e quantificação de DNA ou RNA.

## 1.2 HISTÓRICO

O desenvolvimento de diversos métodos de detecção e quantificação de ácidos nucleicos teve início após a descoberta da estrutura e função da molécula de DNA. As metodologias iniciais baseavam-se em ensaios de hibridização que, apesar de sensíveis, empregavam sondas marcadas radioativamente, eram dispendiosos, ofereciam risco à saúde e requeriam autorizações legais para manuseio. A segunda geração de métodos de detecção ainda foi dependente de hibridização, porém com materiais não radioativos (colorimétrico, químico-luminescente e químico-fluorescente). Técnicas como *Southern- e Northern-blot*, para detecção de DNA e RNA res-

<sup>2</sup> É a faixa ao longo da qual um aumento na concentração do material alvo resulta em aumento correspondente do produto.



**Figura 1.** Gráfico de amplificação mostrando o acúmulo do produto através do sinal fluorescente de cada amostra plotado em relação ao número de ciclos de amplificação da qPCR. As amostras que estão sendo amplificadas neste exemplo representam uma série de diluição e revelam o aumento do número de ciclos à medida que a amostra vai ficando mais diluída. Figura adaptada - Manual "Basic principles of Real Time PCR"/Termo Fisher Scientific (2014).

pectivamente, foram aplicadas na pesquisa básica e em diagnósticos clínicos. Contudo, a rápida evolução no domínio das ciências da saúde e forenses exigiu o desenvolvimento de novas técnicas de detecção cada vez mais rápidas e mais confiáveis, mesmo para quantidades ínfimas de moléculas. A técnica da PCR atendeu a essa demanda e se tornou a mais difundida mundialmente.

Os primeiros registros relacionados ao conceito da PCR surgiram com Har Gobind Khorana, bioquímico indiano naturalizado norte-americano, que recebeu o prêmio Nobel em 1968 por avanços significativos na elucidação do código genético. Por volta de 1971, Kjell Kleppe, pesquisador do laboratório de Khorana, imaginou como um sistema com dois iniciadores (ou *primers*) poderia levar à replicação de um segmento específico de DNA. A concretização veio na década de 80. Os primeiros relatos foram de Saiki et al. (1985), porém o químico norte-americano Mullis e seus colaboradores (1986; 1987) foram os que viabilizaram a multiplicação artificial de um alvo de DNA, obtendo um grande número de cópias idênticas através de ciclos de duplicação repetidos em cadeia. Mullis conseguiu especificidade na cópia apenas de regiões de interesse usando iniciadores em combinação com uma DNA polimerase termoestável, que havia sido isolada por Chien et al. (1976) da bactéria *Thermus aquaticus* (daí o nome da enzima - *Taq* - com as iniciais do organismo). *T. aquaticus* foi descrita por Thomas D. Brock (1969) que a isolou pela primeira vez de uma fonte termal do Parque Nacional de Yellowstone (EUA). Anteriormente haviam sido realizadas PCRs catalisadas por uma polimerase de *Escherichia coli*, que não é termoestável, e tinha que ser repostada após cada ciclo de desnaturação térmica do DNA (conduzida a 95°C). O emprego da *Taq* (EC 2.7.7.7) otimizou a PCR, pois sua meia-vida enzimática é de 40 minutos a 94°C (com limiar térmico de 117°C) e, na sua temperatura ótima, de 72°C, consegue construir uma cadeia de DNA de 1000 bases (1Kb) em 30 segundos. Em 1989 a revista *Science* nomeou a *Taq* sua primeira *Molecule of the Year* (Molécula do Ano) e, em 1993, Mullis foi

agraciado com o Nobel por seu trabalho relacionado à PCR. Brock aproveitou os desdobramentos da sua descoberta para valorizar a pesquisa básica na publicação *The Value of Basic Research: Discovery of Thermus aquaticus and Other Extreme Thermophiles* (O valor da pesquisa básica: descoberta de *Thermus aquaticus* e outros extremófilos, de 1997).

O fator limitante do processo era a realização manual dos ciclos de temperatura, ou seja, havia a necessidade de vários banhos-maria com as temperaturas de cada ciclo e um operador dedicado que posicionava a estante com os tubos das amostras no banho/temperatura de cada ciclo durante o tempo especificado no programa. O primeiro termociclador automático, o *DNA Thermal Cycler*, lançado em 1989, usava resistências elétricas para aquecimento ventoinhas e tubulações em serpentina, preenchidas com etileno glicol, para refrigeração. A confiabilidade das reações aumentou e a técnica foi simplificada e automatizada. Em meados dos anos 90 surgiu o padrão *Peltier*, no qual um bloco metálico aquece ou resfria de acordo com o sentido da corrente elétrica aplicada.

O sucesso e a eficiência da PCR convencional estão diretamente relacionados a fatores como quantidade e integridade do DNA, especificidade dos *primers*, presença de inibidores e manipulação dos *amplicons*. Para contornar limitações associadas a esses fatores, como a quantidade do DNA e o processamento pós-PCR, foi desenvolvida a *real-time* PCR, que na versão quantitativa é denominada qPCR. Em 1992, Higuchi e colaboradores montaram um sistema reacional acoplado a uma câmera de vídeo, com o objetivo de monitorizar a PCR durante todos os ciclos. Incluíram fluoróforos ligantes de DNA dupla fita e conseguiram detectar o aumento da fluorescência durante a amplificação do alvo. Nessa modalidade as fases de amplificação, detecção e quantificação do alvo são totalmente automatizadas, ocorrendo de forma simultânea e em tempo real.

O sucesso da técnica estimulou seu rápido aperfeiçoamento no final do século XX, trazendo melhoria das plataformas, dos sistemas óticos para excitação e captura da fluorescência emitida e de *softwares* específicos para a aquisição de dados e análise dos resultados. Pequenas quantidades de material genético puderam ser copiadas milhões de vezes e em poucas horas, possibilitando uma rápida e confiável análise do material genético alvo. Esse avanço biotecnológico trouxe maior rapidez e precisão nas análises clínicas, agropecuárias e científicas, possibilitando sua aplicação na detecção de patógenos, análise de expressão gênica, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), análises de aberrações cromossômicas, marcadores genéticos de doenças infecciosas, doenças genéticas, mapeamento genético, testes de paternidade, identificação de micro-organismos, clonagem de genes, na construção de árvores filogenéticas, autenticação de material biológico, biodefesa e outras. Portanto, essa técnica revolucionou várias áreas, tais como Biologia Molecular, Patologia, Farmácia, Botânica e Medicina Forense.

### 1.3 EXEMPLOS DE ESTUDOS E APLICAÇÕES NA BIOTECNOLOGIA MARINHA

#### 1.3.1 AUTENTICAÇÃO DE PESCADOS E FRUTOS DO MAR

A substituição de espécies de pescados e frutos do mar ocorre em todo o mundo. Trata-

-se de uma prática fraudulenta em que uma espécie é rotulada com a nomenclatura de outra, de maior valor comercial, com objetivo de maximizar o lucro. Resulta em prejuízo para o comprador e eventualmente pode provocar danos ao meio ambiente e à saúde do consumidor. A adulteração da identidade pode resultar em comercialização de espécies ameaçadas de extinção ou vulneráveis, ou cuja pesca esteja proibida ou restrita devido ao manejo, colocando em risco a conservação das espécies, o equilíbrio ecológico e a pesca sustentável. Pode viabilizar ainda a comercialização de espécies que oferecem riscos à saúde, as quais, quando corretamente rotuladas, são evitadas. A pesca ilegal, não regulada e não reportada (*illegal, unregulated and unreported* - IUU) é responsável pela captura anual de 26 milhões de toneladas, com valor estimado de US\$ 23 bilhões, segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), o que representa ~25% da pesca global. Fração significativa dessa captura é comercializada por meio da substituição de espécies em algum ponto da cadeia de suprimento. Estudos quantificando a substituição de espécies vêm sendo realizados em pelos menos 55 países em todos os continentes. Estados Unidos (EUA), Espanha e Itália vêm concentrando investigações. Em média, aproximadamente 25% de todas as amostras de todos os estudos apresentavam rotulagem fraudulenta em 2016. Num único estudo de caso, ocorrido em 2013, no qual um lote de peixe-galo (*oreo dory*) estava rotulado como peixe-relógio ou olho-de-vidro-laranja (*orange roughy*), a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA estimou que a fraude poderia ter proporcionado um lucro ilícito de US\$ 150 mil. A cioba (*red snapper*) é uma das espécies cuja identidade é mais frequentemente adulterada em todo o mundo. Esse rótulo corresponde à espécie *Lutjanus campechanus*, no entanto diversos peixes de carne branca, até mesmo a tilápia, são vendidos como tal. A fraude alcança 46-100% das amostras por estudo nos EUA, Canadá, Colômbia e Panamá. Outros pescados cuja identidade é comumente fraudada são bacalhau, garoupas e salmão, seguidos do abalone (*halibut*), tamboril (*anglerfish*), raias e polvos. O caviar do esturjão, espécie Ameaçada (*Endangered*) segundo a *International Union for the Conservation of Nature* (IUCN), vem sendo comercializado falsamente como legal (com origem adulterada). Espécies ameaçadas ou vulneráveis que vêm sendo vendidas com rótulo falso são o atum-rabilho (*bluefin tuna*), o tubarão-azul, o tubarão *resher* (gênero *Alopias*) e raias. No Brasil, o peixe-serra (*Pristis perotteti*), espécie Criticamente Ameaçada (*Critically Endangered*) segundo a IUCN, foi encontrado à venda com a rotulagem genérica de "tubarão" em 55% das amostras testadas numa única avaliação (2013). Quanto ao risco à saúde humana, há vários exemplos de práticas implicadas. O escolar-preto (escolar, *Lepidocybium flavobrunneum*) e o peixe-chocolate ou anchova-negra (*oilfish*, *Ruvettus pretiosus*) são incapazes de metabolizar a gempilotoxina - um éster ceroso - presente em suas dietas e que se concentra em sua carne. Apesar da ingestão poder causar ceriorreia, uma diarreia descontrolada, cerosa e de cor laranja, ambos são frequentemente servidos em lugar de albacora (*white tuna*) nos EUA, de peixe-carvão-do-pacífico (*sablefish*) nas Filipinas, de bacalhau em Hong Kong, ou de cavalinha (*mackerel*) na República Tcheca. Outro exemplo alarmante é a alteração da identidade dos peixes listados pela FDA pelo alto teor de mercúrio, como peixe-batata (*tilefish*), espadarte (*swordfish*) cavala-verdadeira (*king mackerel*) e tubarões, cujo consumo é desaconselhado para grávidas e crianças. As tendências atuais de aumento do consumo e de declínio dos estoques reforçam o apelo econômico para a substituição de espécies. Entre 2008 e 2011, o

consumo anual de peixe aumentou de ~17 para ~19kg por pessoa. Em contrapartida, ~30% dos estoques pesqueiros (fração classificada como sobre pescada em 2012) dificilmente serão restaurados o suficiente para exploração nos próximos anos. O recente tratado internacional *Port State Measures Agreement* (PSMA), capitaneado pela FAO, visa minar a pesca IUU por meio da fiscalização portuária e unificação dos esforços dos signatários (46 em 2017; o Brasil assinou, mas deve a deposição de um instrumento de ratificação, aceite ou aprovação). Na outra extremidade da cadeia de suprimento, a substituição de espécies é coibida principalmente pelos testes de autenticação dos frutos do mar. Recente pesquisa envolvendo laboratórios acreditados na União Europeia (EU) revelou que inexistem padronização e que os métodos baseados no DNA, especialmente no sequenciamento, são os mais amplamente difundidos. Devido à enorme diversidade dos grupos taxonômicos que o mercado global de frutos do mar reúne, outras abordagens são pouco competitivas. Para ilustrar a magnitude dessa diversidade, a lista da FDA continha 1973 espécies comerciais de frutos do mar em 2020. Além da diversidade, o processamento de uma gama de frutos do mar impossibilita o reconhecimento morfológico, e também por outros métodos, de muitos produtos encontrados no varejo. Métodos bioquímicos tradicionais baseados em proteínas específicas, como focalização isoelétrica, cromatografia líquida de alta performance ou imunoenaios, só se aplicam às amostras frescas, pois as proteínas de produtos cozidos e enlatados são desnaturadas durante o processamento. Portanto, o DNA, que é termoestável, tem sido o alvo para autenticação dos processados. Porém não há um método “oficial”, nem mesmo no âmbito da EU, cujos membros estão sujeitos às mesmas normas de rastreamento e autenticidade. Uma das dificuldades para a padronização metodológica é a marcante variação das espécies comumente testadas nos diferentes países, refletindo preferências regionais. Na EU as solicitações de autenticação incidem principalmente sobre bacalhaus, haddocks e outros gadoides (*Gadidae* e *Lotidae*), peixes brancos (*white fish* – pescada, merluza, escamudo e outros), panga (bagre vietnamita, *Pangasius*, amplamente vendido em lugar de gadoides), linguados, atuns e salmonídeos. A substituição por panga, espécie de água doce de baixo custo, traz apreensão adicional, devido ao teor de mercúrio. Apesar do sequenciamento de alvos específicos no DNA estar amplamente difundido como ferramenta acurada para autenticação, alguns desafios persistem. A identificação de rotulagem fraudulenta no mercado de alimentos, especialmente de frutos do mar, é tempo-dependente. Para o sequenciamento, as amostras são transportadas aos laboratórios e submetidas a uma rotina intensiva de procedimentos que inclui a PCR, o sequenciamento e análises filogenéticas. Muitos laboratórios acreditados já utilizam a *real-time* PCR como alternativa mais rápida e mais econômica em termos de equipamentos e reagentes, facilmente automatizável, além disso mais sensível e específica. Várias ferramentas vêm sendo descritas na literatura especializada, principalmente desde 2005, porém persiste a ausência de recomendações que orientem a padronização. A participação da indústria vem fornecendo contribuição relevante na oferta de sistemas *real-time* PCR testados para autenticação de frutos do mar. Uma organização independente que reúne mais de 245 empresas no âmbito do setor agro-mar-alimentício (ANFACO-CECOPESCA, Espanha) vem disponibilizando inúmeras ferramentas úteis baseadas na *real-time* PCR. Contando com laboratório científico acreditado pela *Entidad Nacional de Acreditación* (ENAC), vem divulgando sistemas para autenticação do linguado europeu (*Solea solea*), bacalhau do Atlântico

(*Gadus morhua*), salmão do Atlântico (*Salmo salar*), espadarte (*Xiphias gladius*), de espécies de tamboril (*Lophius budegassa* e *L. piscatorius*); e ainda para verificação de rotulagem da lula europeia (*Loligo vulgaris*), para distinguir polvo comum (*Octopus vulgaris*) das espécies substituintes mais frequentes (*Eledone cirrhosa* e *Dosidicus gigas*), sardinhas verdadeiras (*Sardina pilchardus*) de sardinhas falsas (*Sardinella aurita*), e outras. Entre essas ferramentas relacionadas, a média de tempo total de procedimentos foi de 4 horas, e da corrida na plataforma de tempo-real, 40 minutos; a química da reação foi TaqMan®; os alvos moleculares foram principalmente o gene mitocondrial que codifica a citocromo oxidase I (COI) e o espaço intergênico (ITS1) entre as subunidades pequena (5,8S) e grande (18S) do RNAr; a especificidade para as espécies alvo foi de 100% (observadas a temperatura ótima de anelamento e o limiar do ciclo – *cycle threshold*,  $C_t$ ); a eficiência foi >98%, e o limite de detecção (*limit of detection*, LOD) variou de 2,5pg – 2,5ng de DNA alvo na reação (o LOD não é crucial para a autenticação, porém reflete a sensibilidade do sistema). Em todos os exemplos citados a validação da metodologia incluiu a submissão de parte das amostras a diversos tratamentos usuais no processamento das espécies testadas, de modo que ficou comprovada a eficácia dos ensaios tanto para amostras frescas quanto enlatadas, marinadas, defumadas, cozidas, pré-cozidas e outras formas de processamento. Outras contribuições relevantes do mesmo grupo são os sistemas para detecção dos agentes etiológicos da ceriorreia (*L. flavobrunneum* e *R. pretiosus*); para rastreamento da enguia europeia (*Anguilla anguilla*) em aquacultura (incluindo todas as fases do ciclo de vida) e em frutos do mar; e ainda para sistemas de cultivo de rodovalho (*Scophthalmus maximus* L.); a detecção do parasita *Tetramicra brevifilum* e a detecção não-invasiva do parasita entérico *Enteromyxum scophthalmi*.

### 1.3.2 AQUACULTURA: DETECÇÃO DE PATÓGENOS, DIAGNÓSTICO

A FAO avaliou os estoques pesqueiros mundiais com dados de 2013 e concluiu que 65% estão plenamente pescados (níveis biologicamente sustentáveis), 25% estão sobrepescados (níveis biologicamente insustentáveis) e para 10% o estado das reservas foi considerado indefinido. Entre 2009 e 2014, o aumento da produção, em milhões de toneladas, da pesca e da aquacultura marinhas foi de 2 (79,5 para 81,5) e 5,3 (21,4 para 26,7), respectivamente. O esgotamento dos estoques pesqueiros se reflete nas tendências divergentes, de estagnação e crescimento, das indústrias da pesca e da aquacultura, respectivamente. A expectativa é a de que a importância relativa da aquacultura para a segurança alimentar do planeta continue aumentando. Independente da fonte, as principais commodities da indústria de pescados são os peixes, camarões e moluscos. Mais especificamente, e em ordem decrescente de acordo com valores monetários, são os salmões e trutas; os camarões; bonitos e atuns; bacalhaus e haddocks; outros peixes pelágicos, seguidos de polvos e lulas. A produção da aquacultura, das duas commodities mais valorizadas, salmões e camarões, superou a da pesca em 2010. Os valores, em milhões de toneladas, fornecidos para a aquacultura e pesca, foram de 2,4 e 1 (salmões); 3,5 e 3 (camarões), respectivamente. Um dos fatores limitantes para o sucesso dos sistemas produtivos em aquacultura, e que maior preocupação vem causando, são os surtos epizoóticos. Em resposta, pesquisadores e a indústria vêm desenvolvendo novas tecnologias de gerenciamento, diagnóstico e exclusão de doenças. As tendências emergentes nessas três áreas repre-

sentam o fundamento para uma indústria da aquacultura sustentável para o futuro. Em termos de diagnóstico, nos últimos vinte anos os métodos tradicionais começaram a ser respaldados por métodos moleculares. De acordo com o *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (Manual de Testes Diagnósticos para Animais Aquáticos), constantemente atualizado pela *World Organization for Animal Health* (Organização Mundial para a Saúde Animal, originalmente *Office International des Epizooties* – OIE), entre as tecnologias disponíveis, a PCR é a mais amplamente utilizada para confirmar suspeitas baseadas na história do caso, sinais superficiais e histopatologia. As versões *real-time*, RT-PCR e qPCR, estão comercialmente disponíveis em número ainda modesto, mas crescente, de sistemas miniaturizados, reagentes e protocolos. Em 2017, o Manual da OIE elencou 34 doenças que ameaçam a produção em operações aquáticas. Todas são doenças infecciosas, sendo 12 de peixes, 11 de crustáceos, 9 de moluscos e 2 de anfíbios. Para mais da metade já existem ferramentas de detecção do agente etiológico baseadas na tecnologia *real-time* validadas pela OIE, bem como sistemas comerciais miniaturizados (em agosto/2017) (Tabela 1). Para a aquacultura a acurácia e o diagnóstico precoce são imprescindíveis, uma vez que a presença de patógenos requer a exclusão/eliminação dos animais infectados e, conseqüentemente, perda parcial ou total da produção. A aplicação da tecnologia *real-time* nessa atividade é um dos melhores exemplos do quanto sua rapidez, sensibilidade e acurácia podem minimizar prejuízos financeiros e riscos à segurança alimentar. Para a eficácia da tecnologia *real-time* na aquacultura, os principais desafios são a sensibilidade e a especificidade. O objetivo é a detecção do menor número de cópias do gene alvo nas amostras, com risco mínimo de falsos negativos ou positivos. Falsos negativos podem resultar no espalhamento do agente etiológico no âmbito da unidade produtora e eventualmente para o ambiente e/ou em impacto na saúde dos consumidores, e falsos positivos podem resultar em perdas indevidas da produção.

**Tabela 1.** Disponibilidade de ferramentas de diagnóstico baseadas na tecnologia *real-time* para as doenças infecciosas que ameaçam a produção de operações com animais aquáticos (em 2017).

GRUPO HOSPEDEIRO	DOENÇA	AGENTE ETIOLÓGICO	DISPONIBILIDADE REAL-TIME (STATUS DE VALIDAÇÃO)	DISPONIBILIDADE DE SISTEMAS COMERCIAIS REAL-TIME
Peixes	Necrose hematopoiética epizootica (EHN)	Vírus da necrose hematopoiética epizootica (EHNV)	qRT (ANV)	E
	Síndrome ulcerativa epizootica (EUS)	<i>Aphanomyces invadans</i> (syn <i>A. piscida</i> )	PCR regular (V)	NE
	Infeção por <i>Gyrodactylus salaris</i>	<i>G. salaris</i> (Platyhelminthes)	PCR regular (V)	NE
	Necrose hematopoiética infecciosa (IHN)	Vírus da necrose hematopoiética infecciosa (IHNV)	qRT (ANV), qRT (ANV)	E
	Infeção pelo vírus da anemia do salmão (ISA)	Vírus infeccioso da anemia do salmão com região HPR deletada ((HPR)-deleted ISA)	qRT (V)	E

GRUPO HOSPEDEIRO	DOENÇA	AGENTE ETIOLÓGICO	DISPONIBILIDADE REAL-TIME (STATUS DE VALIDAÇÃO)	DISPONIBILIDADE DE SISTEMAS COMERCIAIS REAL-TIME
Peixes	Infecção pelo alphavirus salmonídeo	Alphavirus salmonídeo(SAV)	qRT (V)	NE
	Doença do vírus Koi de herpes (KHVD)	Vírus Koi de herpes (KHV)	qrt (V)	E
	Doença iridoviral do sargo do Mar Vermelho (RSIVD)	Iridovírus do sargo do Mar Vermelho (RSIV)	PCR regular (V)	E
	Viremia de primavera da carpa (SVC)	Vírus da viremia de primavera da carpa (SVCV)	PCR regular com transcrição reversa (V)	E
	Hemorragia septicêmica viral (VHS)	Vírus da hemorragia septicêmica viral (VHSV)	qRT (V)	E
	Doença do vírus <i>Oncorhynchus masou</i> (OMVD)	Vírus da doença <i>O. masou</i> (OMV)	PCR regular (V)	E
	Encefalopatia e retinopatia virais (VER) ou necrose nervosa viral (VNN)	Várias linhagens de <i>Betanodavirus</i> (SJNNV, TPNNV, BFNNV, RGNNV)	qRT (V)	E
Crustáceos	Doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND)	Linhagens de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> com plasmídeo contendo genes homólogos aos da toxina binária de <i>Photobacterium</i> relacionada a insetos ( $Vp_{AHPND}$ )	qrt (V)	E
	Infecção por <i>Aphanomyces astaci</i> (crayfish plague, praga do lagostim)	<i>A. astaci</i>	qrt (V)	NE
	Infecção por <i>Hepatobacter penaei</i> (hepatopancreatite necrosante)	<i>H. penaei</i>	qrt (V)	NE
	Infecção pelo vírus da necrose hematopoiética e hipodérmica infecciosas	Vírus da necrose hematopoiética e hipodérmica infecciosas (IHNNV)	qrt (V)	E
	Infecção pelo vírus da mionecrose infecciosa	Vírus da mionecrose infecciosa (IMNV)	qRT (V)	E
	Infecção pelo nodavírus <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (white tail disease (WTD), doença da cauda branca)	<i>M. rosenbergii</i> (MrNV) (primário) e vírus extra pequeno associado (XSV) (associate)	qRT (V)	NE
	Infecção pelo vírus da síndrome Taura	Vírus da síndrome Taura (TSV)	qRT (V)	E
	Doença do ponto branco (white spot disease, WSD)	Vírus da síndrome do ponto branco (WSSV)	qrt (V)	E
	Infecção pelo genótipo 1 do vírus da cabeça amarela	Vírus da cabeça amarela genótipo 1 (YHV1)	qRT (V)	E

GRUPO HOSPEDEIRO	DOENÇA	AGENTE ETIOLÓGICO	DISPONIBILIDADE REAL-TIME (STATUS DE VALIDAÇÃO)	DISPONIBILIDADE DE SISTEMAS COMERCIAIS REAL-TIME
Crust.	Baculovirose esférica	Baculovírus do <i>Penaeus monodon</i> (MBV)	PCR regular (V)	E
	Baculovirose tetraédrica	<i>Baculovirus penaei</i> (BP)	PCR regular (V)	E
Moluscos	Infecção pelo vírus da herpes do abalone, ganglioneurite viral do abalone (AVG)	Vírus da herpes do abalone (AbHV)	qrt (V)	NE
	Infecção por <i>Bonamia exitiosa</i>	<i>B. exitiosa</i> (protista Haplosporidia)	qrt (ANV)	NE
	Infecção por <i>Bonamia ostreae</i>	<i>B. ostreae</i> (protista Haplosporidia)	qrt (V)	NE
Moluscos	Infecção por <i>Marteilia refringens</i>	<i>M. refringens</i> (protista Cercozoa)	PCR regular (V)	NE
	Infecção por microvariantes do vírus da herpes ostreídeo 1	Microvariantes do vírus da herpes ostreídeo 1 (OsHV-1) (variações no locus de microsatélite a montante da ORF4 e nas ORF4 e ORF42/43)	qrt (V)	NE
	Infecção por <i>Perkinsus marinus</i> , doença dérmica em ostras	<i>P. marinus</i> (protista Perkinsea)	qrt (ANV)	NE
	Infecção por <i>Perkinsus olseni</i>	<i>P. olseni</i> (syn <i>P. atlanticus</i> ) (protista Perkinsea)	qrt (ANV)	NE
	Infecção por <i>Xenohaliotis californiensis</i>	<i>X. californiensis</i>	PCR regular (V)	NE
	Infecção por <i>Mikrocytos mackini</i> , doença da Ilha Denman em ostras	<i>M. mackini</i>	qrt (ANV)	NE
Anfíbios	Infecção por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	<i>B. dendrobatidis</i> (Bd)	qrt (V)	E
	Infecção por ranavírus	<i>Frog virus 3</i> (FV3); <i>Ambystoma tigrinum virus</i> ; <i>Bohle iridovirus</i> ; outros (algumas identificações ainda são tentativas)	PCR regular (V)	NE

Syn, sinonímia; Real-time, tecnologia real-time; qrt, real-time quantitativa; qRT, real-time quantitativa com transcrição reversa; V, ferramenta validada pela OIE; ANV, ferramenta ainda não validada pela OIE; E, encontrado; NE, não encontrado.

### 1.3.3 FLORAÇÕES MARINHAS TÓXICAS: IDENTIFICAÇÃO, DETECÇÃO E CONTROLE

Florações de algas microscópicas nocivas (*harmful algal blooms* – HAB) nas vias navegáveis são cada vez mais preocupantes, pois têm aumentado em número e frequência nos últimos vinte anos. Além das biotoxinas que produzem, eventualmente letais para humanos, animais

marinhos e aves, sua biomassa pode ser deletéria para os ecossistemas, causando alterações de hábitat, como depleção do oxigênio, substituição de espécies, e outras consequências. A aplicação da *real-time* PCR e qPCR na detecção, identificação e quantificação das microalgas é mais recente de que seu emprego no diagnóstico clínico e vem se difundindo principalmente desde os anos 2000. O método pode ser aplicado tanto com amostras de água do mar quanto de sedimentos e animais marinhos que tenham incorporado as espécies tóxicas por filtração. Os grupos taxonômicos que vêm sendo alvo da técnica são os dinoflagelados (classe Dinophyceae: *Dinophysis acuta* e *D. acuminata*, *Cochlodinium polykrikoides*, e espécies dos gêneros *Alexandrium*, *Heterocapsa*, *Karenia*, *Gambierdiscus*, *Gymnodinium*, *Karlodinium*, *Ostreopsis* e *Takayama*), as diatomáceas (*Pseudo-nitzschia* spp.) e membros das classes Raphidophyceae (*Chatonella* spp., *Heterosigma* spp., *Pfiesteria japonica*), Haptophyceae (*Prymnesium parvum*), Pelagophyceae e Cyanophyceae (ex.: *Planktothrix* sp.). Cianobactérias são responsáveis por envenenamentos em todo o mundo, em águas marinhas, salobras e doces, e vêm catalisando fração significativa dos investimentos na detecção e controle de HABs. As cianotoxinas que produzem são classificadas de acordo com sua atividade biológica, como neurotoxinas (anatoxina, saxitoxina e cilindropermopsina), citotoxinas, hepatotoxinas (microcistina e nodularina) e toxinas irritantes (lipopolissacarídeos). O maior risco à saúde pública está associado às neurotoxinas e hepatotoxinas. A identificação das espécies tóxicas com base nos métodos convencionais é infrutífera, pois a correlação entre toxicidade e as características fisiológicas e morfológicas é baixa. Bioensaios apresentam alto custo, baixa sensibilidade e questões éticas. Métodos físico-químicos de detecção de toxinas são laboriosos e requerem equipamentos sofisticados e caros (HPLC, MALDI-TOF). Métodos imunológicos e bioquímicos (ex.: ELISA) não superam a *real-time* PCR em simplicidade, custo, rapidez, acurácia e sensibilidade (ex.: apenas 3 células L<sup>-1</sup> foram suficientes para a detecção de *Gymnodinium catenatum* em amostras de uma floração na Nova Zelândia). Inicialmente os alvos moleculares foram o gene RNAr 16S e a região ITS. Porém as florações tóxicas são causadas por linhagens que não se agrupam de acordo com a filogenia baseada nesses marcadores (com exceção de espécies tóxicas e atóxicas de *Nodularia*, diferenciadas pelo 16S). Genes que codificam ficocianinas (operon PC) e a fixação de nitrogênio (*nifJ*) não se mostraram mais informativos. A descoberta dos complexos (*clusters*) gênicos de sintetases de cianotoxinas resultou numa explosão de ferramentas para a detecção dos grupos tóxicos. As cianotoxinas são sintetizadas por vias não-ribossomais, envolvendo enzimas pertencentes tanto à família das policetídeo-sintases (PKSs) quanto das peptídeo-sintases-não-ribossomais (NRPSs). Inicialmente foram caracterizadas as vias de biossíntese da microcistina (*cluster mcy*) e nodularina (*cluster nda*). Posteriormente foram identificados genes pertencentes às vias da cilindropermopsina (*cluster cyr*), saxitoxina (*cluster stx*) e anatoxina (*cluster ana*). Porém, apenas a determinação dos alvos apropriados não justifica, por si só, o emprego da tecnologia *real-time* (a mudança de plataforma requer investimento inicial) para monitoramento e controle de HABs, ou seja, rotineiramente e em larga escala. O custo-benefício se torna compensador se considerada a correlação significativa observada entre a abundância dos genótipos das linhagens produtoras de microcistina e nodularina, por exemplo, e a concentração dessas toxinas nas amostras ambientais. Essa correlação permite inferir o risco associado às atividades humanas recreativas, esportivas, econômicas e de consumo da água

a partir da quantificação do(s) alvo(s) molecular(es). A modalidade quantitativa da tecnologia *real-time* é muito mais robusta que a convencional. A quantificação deve ser realizada rotineiramente, de modo que o aparecimento ou aumento das populações tóxicas seja detectado na fase incipiente das florações. A técnica também pode ser útil no estudo das correlações entre as variantes ambientais, o desencadeamento das florações e o surgimento das linhagens tóxicas. Entre os principais desafios podemos citar a presença de inibidores da PCR nas amostras ambientais (exs.: metais pesados, ácidos húmicos), alguns abundantemente produzidos pelas microalgas (exs.: polifenóis, mucopolissacarídeos), que podem reduzir a eficiência ou impedir a amplificação. Esse problema pode ser solucionado pelo aperfeiçoamento da etapa de purificação durante a extração dos ácidos nucleicos. Outro desafio é a necessidade de sistemas que detectem simultaneamente diferentes genótipos associados à produção de diferentes toxinas (multiplex qPCR). Frequentemente as HABs reúnem mais de uma população tóxica e, conseqüentemente, diferentes toxinas podem estar presentes nas florações.

## 2 | ABORDAGENS METODOLÓGICAS

Nesta seção abordaremos uma visão geral das etapas da realização de *real-time* PCR e suas terminologias. Anteriormente, relatamos que a *real-time* PCR é uma variação da técnica de PCR padrão utilizada para quantificar DNA ou RNA em uma amostra. Utilizando sequências de *primers* específicas, é possível determinar o número relativo de cópias de uma sequência de DNA ou RNA particular, mensurando a quantidade de produto amplificado durante a fase exponencial da PCR. A quantificação do produto amplificado é obtida por meio de sondas fluorescentes ou corantes fluorescentes ligados ao DNA, que são detectados e quantificados em equipamento composto por termociclador, fonte luminosa e um detector de fluorescência acoplado a um *software* que traduz graficamente em tempo real os dados da emissão de fluorescência obtidos. O sinal aumenta de forma diretamente proporcional à quantidade do produto da PCR na reação, relacionando os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo. Quando o dobro da quantidade do produto é acumulado a cada ciclo, ocorre 100% de eficiência da reação. Se uma sequência particular (DNA ou RNA) é abundante na amostra, a amplificação é observada em ciclos iniciais se a sequência é escassa, a amplificação é observada em ciclos posteriores.

As reações de qPCR são compostas por três principais etapas que geralmente ocorrem em 40 ciclos. Na **primeira etapa** ocorre a desnaturação da fita de DNA. A temperatura deve ser adequada à polimerase (normalmente 95°C) e o tempo de desnaturação pode ser aumentado se o conteúdo de bases GC no DNA da amostra for alto. Na **segunda etapa** ocorre o anelamento dos oligonucleotídeos. A temperatura utilizada dependerá da temperatura de desnaturação dos *primers*. Recomenda-se 5°C abaixo da temperatura de desnaturação. Para amplificação de uma região de interesse no genoma, deve-se considerar que os produtos resultantes da amplificação devem ser fragmentos pequenos, para maior eficiência das reações. Para isso a escolha do local de hibridização dos *primers* é muito importante. No caso da *real-time* PCR, fragmentos

considerados de tamanho ideal variam entre 50 a 150 pb. A **terceira etapa** se refere à síntese ou extensão da sequência-alvo, que geralmente ocorre a 70-72°C. Essa é a temperatura ótima da DNA polimerase e onde a extensão dos *primers* ocorre a 100 bases por segundo. A quantidade de sequências duplica a cada ciclo, resultando a uma acumulação exponencial de produto.

### 2.1 RT-PCR OU qRT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE CHAIN REACTION)

A análise da molécula de RNA por meio da técnica de *real-time* PCR recebe o nome de **RT-PCR** ou **qRT-PCR** (*reverse transcriptase chain reaction*). Normalmente é usada em estudos de expressão gênica, para avaliar a expressão diferencial de determinadas proteínas em diferentes condições. Essa reação pode ser realizada em uma ou duas etapas (Tabela 2). Na etapa única a transcrição reversa e a amplificação propriamente dita ocorrem em um único tubo contendo todos os reagentes. Na etapa dupla a transcrição reversa ocorre de forma independente, o cDNA será sintetizado e, posteriormente alíquotas da amostra serão separadas e usadas para amplificação em qPCR. Em ambos os casos a amostra de RNA deve ser convertida em cDNA (DNA complementar) através da enzima *transcriptase reversa* (RT), uma vez que a DNA polimerase usada na reação de PCR não é capaz de usar RNA como molde (*template*). Em geral, apenas 10% do produto da reação de síntese de cDNA é usada para cada qPCR.

A reação de síntese de cDNA pode ser iniciada utilizando três tipos de *primers* distintos e ou uma combinação deles. **Oligonucleotídeos (dT)** possuem várias timinas consecutivas (6 a 35) que se anelam às regiões *Poly-A* do RNA ricas em adeninas. Esse *primer* usa o mRNA como molde para obtenção do cDNA que será usado para análise da qPCR. **Hexâmeros aleatórios** servem para síntese de cDNA a partir de qualquer tipo de RNA, especialmente rRNA e tRNA, sendo ideais para RNAs difíceis de serem copiados em sua integridade. **Primers de genes específicos** (*gene-specific primers* - GSPs) contêm a informação complementar ao RNA alvo e são normalmente usados quando apenas uma etapa da *real-time* PCR é realizada. Geralmente recomenda-se o uso de hexâmeros aleatórios ou uma mistura de oligo (dT) e hexâmeros aleatórios para possibilitar uma representação mais homogênea de todos os alvos na amostra e para evitar a polarização 3' do oligo (dT).

**Tabela 2.** Comparativo da reação de qPCR em uma ou duas etapas.

ETAPA ÚNICA	DUAS ETAPAS
Necessita enzima para RT e amplificação	Enzimas usadas separadamente
RT e PCR no mesmo tubo	RT e PCR em tubos separados
Primer específico para RT (GSP)	Primers randômicos e/ou oligo (dT)
Mais rápida	Mais lenta
Menor chance de erro	Maior chance de erro
Menor risco de contaminação	Maior risco de contaminação
Usa todo cDNA sintetizado	Pode usar cDNA em mais de uma reação

A temperatura usada para síntese de cDNA depende da enzima RT escolhida. Usualmente, são utilizadas duas enzimas dessa classe, extraídas de vírus, a AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*) e a M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*).

## 2.2 qPCR DO TIPO MULTIPLEX

Na qPCR do tipo multiplex, usa-se mais de um conjunto de *primers* gene-específicos para amplificar diferentes genes de uma amostra de DNA ou RNA em um único tubo. As reações multiplex são frequentemente utilizadas para amplificar um gene de interesse e um gene de referência, que deve ser expresso constitutivamente (*housekeeping*), por exemplo,  $\beta$ -actina ou GAPDH, e por isso é utilizado como normalizador da reação. Uma vez que mais de um produto de PCR será quantificado no mesmo tubo, diferentes repórteres fluorescentes devem ser usados para marcar os *primers* ou sondas de cada gene durante a amplificação. Em comparação com a *real-time* PCR padrão, a multiplex RT-PCR é mais exigente e pode requerer a otimização de vários parâmetros. Para estudos de expressão relativa (envolvendo qRT-PCR), a concentração de *primers* para o gene de controle interno, ou gene de referência, pode ser inferior à do gene da amostra, para compensar a diferença na abundância dos dois genes. Para facilitar a otimização, devem ser selecionados *amplicons* de tamanhos semelhantes, tanto para o gene de interesse como para o gene de referência. Isso evita a competição a favor de um produto de PCR de menor tamanho. Além disso, a escolha de um gene de referência com um nível de expressão relativamente próximo ao do gene de interesse assegura condições experimentais semelhantes para ambas as metas, mesmo em quantidades limitantes de *primers*.

## 2.3 TERMINOLOGIA DA REAL-TIME PCR

A **quantificação absoluta** descreve uma reação de qPCR em que amostras de quantidades conhecidas, quantificadas em equipamentos específicos como um Nanodrop, por exemplo, são diluídas em série e depois amplificadas na qPCR para gerar uma curva-padrão. Uma amostra desconhecida pode então ser quantificada com base nessa curva.

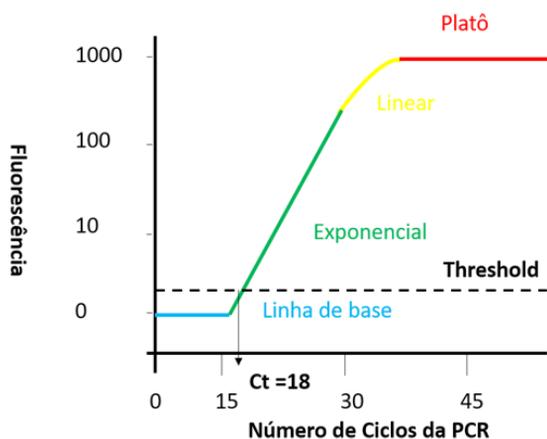
A **quantificação relativa** descreve um experimento de *real-time* PCR em que o gene de interesse em uma amostra (tratada) é comparado com o mesmo gene em outra amostra (não tratada). Os resultados são expressos em função da capacidade de regulação de grupos experimentais distintos, como, por exemplo, maior ou menor expressão do gene de interesse na amostra tratada em relação à não tratada. Para essa quantificação, um gene normalizador, de referência ou *housekeeping gene* deve ser usado como controle da variabilidade experimental. Nesse caso o gene normalizador deve ser expresso em todos os tecidos de interesse, mas cuja expressão gênica não tenha grandes variações entre os tecidos analisados e as condições experimentais.

A **linha de base** da reação de *real-time* PCR refere-se ao nível de sinal durante os ciclos iniciais de PCR, normalmente ciclos 3 a 15, nos quais há pouca alteração no sinal fluorescente. O sinal de baixo nível na linha de base pode ser igualado ao "ruído" da reação (Figura 2). A linha de base da *real-time* PCR é determinada empiricamente para cada reação, por análise do usuário

ou pela análise automatizada do gráfico de amplificação. A linha de base deve ser cuidadosamente ajustada para permitir a determinação precisa do ciclo *threshold* ( $C_t$ ). A determinação da linha de base deve levar em conta ciclos suficientes para eliminar o ruído encontrado nos primeiros ciclos de amplificação, mas não deve incluir os ciclos nos quais o sinal de amplificação começa a subir acima do ruído. Ao comparar diferentes experimentos de *real-time* PCR, a linha de base deve ser definida da mesma maneira para cada experimento.

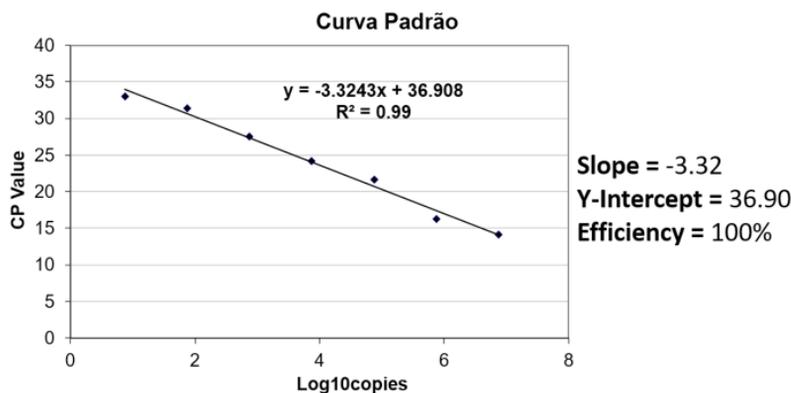
O **limite de detecção (LOD)** é a quantidade mínima de DNA alvo detectada na reação de *real-time* PCR. O LOD é observado no primeiro ciclo de amplificação da amostra, ou seja, quando o nível de sinal reflete um aumento estatisticamente significativo calculado em relação ao sinal da linha de base. Normalmente, o *software* do instrumento define automaticamente o limiar em 10 vezes o desvio-padrão do valor de fluorescência da linha de base. No entanto, o posicionamento da linha pode ser definido em qualquer ponto na fase exponencial da PCR (Figura 2).

O **ciclo *threshold* ( $C_t$ )** é o número do ciclo no qual o sinal fluorescente da reação ultrapassa o limiar. O  $C_t$  é utilizado para calcular o número inicial de cópias de ácido nucleico, porque o valor  $C_t$  é inversamente proporcional ao *log* da quantidade inicial de DNA/RNA da amostra. Por exemplo, ao comparar duas reações de *real-time* PCR, uma com o dobro da concentração de partida da outra, a reação com a quantidade de partida duas vezes maior terá um  $C_t$  com valor menor, pois o ciclo de amplificação ocorrerá mais rapidamente na amostra mais concentrada (Figura 2). Isso pressupõe que a PCR está funcionando com 100% de eficiência (isto é, a quantidade de produto duplica perfeitamente durante cada ciclo) em ambas as reações.



**Figura 2.** Fases da PCR em tempo real. Linha de base = sinal fluorescente que representa ruído da reação. Fase Exponencial = alta eficiência na amplificação. Fase Linear = baixa eficiência. Fase de Platô = não ocorre amplificação.

A **curva-padrão** é estabelecida através de uma série de diluições de amostras com concentrações conhecidas. Ela é utilizada para determinar a quantidade inicial do seu alvo e para avaliar a eficiência da reação (Figura 3). O *log* de cada concentração conhecida na série de diluição (eixo x) é representado em função do valor de  $C_t$  ou CP (pontos de cruzamento) para essa concentração (eixo y). A partir dessa curva-padrão, as informações sobre o desempenho da reação, assim como outros parâmetros (inclinação, interceptação-Y e coeficiente de correlação) podem ser derivados. As concentrações escolhidas para a curva-padrão devem abranger a



**Figura 3.** Curva padrão

concentração esperada do alvo das amostras.

O **coeficiente de correlação ( $R^2$ )** é uma medida que avalia quão bem os dados se encaixam na curva-padrão. O valor  $R^2$  reflete a linearidade da curva-padrão. Idealmente,  $R^2 = 1$ , embora 0,999 seja geralmente o valor máximo.

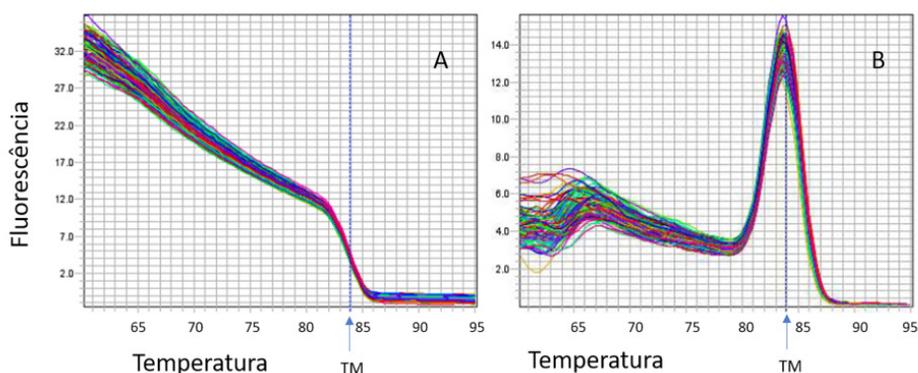
A **intercepção em Y ( $Y$ -intercept)** corresponde ao limite teórico de detecção da reação, ou ao valor de  $C^t$  esperado, se o menor número de cópias de moléculas alvo indicadas no eixo x deu origem à amplificação estatisticamente significativa. Embora a PCR seja teoricamente capaz de detectar uma única cópia de um alvo, 10 cópias é normalmente a menor quantidade de alvo que pode ser quantificado de forma confiável em aplicações de *real-time* PCR. Isso limita a utilidade do valor de intercepção de y como uma medida direta de sensibilidade. No entanto, o valor de intercepção de y pode ser útil para comparar diferentes sistemas de amplificação e alvos.

A **fase exponencial** é usada para quantificar a reação de *real-time* PCR. A quantificação deve ser feita no início da fase exponencial, pois nessa fase todos os reagentes ainda estão em excesso, a DNA polimerase é ainda altamente eficiente, e o produto, que está presente numa quantidade baixa, não compete com a capacidade de anelamento dos primers. Todos esses fatores contribuem para dados mais precisos.

A **inclinação (slope)** na fase log-linear da reação de amplificação é usada para avaliar a eficiência da reação. Para obter resultados precisos e reprodutíveis, as reações devem ter uma eficiência próxima de 100%, equivalente a uma inclinação de -3,32, conforme determinado pela seguinte equação: Eficiência ( $E$ ) =  $10^{(-1 / \text{slope}) - 1}$ . Idealmente, a  $E$  de uma reação de PCR deve ser de 100%, o que significa que a amostra-padrão deve duplicar após cada ciclo, durante a amplificação exponencial. A eficiência real pode dar informações valiosas sobre a reação. Fatores experimentais, como o comprimento, a estrutura secundária e o teor de GC do *amplicon* podem influenciar a eficiência. Outras condições que podem influenciar a  $E$  são a dinâmica da própria reação, o uso de concentrações de reagentes não ótimas e a qualidade da enzima, o que pode resultar em eficiências abaixo de 90%. A presença de inibidores de PCR em um ou mais reagentes pode produzir eficiências superiores a 110%. Uma boa reação deve ter uma eficiência entre 90% e 110%, o que corresponde a uma inclinação entre -3,58 e -3,10.

A **curva de dissociação** representa a alteração na fluorescência quando o DNA de cadeia

dupla (dsDNA) que está ligado a moléculas de corante se dissocia (*melt*), em DNA de cadeia simples (ssDNA) à medida que a temperatura da reação aumenta. Por exemplo, quando o DNA de cadeia dupla ligado ao fluoróforo SYBR® Green I é aquecido, observa-se uma diminuição súbita na fluorescência ao ser atingido o ponto de dissociação ( $T_m$ ), devido à separação das cadeias de DNA e subsequente liberação do fluoróforo. A fluorescência é representada graficamente em função da temperatura (Figura 4A) e, em seguida, o  $-\Delta F / \Delta T$  (variação de fluorescência / variação de temperatura) é representado em função da temperatura para obter uma visão clara da dinâmica de dissociação (Figura 4B). A análise da curva de dissociação pós-amplificação é uma maneira simples e direta de verificar artefatos de dímeros de *primers* e contaminação, garantindo a especificidade da reação de *real-time* PCR e reduzindo a necessidade de eletroforese em gel de agarose. A temperatura de dissociação dos ácidos nucleicos pode ser afetada por diversos fatores: comprimento do amplicon, teor de GC, erros na incorporação de bases, entre outros. Produtos de PCR diferentes podem muitas vezes ser distinguidos por suas características de dissociação.



**Figura 4.** Curva de dissociação ou *Melting curve*. A temperatura de desnaturação ou *Melting Temperature* ( $T_m$ ) é representada na figura; é definida como a temperatura na qual metade das cadeias de DNA estão desnaturadas. Figura adaptada - Manual *Basic principles of Real Time PCR*, Termo Fisher Scientific (2014).

## 2.4 SISTEMAS DE DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DA REAL-TIME PCR

Existem diversas tecnologias de detecção de fluorescência que podem ser aplicadas na *real-time* PCR. Todas são baseadas na geração de um sinal fluorescente que é proporcional à quantidade de produto de PCR formado, mas cada uma possui condições específicas de aplicação no protocolo experimental. O método de detecção desempenha um papel crucial no sucesso da *real-time* PCR.

Os três principais sistemas de detecção de fluorescência são:

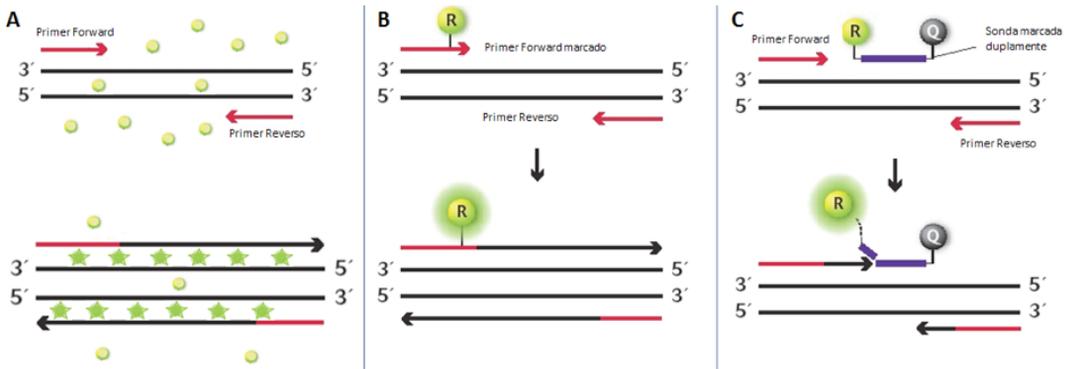
- **Agentes ligantes de DNA** (por exemplo, tecnologias SYBR® Green, SYBR® GreenER™ e MeltDoctor™/SYTO® 9). É o sistema mais comum de detecção de DNA amplificado. Os corantes intercalantes de bases fluorescem quando ligados ao DNA de cadeia dupla (dsDNA). À

medida que o dsDNA se acumula, o corante gera um sinal proporcional à concentração de DNA e pode ser detectado utilizando instrumentos de *real-time* PCR. A intensidade de sinal fluorescente depende da quantidade de dsDNA presente na amostra (Figura 4A). Essa tecnologia, embora simples, requer atenção com a questão da especificidade, porque o corante se liga indiscriminadamente a todos os dsDNA formados durante a *real-time* PCR, não apenas ao DNA alvo. Portanto, artefatos de PCR tais como dímeros de *primers* e produtos de amplificação inespecíficos podem ser detectados e contribuir para o sinal fluorescente global. Um bom desenho de *primers* e um sistema de reagentes de qualidade são fundamentais para evitar a formação desses produtos inespecíficos. No entanto, uma vantagem dos corantes ligantes de DNA é a possibilidade de avaliação da especificidade utilizando a análise da curva de *melting* (Figura 4A).

- **Primers fluorescentes** (por exemplo, *primers* fluorogênicos LUX™ e *primers* qPCR Amplifluor™). Essa tecnologia de detecção de fluorescência fornece detecção altamente sensível e específica de DNA e RNA. Nesses sistemas, o fluoróforo é ligado a um *primer* específico para o alvo, que aumenta a fluorescência quando incorporado ao produto de PCR durante a amplificação. LUX™ *Fluorogenic Primers* são constituídos por uma dupla de *primers* em que um deles não é marcado e o outro é marcado com um único fluoróforo próximo da extremidade 3' numa estrutura em gancho, *hairpin*. Essa configuração efetivamente reprime o sinal fluorescente antes do início da PCR. Quando o *primer* é incorporado num produto de PCR de cadeia dupla, o fluoróforo é liberado, resultando em um aumento significativo no sinal fluorescente (Figura 5B). Os *primers* Amplifluor™ foram concebidos com um fluoróforo e um inibidor no mesmo *primer*. O *primer* adota uma configuração de *hairpin* que com o fluoróforo muito próximo ao inibidor. O sinal fluorescente aumenta quando o *primer* é desdobrado e o fluoróforo e o inibidor são desacoplados durante a incorporação num produto de amplificação.
- **Sondas de hidrólise fluorescentes** (por exemplo, TaqMan®, Scorpions®, *molecular beacons*). Os sistemas baseados em sondas fornecem detecção altamente sensível e específica de DNA e RNA. No entanto, a marcação dupla e a complexidade nas especificações do seu desenho deixaram essa tecnologia mais cara e mais difícil de ser usada do que sistemas baseados em *primers* ou corantes de ligação ao DNA. As sondas TaqMan® requerem um par de *primers* de PCR e uma sonda com um fluorocromo repórter e uma molécula *quencher* que absorve fluorescência emitida pelo repórter. A sonda é desenhada para se ligar à sequência amplificada pelos *primers*. Durante a qPCR, a sonda é clivada pela atividade de nuclease 5' da *Taq* DNA polimerase, liberando o corante repórter que emite um sinal fluorescente que aumenta com cada ciclo (Figura 5C).

## 2.5 COLETA E PRESERVAÇÃO

A coleta de amostras é um dos passos mais importantes de um estudo, portanto é essencial que ocorra de forma a evitar perdas e todas as fontes possíveis de contaminação. Cita-



**Figura 5.** Sistemas de detecção de fluorescência da PCR em tempo real. A. Agentes ligantes de DNA. B. Primers fluorescentes. C. Sondas de hidrólise fluorescente. R = fluorocromo repórter. Q = quencher, molécula que absorve a fluorescência emitida pelo repórter. Figura adaptada - Manual *Basic principles of Real Time PCR*, Termo Fisher Scientific (2014).

mos alguns pontos que merecem atenção do responsável pela coleta: verificar a esterilidade dos materiais como frascos, pinças, ponteiros e demais equipamentos; coletar um volume suficiente de amostra, para o caso de necessidade de repetir ensaios no laboratório; fazer alíquotas e identificação das amostras separadas, para evitar risco de contaminação; acondicionar as amostras de forma imediata e adequadamente após a coleta. No entanto, a estabilidade completa de cada constituinte amostrado é um ponto difícil de ser atingido. Assim, as técnicas de preservação e armazenamento têm por objetivo retardar a ação biológica e a alteração dos compostos químicos; reduzir a volatilidade ou precipitação dos constituintes e os efeitos de adsorção; preservar organismos, evitando ou minimizando alterações morfológicas, fisiológicas e de densidades populacionais, em todas as etapas da amostragem (coleta, acondicionamento, transporte, armazenamento, até o momento do ensaio).

As três principais técnicas de preservação de amostras são: **adição química**, **refrigeração** e **congelamento**. O método de preservação mais conveniente é o químico. Um reagente é adicionado previamente aos ensaios microbiológicos ou imediatamente após a obtenção da amostra, promovendo a estabilização dos constituintes de interesse por um período maior. Contudo, para cada ensaio existe uma recomendação específica. A refrigeração constitui uma técnica comum em trabalhos de campo e pode ser utilizada para preservação de amostras mesmo após a adição química, sendo empregada frequentemente na preservação de amostras para ensaios microbiológicos, físico-químicos orgânicos e inorgânicos, biológicos e toxicológicos. O congelamento é uma técnica aceitável para alguns ensaios e serve para aumentar o intervalo entre a coleta e o ensaio da amostra *in natura*, sem comprometê-la. É inadequada para as amostras cujas frações sólidas (filtráveis e não filtráveis) alteram-se com o congelamento e posterior retorno à temperatura ambiente.

O tratamento e manipulação das amostras de que se pretende extrair o DNA deve ser adaptado a cada tipo de amostra. No entanto, alguns cuidados são gerais, como: manuseio rápido e homogêneo, subdivisão de porções do material de análise, estocagem a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou nitrogênio líquido, e manutenção do congelamento até o momento da extração. Para isolamento de RNA é

importante ressaltar o cuidado para evitar a degradação do material, reduzindo a exposição das amostras às RNases do ambiente, que são encontradas em todo lugar, por exemplo, bancadas, mãos, cabelos, pele, unhas, saliva etc. As RNases são altamente estáveis e suportam condições extremas, tais como temperatura e altas concentrações de sal. Portanto, qualquer item que possa entrar em contato com o RNA deve ser livre de RNase, tratado com inibidores enzimáticos e/ou de RNase. Bancadas, pipetas e vidrarias devem ser descontaminadas com solução de RNaseZAP, por exemplo. Ponteiras, tubos e soluções também devem ser livres de RNase. Recomenda-se a troca das luvas frequentemente, mantendo frascos de reagentes e caixas de ponteiras sempre fechados. Além disso, existem três métodos que podem ser utilizados para inativar imediatamente as RNases endógenas do material de interesse. (1) homogeneizar as amostras imediatamente após a coleta em solução de lise contendo guanidina (solução desnaturante); (2) congelar em nitrogênio líquido pequenos pedaços da amostra; (3) utilizar solução de preservação (RNAlater®). RNAlater® é uma solução aquosa que faz a preservação do tecido amostrado de forma não tóxica, mantendo o RNA estável sem a necessidade de congelar ou processar imediatamente a amostra. Amostras em RNAlater® podem ser estocadas por períodos prolongados em temperatura ambiente ou a 4°C, e por anos a -20°C, fornecendo uma separação espacial e temporal da coleta e processamento sem comprometer a qualidade ou quantidade do RNA amostrado.

## 2.6 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

A extração e purificação de ácidos nucleicos são etapas que merecem muito cuidado, pois a pureza e a integridade de suas moléculas certamente influenciam os resultados finais dos experimentos para os quais se destinam. Antes de iniciar o preparo das amostras é preciso considerar o material de origem, ou seja, o ácido nucleico a ser purificado (DNA, RNA total, mRNA, microRNA) e o material de partida (células ou tecidos de vegetal ou animal, sangue, amostras forenses, bactérias, fungos, leveduras, etc.). As técnicas de isolamento de DNA e RNA variam em sua facilidade de uso, emprego de reagentes orgânicos e eliminação de impurezas como proteínas e solventes orgânicos. Entretanto, os protocolos de extração de ácidos nucleicos seguem basicamente as mesmas etapas, que incluem: (a) coleta, separação e lise do material biológico; (b) separação da solução em fases; (c) precipitação e purificação do produto.

Os métodos clássicos de obtenção de ácidos nucleicos podem ser aplicáveis basicamente em qualquer laboratório. Métodos mais modernos são baseados em kits industrializados e em geral são mais práticos e rápidos. Cada kit de extração comercial possui seu próprio procedimento, mas os kits compartilham o mesmo princípio. A escolha do kit correto é crucial para aperfeiçoar a execução do experimento. Em laboratórios mais sofisticados é possível encontrar extratores de DNA/RNA automatizados, nos quais a amostra primária é colocada no equipamento e todo o processo de extração e amplificação é realizado com pouca dependência de um operador, sendo exemplos: Nuclisens® easyMag (bioMerieux), QIAcube (Qiagen), QIAxtractor (Qiagen), bem como as plataformas fechadas para testes moleculares como m2000 real-time system (Abbott), QIASymphony RGQ (Qiagen) e Cobas® 4800 system (Roche).

### 2.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O princípio das técnicas de extração de DNA consiste basicamente nas etapas de: (i) lise celular, por meio de métodos físicos ou químicos para acesso ao material genético; (ii) centrifugações e uso de detergentes (ex.: SDS) para remoção de lipídeos, membranas e restos celulares; (iii) remoção das proteínas e RNA por meio de enzimas como proteases (pronases e proteinase K) e RNase, respectivamente; (iv) precipitação e eluição da molécula de DNA de interesse.

- **Extração orgânica.** É um método convencional e amplamente utilizado. Ocorre lise das células e centrifugação para remoção dos restos celulares. As proteínas são desnaturadas através de proteases e removidas com solventes orgânicos como fenol, ou uma mistura equimolar de fenol e clorofórmio. Os solventes orgânicos precipitam as proteínas, que são separadas dos polinucleotídeos (DNA e RNA) por centrifugação. Na etapa de purificação normalmente o DNA é recuperado por precipitação utilizando etanol ou isopropanol. Na presença de cátions monovalentes como  $\text{Na}^+$ , e numa temperatura em torno de  $4^\circ\text{C}$ , o etanol absoluto precipita eficientemente o DNA. Outra propriedade da precipitação com etanol é que ele precipita apenas ácidos nucleicos poliméricos e deixa para trás pequenas cadeias ou componentes monoméricos de ácidos nucleicos, incluindo ribonucleotídeos. O DNA precipitado é comumente ressuspensionado em tampão TE ou água Milli-Q autoclavada. As limitações desse método são o uso de solventes orgânicos tóxicos, o tempo de preparo das amostras e a possibilidade da presença de fenol ou clorofórmio residual no DNA extraído, que pode inibir a PCR.
- **Extração em coluna de sílica.** Muito empregada nos kits atuais. O DNA adsorve especificamente a membranas/superfícies/partículas de sílica em presença de certos sais e em um determinado pH. Os contaminantes celulares são removidos por etapas de lavagens e o DNA pode finalmente ser eluído em um tampão com baixa concentração de sal ou em um tampão de eluição. Sais caotrópicos são adicionados para ajudar na desnaturação das proteínas e extração do DNA. Essa tecnologia tem a vantagem de poder ser incorporada em colunas de filtração. É um procedimento simples e rápido (comparado com a extração orgânica) e pode ser automatizado.
- **Extração por separação magnética.** Método baseado na ligação reversível do DNA a uma superfície sólida/grânulo/partícula magnética, revestida com anticorpo de ligação ao DNA ou a grupo funcional que interage especificamente com o DNA. Após a ligação do DNA, as partículas são separadas de outros componentes celulares contaminantes, lavadas, e então o DNA purificado é eluído por extração com etanol. A maior vantagem desse método é ser rápido e poder ser automatizado. No entanto, pode ser mais caro em comparação a outras metodologias já mencionadas.
- **Extração por troca iônica.** Método baseado na interação específica entre fosfatos carrega-

dos negativamente do ácido nucleico e moléculas carregadas positivamente na superfície do substrato. O DNA se liga especificamente ao substrato na presença de baixa concentração de sal, os contaminantes são removidos por etapas de lavagem utilizando tampões com baixa a média concentração de sal, e o DNA purificado é eluído utilizando um tampão com alta concentração de sal. Essa tecnologia é mais empregada em kits de isolamento de plasmídeos.

### 2.6.2 EXTRAÇÃO DE RNA

- **Extração orgânica.** A utilização de fenol é um método muito eficaz para purificar o RNA de uma grande variedade de tipos de células e tecidos. Durante a lise da amostra, o fenol e o isotiocianato de guanidina rompem as células e dissolvem os componentes celulares, mantendo a integridade dos ácidos nucleicos e protegendo-os das RNases. A adição de clorofórmio seguida de centrifugação separa a mistura em uma fase aquosa e uma fase orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa na presença de isotiocianato de guanidina, um sal caotrópico que protege o RNA de RNases endógenas, enquanto a interfase e a fase orgânica retêm o DNA e as proteínas, respectivamente. O RNA é então recuperado da fase aquosa por precipitação com álcool isopropílico. Esse processo é relativamente rápido e pode produzir níveis elevados de RNA, mas requer o uso de substâncias químicas tóxicas e pode resultar em maior aderência de DNA contaminante, em comparação com outras técnicas. A guanidina residual, o fenol ou o álcool também podem reduzir drasticamente a eficiência da síntese de cDNA.
- **Extração por coluna com matriz de sílica.** As amostras são lisadas e homogeneizadas na presença de isotiocianato de guanidina. Após a homogeneização, o etanol é adicionado à amostra que é processada através de um cartucho de rotação. O RNA liga-se à membrana da base de sílica no cartucho de rotação e as impurezas são efetivamente removidas por lavagem. O RNA total purificado é eluído em água. Esse método é ainda menos demorado do que extrações orgânicas e não requer fenol. Os rendimentos totais podem não ser tão altos, mas a pureza no que diz respeito às proteínas, lipídeos, polissacarídeos, DNA e reagentes de purificação é geralmente melhor. A contaminação por guanidina e etanol devido à lavagem incompleta da matriz de sílica pode ainda ocorrer, causando os mesmos efeitos deletérios sobre a eficiência de síntese de cDNA.

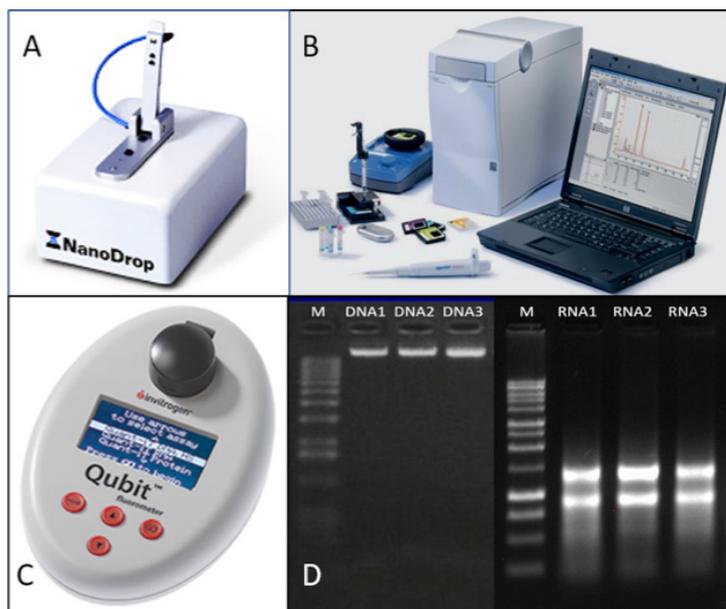
Métodos que utilizam a extração por separação magnética também podem ser aplicados a moléculas de RNA. Além disso, a combinação de métodos diferentes como **lise orgânica** e **colunas de sílica** pode oferecer os benefícios da lise de tecido com a facilidade, velocidade e pureza dos métodos de coluna.

### 2.6.3 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DO ÁCIDO NUCLEICO OBTIDO

Atualmente existem diversas metodologias capazes de avaliar a quantidade e a qua-

lidade do DNA ou RNA extraído (Figura 6). Entre elas citamos o espectrofotômetro, método simples, sensível e amplamente utilizado, que mede e compara a quantidade de luz (radiação eletromagnética) absorvida, transmitida ou refletida por uma determinada amostra, seja ela solução, sólido transparente ou sólido opaco. Um dos equipamentos mais usados é o **Nanodrop®** (Thermo Scientific). O **2100 Bioanalyzer** (Agilent) é um método de eletroforese automatizada, que fornece avaliações de dimensionamento, quantificação e pureza para amostras de DNA, RNA e proteínas. **Qubit™** é um método fluorimétrico baseado na detecção de fluorescência específica do alvo. Este sistema integrado é mais sensível do que a quantificação baseada na absorbância do UV, tornando-o ideal para amostras preciosas e aplicações exigentes. A integridade do DNA ou RNA pode ser também avaliada através de um **gel de agarose** em corrida de eletroforese.

Alguns pontos-chave devem ser avaliados com relação à qualidade dos DNAs ou RNAs obtidos. Para moléculas de DNA, a relação  $A_{260}/A_{280}$  deve estar entre 1,8 e 2,0, enquanto para RNA,  $A_{260}/A_{280}$  deve estar entre 1,9 e 2,0. Uma proporção abaixo de 1,7 pode indicar contaminação proteica, o que pode reduzir a eficiência da reação. Outra importante relação de absorvâncias que deve ser avaliada é  $A_{260}/A_{230}$ ; ela é útil na avaliação de contaminação por componentes que contenham anéis de fenol, tais como o isotiocianato de guanidina e o próprio fenol, que são inibitórios para as reações enzimáticas.



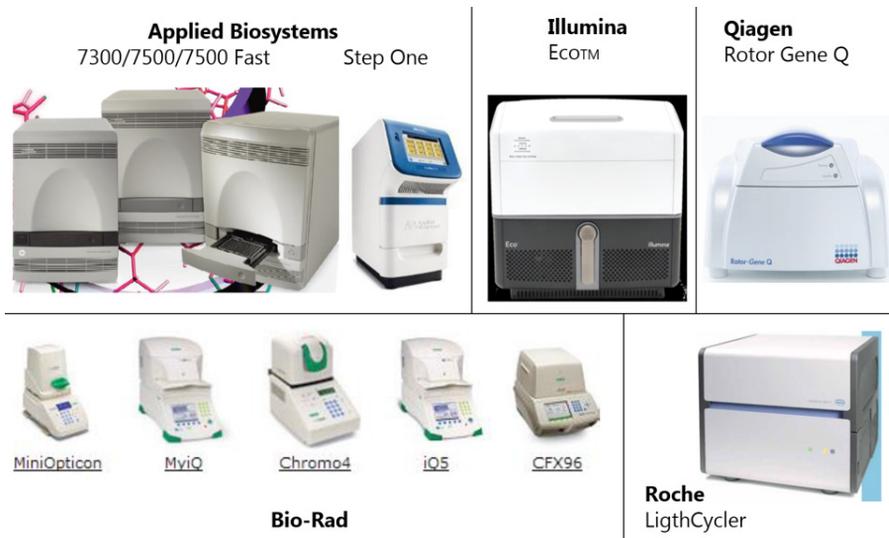
**Figura 6.** Instrumentos de avaliação da quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos extraídos. A. NanoDrop®. B. 2100 Bioanalyzer. C. Qubit™ D. Gel de agarose após corrida de eletroforese.

## 2.7 PLATAFORMAS ANALÍTICAS

A *real-time* PCR vem trazendo um grande impacto nas áreas das ciências biológicas e isso tem sido um estimulador para desenvolver e melhorar os instrumentos existentes. Uma plataforma de *real-time* PCR é constituída por um termociclador, com sistema óptico para emissão de luz e captação da fluorescência emitida pelos fluoróforos, juntamente com um computador e *software* para aquisição e análise de dados. Os sistemas disponíveis diferem em seu design,

nível de sofisticação e tecnologias que proporcionam aos usuários uma gama de opções de equipamentos.

A partir das duas primeiras plataformas comerciais introduzidas em meados da década de 1990, houve uma evolução para dezenas de instrumentos, e a quantidade continua a aumentar (Figura 7). No site da Biocompare, um guia para ciências da vida, encontra-se uma lista com mais de 40 tipos de termocicladores usados em análises de *real-time* PCR (<http://www.biocompare.com/PCR-Real-Time-PCR/22353-Real-Time-PCR-Thermal-Cyclers-Thermocyclers/#products>). Os principais avanços nesses equipamentos incluem maior rapidez nos tempos de termociclagem, maior taxa de transferência, flexibilidade, sistemas ópticos expandidos, multiplexação aumentada, entre outras características como tamanho dos equipamentos, capacidade de processamento das amostras com 2x48 poços, 96 poços ou 384 poços e facilidade na utilização dos *softwares*, que podem variar especialmente na forma de análise e quantificação dos dados computados (pontos de cruzamento - CP - ou níveis limítrofes, *threshold* - C<sup>t</sup>). A escolha do modelo adequado dependerá das características que cada equipamento fornece e das necessidades do usuário.



**Figura 7.** Modelos de plataformas de PCR em tempo real.

Ao ponderar os prós e os contras das diferentes plataformas para o laboratório, os fatores a considerar incluem: química suportada, capacidade de multiplexação para essa química, taxa de transferência, flexibilidade, formato, facilidade de uso e robustez do pacote de *software*, reprodutibilidade, rapidez, tamanho, suporte técnico, suporte ao cliente, e o custo não apenas de aquisição e manutenção do equipamento inicial, mas também o custo associado de consumíveis e reagentes. Os instrumentos de qPCR da Roche nos Estados Unidos variam de cerca de US\$25.000 (LightCycler® 2.0) para quase US\$140.000 (LightCycler® 1536 de ultra-alto rendimento). O preço inicial do QuantStudio™ 3 da Thermo Fisher é de cerca de US\$28.000, enquanto o da QuantStudio™ 12K é de cerca de US\$90.000 (em 2018).

A maioria das plataformas de tempo real usa tecnologia de bloco de aquecimento avançada com base no efeito *Peltier*, para transferir ativamente calor dentro e fora dos tubos plásticos onde ocorrem as reações (por exemplo, ABI 7000, ABI 7900HT, DNA Engine Opticon2, Mx4000, Mx3000P, iCycler IQ™). Os dispositivos *Peltier* transferem o calor de um lado de um semicondutor para outro. A camada isolante de plástico entre o recipiente de reação e o aquecedor produz um atraso térmico adicional. Como consequência disso, as transições de temperatura são relativamente lentas e os blocos devem ser cuidadosamente projetados para minimizar a variação entre os poços do bloco. Outros avanços na tecnologia baseada em *Peltier* incluem a sua combinação com a tecnologia *Joule* resistiva ou convectiva para melhorar o controle e o desempenho da temperatura através do bloco. Atualmente plataformas que empregam tecnologias alternativas de troca de calor permitem taxas de rampa térmica mais rápidas do que blocos, resultando em velocidades de termociclagem significativamente aumentadas. Estes termocicladores podem incluir um sistema controlado por ar estacionário (Roche LightCycler®), um sistema controlado por ar circulante (Qiagen Rotor-Gene), sistema de placa cerâmica com aquecimento de alta condutividade térmica (Cepheid SmartCycler®), um bloco preenchido com fluido térmico condutor agitado por pás eletromagnéticas (Illumina Eco) ou aquecimento direto em combinação com um polímero eletricamente condutor (Biogene InSyte e SynChron). Cada uma dessas técnicas tem suas próprias especificações e é adequada para diferentes propósitos. Por exemplo, o Rotor-Gene consegue equilibrar a 72°C em 0s, em comparação com os 15s requeridos por um bloco padrão de 96 poços, resultando em tempos de execução, em média, 50% mais rápidos. O LightCycler® tem a capacidade de executar mais rapidamente a PCR, enquanto o Rotor-Gene consegue a uniformidade de temperatura.

Quando olhamos para o sistema óptico dos equipamentos de qPCR, encontramos uma gama de opções disponíveis para a fonte de luz de excitação e para o sistema de detecção de emissão fluorescência. As fontes de luz que excitam os fluoróforos podem ser classificadas como de estreito ou largo espectro. Se for utilizada uma fonte de luz de amplo espectro (por exemplo, Mx4000, Mx3000P, iCycler IQ™, ABI 7000), os filtros podem ser utilizados para proporcionar luz sintonizada ao espectro de excitação de um fluoróforo específico. Esse sistema fornece ao usuário uma escolha mais ampla de fluoróforos disponíveis, embora seja melhor selecionar aqueles com boa separação de seus espectros de emissão. Uma desvantagem desse sistema óptico é o fato de que a intensidade da luz que passa através dos filtros pode ser limitada, e isso poderia afetar a sensibilidade da detecção. Atualmente existem duas fontes de luz de espectro estreito usadas em plataformas em tempo real, que podem ser diodos emissores de luz (LEDs); por exemplo LightCycler®, DNA Engine Opticon2, SmartCycler®, Rotor-Gene ou laser (ABI 7900HT). SmartCycler® e Rotor-Gene têm quatro LEDs que excitam em diferentes comprimentos de onda, proporcionando uma maior gama de fluoróforos. A excitação do LightCycler®, DNA Engine Opticon2 e ABI 7900HT é por fonte de luz única, o que limita a escolha de fluoróforos. Em geral, os detectores usados nas plataformas em tempo real são configurados para medir bandas estreitas do espectro, embora conjuntos de filtros possam ser personalizados pelo usuário em equipamentos como iCycler IQ, Mx4000 e Mx3000P. O número de canais de detecção que podem ser efetivos depende da faixa comprimentos de onda disponível para excitação. Já o LightCycler® possui uma fonte de luz de espectro estreito que excita os fluoróforos

SYBR ou fluoresceína, e a luz emitida é coletada através de três detectores ópticos discretos. Dois destes detectam emissões de luz de longo comprimento de onda, oriundas de fluoróforos que são excitados pela tecnologia FRET (fluorescence resonance energy transfer – energia de ressonância transferida por fluorescência). Isto é, um fluoróforo (ex.: fluoresceína) é excitado pela fonte LED de luz azul e por sua vez transfere energia excitando outro fluoróforo (ex.: LightCycler Red 640), que emite numa faixa de comprimento de onda superior.

Características ópticas de uma determinada plataforma podem impactar na capacidade de multiplexar, ou seja, quantas cores fluorescentes diferentes, quantos *amplicons* podem ser detectados simultaneamente por poço, e também determinar quais sistemas de sonda são compatíveis. Os sistemas de *real-time* PCR CFX96 Touch™ e CFX384 Touch da Bio-Rad suportam seis e cinco canais fluorescentes, respectivamente; o Rotor-Gene suporta também seis canais de cores; os sistemas QuantStudio da Thermo suportam de 4 até 21, dependendo da configuração do sistema, devido a um conjunto configurável de seis LEDs e uma roda rotativa de filtros de excitação e emissão.

Diversos sistemas de qPCR usam uma tela sensível ao toque ou um computador conectado para programar as análises, porém diferem no número de usuários e protocolos que podem ser armazenados, facilidade de programação, quantidade de armazenamento de dados a bordo, mecanismos de monitoramento remoto e *upload* de dados para uma nuvem. Os sistemas QuantStudio 3 e QuantStudio 5 da Thermo Fisher incluem conectividade wi-fi, enquanto os 6 Flex, 7 Flex e 12K Flex não o fazem, mas todos os sistemas QuantStudio podem carregar dados para o Thermo Fisher Cloud (uma plataforma gratuita de análise de dados e armazenamento). O LightCycler® 96 da Roche possui uma tela sensível ao toque incorporada, enquanto o LightCycler® 2.0, LightCycler® 480 e LightCycler® 1536 requerem um computador externo. E o SureCycler 8800 controlado pela tela sensível ao toque da Agilent Technologies, como algumas outras plataformas, permite o monitoramento de reação remota. Alguns sistemas de PCR incluem a atualização limitada em relação ao formato do bloco de amostras, mas alguns sistemas também podem ser atualizados de outras maneiras. O QuantStudio 6 pode ser atualizado para um QuantStudio 7, por exemplo – uma mudança que adiciona suporte para placas de matriz TaqMan® da Thermo Fisher e aumenta os recursos de multiplexação de cinco cores para 21.

### 3 | CONCLUSÕES

A tecnologia *real-time* PCR é específica, eficiente, sensível, rápida e mais econômica que a maioria das ferramentas alternativas para aplicações que requerem certificação, no monitoramento e controles de rotina e para emprego em larga escala. A relação custo-benefício vantajosa e competitiva se evidencia pelas estimativas de custo por amostra, que pode ser tão reduzido quanto U\$10-20. Pode ser empregada em todas as etapas da cadeia produtiva: desde as sementes, quando é requerida a captura de larvas e/ou juvenis diretamente do ambiente, durante todos os estágios do ciclo de vida em regime de cultivo, até os produtos que chegam ao consumidor final. Para seu máximo aproveitamento é necessária uma avaliação criteriosa das

plataformas e químicas disponíveis, tendo em vista o(s) objetivo(s) e questões possivelmente menos evidentes como atenção ao cliente e assistência técnica. Pode ser interessante contar com a expertise de usuários experientes na etapa de aquisição da plataforma. Para a operação rotineira, a maioria dos fabricantes oferece treinamento em suas próprias unidades científicas. Não convém dispensar esse investimento de tempo. Sem dúvida uma das etapas críticas para o sucesso, senão a crucial, é a padronização da ferramenta. É pré-requisito o pleno acesso aos bancos públicos de sequências, tais como o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o BOLD (*The Barcode of Life Data System*, [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)). Os bancos mundiais são abrangentes, porém podem apresentar lacunas e, eventualmente, incorreções na identificação de uma parcela das sequências, uma vez que os depósitos são provenientes das mais variadas origens ao redor do mundo, portanto convém a manutenção de um banco local, privado, público ou em regime de parceria. Os bancos locais abarcam a diversidade regional e os interesses dos grupos mantenedores. A especificidade da tecnologia é totalmente dependente da escolha do alvo na molécula de DNA. A região deve ser conservada no grupo taxonômico de interesse e ao mesmo tempo apresentar divergência entre os organismos que se pretende distinguir, no nível de espécie ou de linhagem, dependendo do objetivo. Além disso, independentemente de o alvo ser DNA nuclear ou mitocondrial, gene informacional, *housekeeping* (gene de manutenção), codificador de proteína específica ou região não codificadora, é mister sua representatividade nos bancos, especialmente dentre os grupos taxonômicos de interesse. Durante a validação da ferramenta, os testes alternativos tradicionais devem ser realizados em paralelo para garantia da acurácia e de que não haja resultados conflitantes em comparações interlaboratoriais. Como muitos desses testes dependem de tecidos ou células dos organismos, é importante utilizar tecidos ou material celular tipo (*type*) na padronização. Também com o objetivo de validação, é fundamental o sequenciamento dos produtos da *real-time* PCR, para comprovação prévia da acurácia antes da implementação e/ou divulgação da ferramenta.

## 4 | PERSPECTIVAS

O diagnóstico e a autenticação vêm se beneficiando das vantagens da tecnologia *real-time* PCR especialmente nas aplicações cujo investimento seja proporcional ao prejuízo potencial, como nas indústrias da aquicultura e de frutos do mar. Um exemplo ilustrativo é a virose WSD, causada pelo WSSV (Tabela 1), principal doença infecciosa que afeta a aquicultura de camarão em âmbito global, responsável por prejuízos anuais da ordem de bilhões de dólares e para a qual é obrigatória a notificação. Foi um dos primeiros protocolos *real-time* PCR para diagnóstico a ser descrito (no âmbito da aquicultura), é altamente específico, extremamente sensível (4 cópias) e a faixa dinâmica é extensa (7 logs). No entanto, em muitas situações as análises são tempo-dependentes e o ideal seria sua realização *in loco* (*on-site, in-field*). Na autenticação de frutos do mar, por exemplo, testar amostras pré-processadas (ex.: filetadas) dentro das embarcações seria uma contribuição relevante não somente para iniciativas como o PSMA. Detectar a fraude no ponto da cadeia de suprimento mais próximo de onde foi praticada

(*point-of-origin-identification*) é uma estratégia que pode impedir sua amplificação e, no exemplo citado, coibir a pesca IUU. No âmbito da aquacultura, os testes *in loco* podem otimizar a captura de sementes e juvenis do ambiente, nos casos em que não é possível cultivar os organismos em todos os estágios do seu ciclo de vida. São inúmeros os exemplos de casos que se beneficiariam dessa modalidade. De fato, ela já existe, tendo sido inicialmente desenvolvida pela Cepheid (Sunnyvale, CA, EUA) para detecção de patógenos humanos e em seguida utilizada para detecção de patógenos de plantas. Outras plataformas foram implementadas e geralmente os fabricantes também disponibilizam sistemas comerciais miniaturizados e liofilizados para a extração do DNA e para a reação de *real-time* PCR, de manuseio viável e simples no campo. A Biomeme® (Filadélfia, EUA) vem divulgando sua plataforma Two-Three™ (two3) para aplicação na autenticação de frutos do mar. O dispositivo pesa menos de 500g, tem o tamanho de uma lata de refrigerante, é alimentado por bateria e o duo software-notebook foi substituído por um aplicativo para iPhone, em cuja tela os ensaios são controlados e visualizados. O dispendioso bloco Peltier foi substituído por um ventilador para resfriamento, e reações eletrotérmicas que ocorrem na superfície de montáveis similares aos utilizados em eletrônicos facultam o aquecimento. A fabricante oferece ainda reagentes liofilizados e consumíveis para a extração de DNA em 5-10 minutos sem uso de centrifuga e promete que o ensaio *real-time* específico e todo o fluxo de procedimentos é viável em menos de 90 minutos. A estreia na comercialização se deu em parceria com a reconhecida Smith-Root (Vancouver, WA, EUA), especializada em tecnologia para a conservação relacionada à pesca e aquacultura. Juntas desenvolveram todo o ferramental para obtenção de DNA ambiental a partir de água e sistemas miniaturizados para detecção de espécies aquáticas, incluindo micróbios, em amostras de água. A Smith-Root se encarregou do sistema de obtenção de DNA ambiental, ANDe™, incluindo o sistema de filtração para grandes volumes de água no qual a bomba é uma mochila com sensor e um compartimento para consumíveis secos, contando com uma extensão ou polo coletor para amostragem sem entrada de água e com filtros descartáveis pré-instalados. Os kits para detecção de DNA ambiental em amostras obtidas por filtração de água ficaram por conta da Biomeme®. Estão disponíveis para detecção de espécies consideradas invasoras em diversos países, as carpas da cabeça-grande e prateada (*bighead*, *Hypophthalmichthys nobilis*; e *silver*, *H. molitrix*), lucrativas na aquacultura e introduzidas amplamente fora da Ásia, o caracol-da-lama da Nova Zelândia (*New Zealand mudsnail*, *Potamopyrgus antipodarum*), e a lampreia marinha ou peixe-vampiro (*sea lamprey*, *Petromyzon marinus*); da salamandra gigante *hellbender* (*Cryptobranchus alleganiensis*), classificada pela IUCN como “em vias de estar ameaçada” (*Near Threatened* – NT), e da carpa-capim ou do limo (*grass carp*, *Ctenopharyngodon idella*), que é a espécie com maior produção anual (5 milhões de toneladas) em escala mundial já reportada em aquacultura. Para os micro-organismos, estão disponíveis kits específicos para *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium columnare*, *F. psychrophilum*, *Edwardsiella ictaluri*, *Neoparamoeba perurans* e *Tenacibaculum maritimum*. Apesar de estarem associados a doença renal bacteriana, columnariose, doença bacteriana da água fria, doença da septicemia entérica, doença amebiana das guelras, e tenacibaculose, respectivamente, os kits são destinados ao monitoramento ambiental da água e não para diagnóstico animal. Todo o fluxo de trabalho se resume a filtração, extração de DNA dos filtros, detecção e análise dos dados. Outra estratégia de lançamento foi a da

Ubiquitome (© 2017 Ubiquitome Limited, Nova Zelândia), que abriu concorrência para laboratórios de pesquisa disputarem auxílio e ferramental para testarem com amostras próprias a plataforma móvel *Freedom4*. Essa versão de *real-time* portátil pesa 2,4kg e mede 20 x 10 x 8,5cm, é alimentada por bateria, usa bloco *Peltier* para 4 poços, permite uso de *Sybr* e *Taqman*, e é controlada tanto com software-notebook via USB, quanto com aplicativo para iPhone via *bluetooth*. Os três vencedores que usaram a tecnologia contam com seus achados publicados como *application notes* no portal da empresa, dentre os quais “A performance do *Freedom4* para detecção de *Pseudo-nitzschia australis*” (*Performance of the Freedom4 for detection of Pseudo-nitzschia australis*). *Pseudo-nitzschia* spp. são causadoras de HABs e produzem a neurotoxina ácido domoico, que pode ser letal. Pesquisadores do *Monterey Bay Aquarium Research Institute* (MBARI) testaram o *Freedom4* para detecção da espécie mais tóxica na Baía de Monterey (Califórnia, EUA). A performance foi comparável com a de uma plataforma de bancada convencional (*Light Cycler*® 480, Roche, Suíça) e considerada compatível para uso nas embarcações do MBARI. O LOD foi de  $10^4$  cópias do alvo (na região intergênica entre as subunidades do RNAr ITS1-5, 8S-ITS2) por reação de 25µL com ambos os dispositivos. O ideal da Ubiquitome, tornar a análise genética uma ferramenta de diagnóstico ubíqua, parece estar em vias de se concretizar, e possivelmente por meio de diversas tecnologias que estão viabilizando a *real-time* PCR na palma da mão.

## 5

## OPORTUNIDADES E DESAFIOS

Os avanços tecnológicos para execução da *real-time* PCR vêm se sobrepondo desde que a ferramenta foi implementada. No atual mundo globalizado as inovações são disponibilizadas com velocidade digital, o que não é verdade para os países que não integram o grupo seleto dos desenvolvidos, no que tange ao acesso aos equipamentos e periféricos. No entanto, atividades como pesca, aquacultura, consumo de frutos do mar, e igualmente patógenos e toxinas formam uma teia global de relações que alcança praticamente todos os pontos do planeta. Nesse plano de fundo, o desafio comum a todas as aplicações da *real-time* PCR, especialmente na biotecnologia marinha, é a inexistência de padronização e harmonização nas práticas, mesmo se consideradas regiões de acordo comercial, como é o caso da União Europeia. Uma iniciativa nesse sentido é o Manual de Testes Diagnósticos para Animais Aquáticos da OIE, porém sua abrangência (34 doenças) é modesta. Para a indústria de frutos do mar, com uma lista de 1700 espécies, parece praticamente impossível harmonizar as práticas de autenticação e detecção, o que pode resultar em questões legais e prejuízos financeiros e ecológicos. Em âmbito nacional existem iniciativas bem-sucedidas na Europa. O *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS, <http://www.fapas.com>) conta com 2000 participantes em 100 países, porém os esquemas incluem testes usando química analítica (ex.: teor de mercúrio). O interessante é que envolve testes de amostras cegas, o que pode inspirar uma diretriz aos órgãos de acreditação. A Alemanha lançou mão do *German Food and Feed Act* (§64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch) para desenvolver um conjunto de métodos standard oficiais sob a coordenação

a coordenação do *Federal Office of Consumer Protection and Food Safety* (BVL; <http://www.bvl.bund.de>). Para aplicações da *real-time* PCR em biotecnologia marinha, a constituição de uma rede transnacional de laboratórios de referência pode se beneficiar da familiaridade e expertise dos integrantes com as espécies locais, bem como viabilizar a construção e manutenção de bancos de sequências de interesse. A iniciativa privada pode ser uma aliada importante, com ressalvas. A independência na condução da pesquisa e avaliação dos resultados deve ser preservada e os interesses públicos locais devem merecer destaque dentre os objetivos, de modo que aplicações com maior impacto econômico não inviabilizem aquelas de interesse público para as comunidades locais, seja na saúde, na segurança alimentar ou ambiental. De outro modo, produtos e commodities que resultem em lucros vultosos podem capitalizar os investimentos, deixando negligenciados a detecção e o diagnóstico de patógenos e toxinas cujo impacto seja observado regionalmente em função das preferências de consumo e/ou do nível de desenvolvimento, condições sanitárias e preservação do meio ambiente. A tecnologia e a inovação precisam avançar respeitando a ética e sem prevalecer os interesses econômicos, para que em última análise resultem em meios de reduzir diferenças e ampliar o bem-estar social.

## REFERÊNCIAS

- Agnew, D.J.; Pearce, J.; Pramod, G.; Peatman, T.; Watson, R. et al. (2009) Estimating the Worldwide Extent of Illegal Fishing. **PLoS ONE**. 4(2): e4570.
- Alonso, M.; Lago, F.C.; Gomez-Reino, M.; Fernandez, J.; Martin, I.; Vieites, J.M.; Espineira, M. (2013) Fast Real-time PCR assay for detection of *Tetramicra brevifilum* in cultured turbot. **Parasitology**. 140(3): 338-342.
- Naaum, A.M.; Hanner, R.; Newmaster, S. (2017) On-site DNA testing for species authenticity in food and natural health products. **Food Integrity 2017 Conference**. Parma, Italy 10-11 May 2017. Book of Abstracts, p34.
- Antonella, P.; Luca, G. (2013) The quantitative real-time PCR applications in the monitoring of marine harmful algal bloom (HAB) species. **Environmental Science and Pollution Research**. 20(10): 6851-6862.
- Arya, M.; Shergill I.S.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N.; Patel, H.R.H. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. 5:209-219.
- Barra, G.B.; Caixeta, M.; Costa, P.G.G.; Sousa, C.F.D.; Velasco, L.F.R. (2011) Diagnóstico molecular: passado, presente e futuro. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Rio de Janeiro, 43(3): 254-260.
- Brandão, C.J.; Botelho, M.J.C.; Sato, M.I.Z.; Lamparelli, M.C. (2011) **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB.
- Brock, T.D.; Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. **Journal of Bacteriology**. 98(1): 289-297.
- Bruce, K.L.; Leterme, S.C.; Ellis, A.V.; Lenehan, C.E. (2015) Approaches for the detection of harmful algal blooms using oligonucleotide interactions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 407(1): 95-116.
- Chien, A.; Edgar, D.B.; Trela, J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. **Journal of Bacteriology**. 127(3): 1550-1557.
- Dalama, J.; Vieites, J.M.; Espiñeira, M. (2015) Detection of the causal agents of keriorrhea (*Lepidocy*

*bium flavobrunneum* and *Ruvettus pretiosus*) by means of Real Time PCR. **Food Chemistry**. 174: 326-329.

Durand, S.V.; Lightner, D.V. (2002) Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases**. 25(7): 381-389.

Espiñeira, M.; Vieites, J.M. (2012) Rapid method for controlling the correct labeling of products containing common octopus (*Octopus vulgaris*) and main substitute species (*Eledone cirrhosa* and *Dosidicus gigas*) by fast real-time PCR. **Food Chemistry**. 135(4): 2439-2444

Espiñeira, M.; Vieites, J.M. (2016) Genetic system for an integral traceability of European eel (*Anguilla anguilla*) in aquaculture and seafood products: authentication by fast real-time PCR. **European Food Research and Technology**. 242(1): 25-31.

FAO. 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome. 200 pp.

Ferrantelli, V.; Giangrosso, G.; Cicero, A.; Naccari, C.; Macaluso, A. et al. (2012) Evaluation of mercury levels in *Pangasius* and cod fillets traded in Sicily (Italy). **Food Additives & Contaminants**. 29(7): 1046-1051.

GAO, U.S. Government Accountability Office. (2009) **Seafood fraud – FDA program changes and better collaboration among key federal agencies could improve detection and prevention**.

Golden, R.E.; Warner, K. (2014) **The global reach of seafood fraud: a current review of the literature**. Oceana, Washington, D. C., USA. [online] URL: [https://usa.oceana.org/sites/default/files/seafood\\_fraud\\_map\\_white\\_paper\\_new\\_0.pdf](https://usa.oceana.org/sites/default/files/seafood_fraud_map_white_paper_new_0.pdf).

Griffiths, A.M.; Sotelo, C.G.; Mendes, R.; Pérez-Martín, R.I.; Schröder, U.; Shorten, M.; ... Mariani, S. (2014) Current methods for seafood authenticity testing in Europe: is there a need for harmonisation? **Food Control**. 45: 95-100.

Helyar, S.J.; Lloyd, H.D.; de Bruyn, M.; Leake, J.; Bennett, N.; Carvalho, G.R. (2014) Fish product mislabelling: failings of traceability in the production chain and implications for illegal, unreported and unregulated (IUU) fishing. **PLoS ONE**. 9(6): e98691.

Herrero, B.; Madriñán, M.; Vieites, J.M.; Espiñeira, M. (2010) Authentication of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using real time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(8), 4794-4799.

Herrero, B.; Vieites, J.M.; Espiñeira, M. (2011) Authentication of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using real-time PCR. **Food Chemistry**. 127(3): 1268-1272.

Herrero, B.; Lago, F.C.; Vieites, J.M.; Espiñeira, M. (2011) Authentication of swordfish (*Xiphias gladius*) by RT-PCR and FINS methodologies. **European Food Research and Technology**. 233(2): 195-202.

Herrero, B.; Lago, F.C.; Vieites, J.M.; Espiñeira, M. (2011) Development of a rapid and simple molecular identification methodology for true sardines (*Sardina pilchardus*) and false sardines (*Sardinella aurita*) based on the real-time PCR technique. **European Food Research and Technology**. 233(5): 851.

Herrero, B.; Vieites, J.M.; Espiñeira, M. (2011) Duplex real-time PCR for authentication of anglerfish species. **European Food Research and Technology**. 233(5): 817.

Herrero, B.; Lago, F.C.; Vieites, J.M.; Espiñeira, M. (2012) Rapid method for controlling the correct labeling of products containing European squid (*Loligo vulgaris*) by fast real-time PCR. **European Food Research and Technology**. 234(1): 77-85.

Herrero, B.; Lago, F.C.; Vieites, J.M.; Espiñeira, M. (2012) Real-time PCR method applied to seafood products for authentication of European sole (*Solea solea*) and differentiation of common substitute species. **Food Additives & Contaminants: Part A**. 29(1): 12-18.

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of

DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**. 11(9): 1026-1030.

Huggett, J.F.; O'Grady, J. (Ed.). (2014) **Molecular diagnostics – current research and applications**. Caister Academic Press, 270 pp.

Kralik, P.; Ricchi, M. (2017) A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, 8.

Kleppe, K.; Ohtsuka, E.; Kleppe, R.; Molineux, I.; Khorana, H.G. (1971) Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. **Journal of Molecular Biology**, 56(2): 341-361.

Logan, J.M.; Edwards, K.J.; Saunders, N.A. (Eds.). (2009) **Real-time PCR: current technology and applications**. Horizon Scientific Press.

Mackay, I.M. (Ed.). (2007) **Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization**. Horizon Scientific Press.

Martin Fillion (Ed.). (2012) **Quantitative real-time PCR in Applied Microbiology**. Horizon Scientific Press.

Marx, V. (2015) PCR heads into the field. **Nature Methods**. 12(5): 393-397.

Palmeira, C.A.M.; Rodrigues-Filho; L.F.S.; Sales, J. B.L.; Vallinoto, M.; Schneider, H.; Sampaio, I. (2013) Commercialization of a critically endangered species (largetooth sawfish, *Pristis perotteti*) in fish markets of Northern Brazil: Authenticity by DNA analysis. **Food Control**. 34: 249-252.

Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.K.; Horn, G.T.; Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. In: **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology** (51: 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mullis, K.B.; Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**. 155: 335-350.

Murray, S.A.; Wiese, M.; Stüken, A.; Brett, S.; Kellmann, R.; Hallegraeff, G.; Neilan, B. A. (2011) sxtA-based quantitative molecular assay to identify saxitoxin-producing harmful algal blooms in marine waters. **Applied and Environmental Microbiology**. 77(19): 7050-7057.

Naaum, A. M.; Warner, K.; Mariani, S.; Hanner, R. H.; Carolin, C. D. (2016) **Seafood mislabeling incidence and impacts**, Chapter 1. Seafood authenticity and traceability: a DNA-based perspective, pp. 3-26.

Navarro, E.; Serrano-Heras, G.; Castaño, M.J.; Solera, J. (2015) Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**. 439: 231-250.

Northrup, M.A.; Bennett, B.; Hadley, D.; Landre, P.; Lehew, S.; Richards, J.; Stratton, P. (1998) A miniature analytical instrument for nucleic acids based on micromachined silicon reaction chambers. **Analytical Chemistry**. 70(5): 918-922.

OIE (Office International des Epizooties). (2009a) **Aquatic Animal Health Code**, 12th ed. Office International des Epizooties, Paris, France.

OIE (Office International des Epizooties). (2009b) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal Diseases, 6th ed. **Office International des Epizooties**, Paris, France.

Oliveira, T.M.D.S. (2010) **PCR em tempo real: métodos e aplicações** (Master's thesis, Universidade de Aveiro).

Ostermaier, V.; Kurmayer, R. (2010) Application of real-time PCR to estimate toxin production by the cyanobacterium *Planktothrix* sp. **Applied and Environmental Microbiology**. 76(11): 3495-3502.

Pauly D.; Christensen, V.; Guénette, S.; Pitcher, T.J.; Sumaila, U.R. et al. (2002) Towards sustainability in world fisheries. **Nature**. 418: 689-695.

Pearson, L.A.; Neilan, B.A. (2008) The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. **Current Opinion in Biotechnology**. 19(3): 281-288.

Pfaffl, M.W. (2004) Quantification strategies in real-time PCR. Chapter 3: 87-112. In: **A-Z of quantitative PCR** (Editor: S.A. Bustin). International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA.

Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. 230(4732): 1350-1354.

Saunders, N.A.; Lee, M.A. (Eds.). (2013) **Real-time PCR: advanced technologies and applications**. Horizon Scientific Press.

Schaad, N.W.; Opgenorth, D.; Gaush, P. (2002) Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. **Phytopathology**. 92(7): 721-728.

Thermo Fisher Scientific. (2014) **Real Time PCR handbook**. 3rd. ed. 6 chapt., 68p. <https://www.thermo-fisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education.html>

Ubiquitome Application Note. **Performance of the Freedom 4 for detection of Pseudo-nitzschia australis**. [http://insights.ubiquitomebio.com/hubfs/Content/Application%20notes/Ubiquitome\\_GrantFinal\\_Combined.pdf](http://insights.ubiquitomebio.com/hubfs/Content/Application%20notes/Ubiquitome_GrantFinal_Combined.pdf)

Wong, M.L.; Medrano, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**. 39(1): 75-88.





# BIODIVERSIDADE DE INVERTEBRADOS MARINHOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Carlos Daniel Pérez<sup>a</sup>

Ralf T. S. Cordeiro<sup>b</sup>

Liany F. de A. Melo<sup>a</sup>

Érica Patrícia Lima<sup>a</sup>

Thaynã Cavalcanti<sup>a</sup>

Ulisses Pinheiro<sup>a</sup>

Paula Braga Gomes<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Pernambuco

<sup>b</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco

## RESUMO

O ambiente marinho apresenta potencialmente uma enorme reserva de biodiversidade que pode ser explorada de maneira sustentável, como fonte de recursos renováveis, incluindo diversos alimentos e produtos naturais. Os invertebrados constituem um grupo diversificado tanto do ponto de vista taxonômico quanto ecológico. A diversidade de habitats e formas de vida contribui para uma grande diversidade química e molecular, resultando no elevado potencial biotecnológico dos invertebrados marinhos. Para sobreviver, precisam desenvolver a capacidade de produzir compostos tóxicos ou obtê-los por meio de associação com micro-organismos simbiotes. As moléculas bioativas produzidas por invertebrados e seus simbiotes podem ser empregadas em diversas aplicações biotecnológicas. A enorme quantidade de moléculas isoladas e inéditas demonstra o potencial de invertebrados marinhos como fonte de novos medicamentos, com aplicações no tratamento do câncer, inflamação, do HIV, de doenças neurodegenerativas, entre outras. Mas os ambientes marinhos estão ameaçados, principalmente como resultado da sobre-exploração, poluição e impactos diretos e indiretos das mudanças climáticas. Portanto, são necessárias ações imediatas para a proteção da diversidade biológica marinha.

# 1 | INTRODUÇÃO

A definição clássica de biodiversidade, adotada pela Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), abrange a variabilidade de organismos incluindo a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas. Populações e espécies são as unidades evolutivas básicas, que interagem entre si no tempo e no espaço. O conjunto de espécies e suas relações formam os ecossistemas, moldados pelas interações com o ambiente abiótico.

Desde que a vida surgiu na Terra, inúmeras espécies surgiram e desapareceram. Atualmente são conhecidas cerca de 1,5 milhões delas, mas estima-se que existam entre 5 e 8 milhões. Toda essa diversidade teve origem a partir de processos evolutivos que abrangeram o planeta (tectônica de placas, mudanças climáticas, oscilações no nível do mar, catástrofes naturais), os ecossistemas (alterações ambientais), as espécies (seleção natural, extinções, especiações) e os genes (recombinações, mutações, deriva gênica). A diversidade, porém, não está igualmente distribuída entre os táxons e ao longo do planeta. De todas as espécies descritas, cerca da metade pertence à classe Insecta, sendo a maioria besouros (ordem Coleoptera). Em termos geográficos, existe um padrão global de distribuição de biodiversidade que é maior nas zonas tropicais, diminuindo em direção aos polos. O Brasil detém de 10% a 20% da diversidade conhecida; junto com outros 16 países, abriga cerca de 70% da biodiversidade mundial, formando o chamado território de megadiversidade.

O ambiente marinho apresenta potencialmente uma enorme reserva de biodiversidade que pode ser explorada de maneira sustentável, como fonte de recursos renováveis, incluindo diversos alimentos e produtos naturais. Apesar disso, o esforço empregado para o conhecimento dos táxons marinhos tem sido modesto em comparação ao dedicado ao ambiente terrestre, e isso reflete em um conhecimento relativamente menor da diversidade marinha. Os oceanos cobrem cerca de 70% da superfície do planeta e são o local de nascimento da vida na Terra. Segundo as estimativas, o mar apresenta apenas 20% de todas as espécies animais, no entanto tem representantes de 90% ou mais de todas as classes e filos existentes. Basta lembrar que, dos 35 filos animais, só um, o filo Onychophora, não possui representantes marinhos.

Classificações modernas dos seres vivos reconhecem três domínios: Bacteria (inclui bactérias e cianobactérias), Archaea (arqueobactérias) e Eukarya. Os organismos eucariontes incluem os reinos Protista, Plantae, Fungi e Animalia. O último reino domina, sendo composto por cerca de 73% das espécies já descritas e cerca de 35,9% dos filos conhecidos. Dentre os animais, em torno de 97% são invertebrados. Na realidade, ainda que amplamente utilizado, o termo "invertebrado" não pode ser tomado como um táxon ou clado verdadeiro, já que é um grupo polifilético que reúne organismos que não possuem nem desenvolvem uma coluna vertebral derivada do notocórdio, característica definidora do subfilo Vertebrata; não ocupa, dessa maneira, nenhum nível hierárquico na classificação. O sucesso e diversificação dos invertebrados se devem a vários fatores, como: a) seu tamanho reduzido, favorecendo a exploração de micro-habitats e o compartilhamento de nichos; b) o uso e compartilhamento de diferentes nichos contri-

buíram para a elevada variedade de formas, hábitos e estratégias adaptativas, resultando em elevada diversidade; c) a antiguidade do grupo, já que os primeiros invertebrados marinhos apareceram há cerca de 600 milhões de anos, tendo se diversificado e evoluído ao longo deste tempo; d) elevada biomassa, já que, em geral, têm tamanho reduzido mas são extremamente numerosos; e) ciclos biológicos curtos, acelerando mecanismos adaptativos e evolutivos.

Os invertebrados constituem um grupo diversificado tanto do ponto de vista taxonômico, quanto ecológico. No ambiente marinho estão representados por organismos que habitam todos os espaços desse ambiente tridimensional. Essa diversidade de habitats, formas de vida e táxons contribui para uma grande diversidade química e molecular, resultando no elevado potencial biotecnológico dos invertebrados, em especial marinhos.

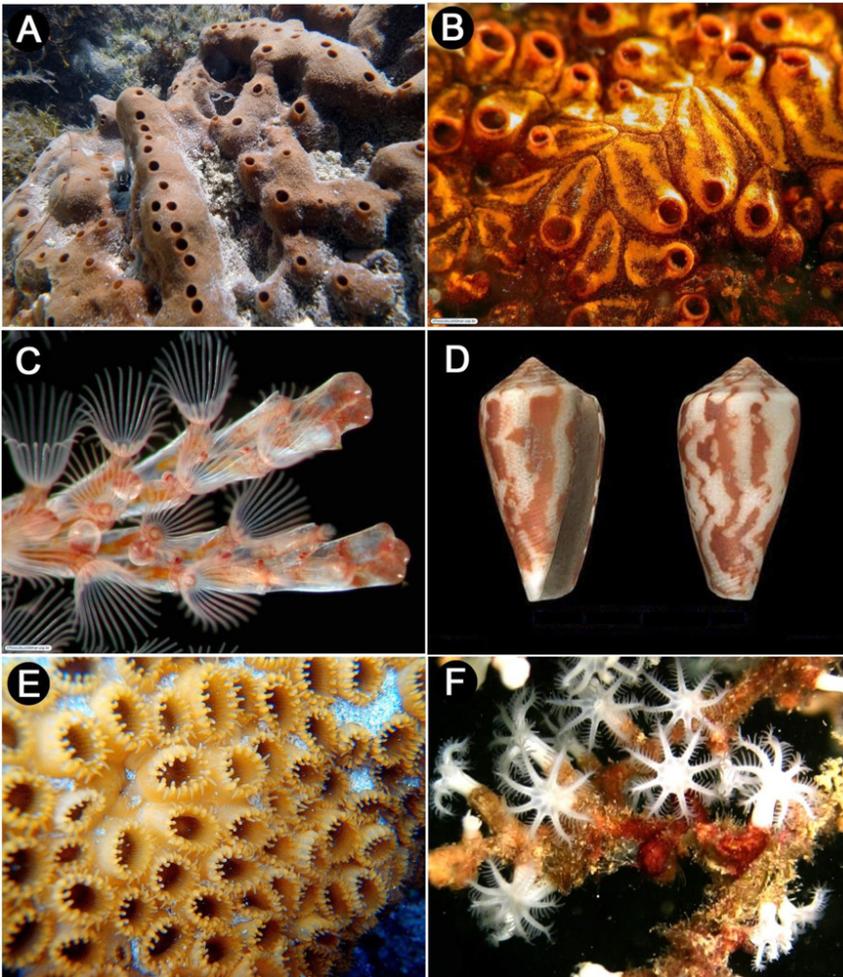
## 2 | OS INVERTEBRADOS E O AMBIENTE MARINHO

Ao longo do tempo os invertebrados desenvolveram vários mecanismos físicos e químicos para superar condições ambientais severas, incluindo radiação, salinidade, pressão e ameaças de origem biológica (predatismo, doenças etc.). Algumas das estratégias de sobrevivência mais complexas podem ser encontradas nos invertebrados marinhos bentônicos. Organismos bentônicos são aqueles intimamente relacionados com o fundo (substrato), dependendo deste para viver ou apenas para se alimentar e/ou reproduzir. Essa relação estreita com o substrato exige o desenvolvimento de adaptações específicas com diferentes funções: fixação, escavação, locomoção, defesa, entre outras.

Esses animais interagem continuamente com um grande número de micro e macro-organismos e, portanto, precisam se defender de patógenos e predadores, além de competir pelo espaço, luz e nutrientes. Essa luta torna-se ainda mais difícil para os organismos sésseis ou fixos, que não possuem estruturas de defesa aparentes e/ou são incapazes de se locomover em busca de condições mais favoráveis. Para sobreviver, precisam desenvolver a capacidade de produzir compostos tóxicos ou obtê-los por meio de associação com micro-organismos marinhos. Essas moléculas bioativas correspondem a uma fonte de compostos químicos únicos que podem ser empregados em pesquisas biomédicas, farmacêuticas e biotecnológicas, numa infinidade de aplicações, de limites ainda desconhecidos. Em estudos com invertebrados é bastante frequente encontrar compostos químicos novos, já que, de forma geral, esses compostos diferem daqueles encontrados em organismos terrestres.

A composição da comunidade bentônica varia de acordo com os diferentes ambientes e, principalmente, substratos. Em linhas gerais, existem dois grupos de substrato no fundo do mar: consolidados e inconsolidados. No primeiro grupo, podemos citar os costões rochosos, recifes e estruturas artificiais (molhes, estruturas de portos etc.); no segundo, fundos lamosos, areia e cascalho. Como substratos consolidados são raros no ambiente marinho (menos de 2% do fundo oceânico), as interações competitivas têm grande papel na estruturação das comunidades, muitas vezes com uso de substâncias químicas. Por essa razão, invertebrados bentônicos de substrato consolidado, como recifes, vêm sendo alvos primários de investigações

quanto à presença de compostos bioativos. Os principais grupos encontrados em recifes são esponjas, cnidários, ascídias, briozoários, equinodermos, moluscos e vermes marinhos (poliquetas)(Figura 1).



**Figura 1.** Representantes de grupos invertebrados de maior interesse para estudos biotecnológicos encontrados em recifes rasos. A: porífero *Amphimedon compressa*; B: ascídia colonial (tunicado) *Botrylloides nigrum*; C: briozoário (ectoprocto) *Bugula neritina*; D: gastrópode *Conus magus*; E: zoantídeo (cnidário) *Palythoa caribaeorum*; F: octocoral (cnidário) *Carijoa riisei*. Créditos das imagens: A, E, F: autores; B, C: (Migotto; Vellutini, 2011); D: Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.

No Brasil, a maior parte das investigações em bioprospecção marinha tem sido feita com macroalgas, que, por também serem bentônicas, têm estratégias similares. Entre os invertebrados marinhos, os poríferos e cnidários têm apresentado excelentes resultados de produtos ativos. No entanto, um dos maiores problemas nos estudos de bioprospecção é a lacuna no

conhecimento taxonômico que existe. O levantamento da diversidade amplia as possibilidades de encontrar novos compostos. Um exemplo disso foi a descrição da esponja *Aplysina caissara* Pinheiro & Hajdu, 2001 para o litoral norte do estado de São Paulo, da qual foram posteriormente isolados dois alcaloides de interesse, a caissarina A e caissarina B (Saeki et al., 2002). Apesar disso, o conhecimento ainda limitado da biodiversidade continua sendo um grande gargalo para o desenvolvimento de estudos biotecnológicos. Para se ter uma ideia, no Brasil, a fauna de invertebrados conhecida representa apenas 1 a 2% da fauna mundial, apesar da dimensão continental do país e dos mais de sete mil quilômetros de costa.

É possível que a grande quantidade de compostos bioativos produzida por invertebrados bentônicos esteja diretamente associada à diversidade ecológica desses grupos. Representantes desses filos podem ser encontrados em variados habitats (água doce, estuários, mares e oceanos; substratos consolidados e inconsolidados; águas rasas a profundidades abissais; como epizoicos, entre outros) e podem estabelecer diversas relações ecológicas, incluindo associação com microalgas em seus tecidos. Há também registro de invertebrados com grande tolerância a variações do meio, como salinidade, temperatura, quantidade ou presença de poluentes. Assim, muitas das substâncias produzidas podem ter uma função na natureza que contribua para a adaptabilidade da espécie. Um exemplo disso é o sistema imune. Em Cnidaria, esse sistema está intimamente relacionado com a diversidade de interações ecológicas encontradas no filo, como competição intraespecífica entre alcionáceos, competição entre linhagens de células dentro de quimeras de hidrozoários, reconhecimento celular e defesas químicas contra micro-organismos baseada na produção de metabólitos secundários.

Como dito, o avanço da biotecnologia envolvendo invertebrados marinhos esbarra, atualmente, em duas carências importantes: pouco conhecimento sobre a diversidade do grupo, devido principalmente ao reduzido número de especialistas em alguns táxons; e o isolamento das áreas de estudo. Na maior parte das vezes a prospecção e o estudo de compostos ativos não incluem taxonomistas ou ecólogos, dificultando ou impedindo a correta identificação do táxon e conhecimento sobre a importância ecológica do composto para os organismos em seu ambiente natural. Há hoje um esforço para mudar esse cenário a partir do desenvolvimento de estudos mais integrados e interdisciplinares, envolvendo pesquisadores de diferentes áreas. Isso deverá gerar, em médio e longo prazo, um grande avanço no campo da biotecnologia marinha.

### **3 | ACESSANDO A BIODIVERSIDADE**

Para acessar toda essa diversidade biológica, primeiramente é necessário ter uma ideia clara sobre qual o objetivo do estudo a ser realizado. A seleção de métodos específicos para coleta, preservação e análise do material vai depender do tipo e da finalidade da amostra, que variam conforme o caráter da pesquisa (taxonômico, ecológico ou biotecnológico). É importante ressaltar que toda coleta de material biológico necessita de autorização prévia dos órgãos competentes. Na maioria dos casos, a solicitação de autorização de coleta é feita por meio do Sisbio, um sistema de atendimento a distância, *online*, ligado ao Instituto Chico Mendes de Conserva-

ção da Biodiversidade (ICMBio). Em casos específicos de Unidades de Conservação, podem ser necessárias outras autorizações de órgãos estaduais ou municipais gestores da Unidade.

Os estudos de prospecção de bioprodutos são normalmente destrutivos, ou seja, demandam a desintegração parcial ou total do organismo estudado, seja na fase de coleta ou de extração de compostos. No entanto, sabendo-se que toda prospecção biotecnológica exige uma fundamentação taxonômica sólida, é necessário que espécimes sejam obtidos, etiquetados e preservados de maneira que sua identificação seja viável. Por isso, recomenda-se a coleta em paralelo de exemplares especificamente para fins taxonômicos.

Os estudos taxonômicos são aqueles voltados para o conhecimento da biodiversidade. Na taxonomia tradicional, organismos inteiros ou estruturas específicas destes são coletados para análise de caracteres morfológicos e anatômicos importantes na identificação das espécies. Entretanto, vários grupos de invertebrados marinhos, como Cnidaria, apresentam uma taxonomia complexa e controversa, devido à presença de espécies crípticas, alta plasticidade morfológica, agrupamentos parafiléticos, entre outros. Com o melhoramento de técnicas voltadas para Genética e Biologia Molecular, os estudos de biodiversidade ganharam uma nova ferramenta: a Taxonomia Molecular. Nessa abordagem, as amostras são coletadas com o objetivo de extrair os diversos tipos de moléculas de DNA, RNA e proteínas para estudos tanto voltados à identificação quanto à filogenia dos grupos.

Além da identificação de uma espécie ou de um grupo de espécies em particular, algumas abordagens metodológicas envolvem também a obtenção de material para estudos ecológicos, com a finalidade de conhecer a macro e microbiota associadas, o que permite, entre outras coisas, determinar os vários níveis de interações ecológicas entre eles e desenvolver técnicas para o monitoramento ambiental.

Dentre essas interações ecológicas, encontram-se aquelas mediadas por moléculas que podem tanto pertencer ao grupo de metabólitos primários (essenciais à vida, como aminoácidos, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos) ou secundários (envolvidos na interação/adaptação de algumas espécies, a exemplo de terpenos, alcaloides, esteroides, peptídeos cíclicos, toxinas, pigmentos). Essas moléculas têm sido objetos de estudos de caráter biotecnológico e industrial, com destaque para a Farmacologia.

### **3.1 COLETA E PRESERVAÇÃO**

Como mencionado anteriormente, a maioria dos invertebrados marinhos de interesse biotecnológico são bentônicos e compreendem grupos solitários ou coloniais que podem viver nos mais variados substratos (consolidados ou inconsolidados) e em diferentes profundidades. Assim, as ferramentas e métodos empregados para obtenção de material biológico dependerão do ambiente, do tipo de organismo, bem como da textura e composição de seus tecidos, além do tipo das moléculas a serem investigadas, levando-se em consideração suas propriedades e concentrações nos diversos tecidos (ANA/CETESB, 2011).

Em linhas gerais, para qualquer que seja a aplicação do estudo realizado, deve-se sempre obter amostras destinadas à identificação das espécies e ao depósito em coleção de referência. Assim, o procedimento em campo envolve as seguintes etapas: 1) visita- piloto ou con-

sulta à literatura ou a especialistas para escolha do local e definição dos métodos de amostragem; 2) escolha do método de amostragem baseada no tipo de organismos (coleta direcionada a um ou poucos grupos ou coleta de prospecção direcionada ao maior número de táxons possível), tipo de fundo (consolidado ou não), localidade (tipo de acesso, profundidade etc.); 3) fotografia do local de coleta e dos organismos *in situ* ou logo após a coleta; 4) coleta dos organismos ou parte deles (organismos coloniais) destinados à taxonomia do grupo 5) coleta dos organismos, ou parte deles, destinados aos estudos biotecnológicos; 6) preservação (acondicionamento e fixação) do material de acordo com o táxon e objetivos do estudo; 7) identificação de todas as amostras com informações do local e data da coleta, tipo de ambiente, profundidade e tipo de fixador utilizado. A identificação das amostras deve ser feita com etiquetas de papel vegetal escritas com caneta nanquim ou lápis e colocadas no interior dos frascos contendo os exemplares. Sempre que possível, todas as informações sobre o local de coleta e a ecologia dos organismos devem ser anotadas em caderno de campo.

Após a coleta, o material deve ser acondicionado em sacos ou potes plásticos, etiquetados e fixados, de acordo com o protocolo taxonômico para cada grupo (Tabela 1) ou aplicabilidade biotecnológica (Tabela 2). Embora os protocolos variem, os fixadores mais utilizados são: formaldeído comumente diluído em água do mar (4% ou 10%) e etanol 70%. Organismos destinados a análises moleculares ou outras aplicações biotecnológicas devem ser fixados e conservados apenas em etanol 96% ou absoluto, jamais em formaldeído, pois pode ocorrer a degradação da molécula de DNA. Concentrações mais baixas de etanol também devem ser evitadas por possuir muita água em sua composição, que também contribuiria para a degradação do material em longo prazo.

Uma alternativa de preservação que permite a utilização das amostras para múltiplas finalidades é o congelamento, seja em *freezers* comuns (amostras para análises moleculares em geral) ou em nitrogênio líquido, no qual todas as propriedades estruturais da amostra são mantidas devido ao rápido congelamento. Vale lembrar que mesmo fixado em etanol, o DNA das amostras sofre uma pequena degradação, sendo esse processo minimizado pela manutenção das mesmas sob congelamento.

Outro ponto importante para a conservação das amostras é a vedação do recipiente e o local de armazenamento delas. O recipiente onde serão acondicionadas as amostras deve apresentar bom isolamento, uma vez que a maioria dos fixadores ou são voláteis ou sofrem degradação/oxidação com o passar do tempo. As amostras e suas partes ou produtos devem manter sempre a etiqueta com os dados de coleta e, após a identificação, o nome do táxon.

Em alguns grupos, como as esponjas, a coloração é uma característica importante para a identificação das espécies. Por essa razão, recomenda-se a obtenção de fotografias antes do processo de fixação. Em outros grupos, a anestesia prévia à fixação (com cloreto de magnésio ou mentol) pode ser utilizada para garantir a completa distensão do animal no processo de fixação, facilitando a observação de estruturas importantes para a taxonomia do grupo.

Toda espécie estudada deve estar devidamente representada em alguma coleção científica através de *espécimes-testemunho* ou *vouchers*, com seus respectivos dados de coleta (localidade georreferenciada e profundidade, no mínimo). A durabilidade e a fixação adequada dos *vouchers* devem ser asseguradas, primeiramente, pelo coletor e, posteriormente, pela

**Tabela 1.** Procedimentos para fixação e preservação com fins taxonômicos dos principais grupos de invertebrados marinhos com potencial biotecnológico.

ORGANISMO	FINALIDADE	FIXAÇÃO	PRESERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
<b>Filo Porifera – Classe Demospongia</b>				
Esponjas marinhas	Morfologia; Voucher	Etanol 70% ou 96%	Etanol 70% ou 96%	Esponjas podem ser congeladas, após a coleta, para manter a coloração dos espécimes.
<b>Filo Cnidaria – Classe Anthozoa (Hexacorallia)</b>				
Zoantídeos, anêmonas do mar	Morfologia; Voucher	Formol salino 10%	Formol 4%	Recomenda-se anestésiar amostras com cloreto de magnésio 7% antes da fixação.
	Histologia	Etanol 70% - 96% ou fixador histológico	Etanol 70% ou 96%	---
Corais (Scleractinia)	Morfologia; Voucher	Etanol 70% - 96% ou formaldeído 5%	Etanol 70% ou 96%	Esqueleto limpo em hipoclorito de sódio e seco (sol ou estufa) é suficiente para identificação.
	Histologia	Formaldeído 5%	Formaldeído 5%	---
<b>Filo Cnidaria – Classe Anthozoa (Octocorallia)</b>				
Corais moles, gorgônias	Morfologia; Voucher	Etanol 70% ou 96%	Etanol 70% ou 96%	Exemplares secos ao sol ou estufa também são úteis para identificação.
<b>Filo Bryozoa – Todas as classes</b>				
Briozoários	Morfologia; Voucher	Formol 5% ou etanol 70%	Formol 5% ou etanol 70% - 96%	Pode ser removido com parte do substrato. Em caso de colônias grandes, um fragmento é suficiente. A colônia deve ser fotografada.
<b>Filo Annelida – Classe Polychaeta</b>				
Poliquetas	Morfologia; Voucher	Etanol 70%	Etanol 70% ou 96%	Deve-se manter o animal imobilizado, com alfinetes. Fixar somente após a expansão da probóscide.
<b>Filo Annelida – Classe Hirudinea</b>				
Sanguessuga	Morfologia; Voucher	Etanol 70% ou formol 10%	Etanol 70% ou formol 5%	---
<b>Filo Mollusca – Todas as classes</b>				
Moluscos	Morfologia; Voucher	Etanol 70% ou 96%	Etanol 70% ou 96%	Pode ser anestésiado com mentol.
<b>Filo Echinodermata – Classe Holothuroidea</b>				
Pepinos-do-mar	Morfologia; Voucher	Etanol 70%	Etanol 70%	Antes de fixar, deixar o animal expandir a coroa de tentáculos.

ORGANISMO	FINALIDADE	FIXAÇÃO	PRESERVAÇÃO	OBSERVAÇÕES
<b>Filo Echinodermata – Classe Ophiuroidea</b>				
Serpentes-do-mar	Morfologia; Voucher	Etanol 70% ou 96%	Etanol 70% ou 96%	Recomenda-se cuidado, pois o espécime pode desmembrar-se.
<b>Subfilo Tunicata – Classe Ascidiacea</b>				
Ascídias	Morfologia; Voucher	Formaldeído 5%	Etanol 70% ou 96%	Pode-se retirar parte do substrato junto com a amostra. Recomenda-se anestésias espécimes com mentol por uma noite, pois exemplares muito contraídos dificultam identificação.

Fonte: Adaptada de Häussermann (2009)

**Tabela 2.** Procedimentos de fixação/preservação de invertebrados marinhos para diferentes finalidades biotecnológicas.

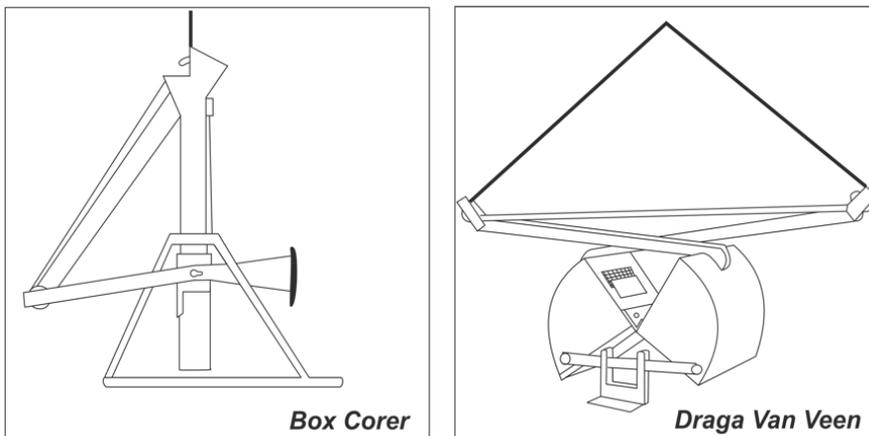
FINALIDADE	FIXAÇÃO/PRESERVAÇÃO
Produtos naturais	Transporte em banho de gelo, congelamento em nitrogênio líquido ou armazenamento em etanol. O método de armazenamento das moléculas extraídas deve ser selecionado de acordo com as características físico-químicas do produto final.
DNA	Congelamento em nitrogênio líquido, armazenamento em solução estabilizadora de DNA ou manutenção em banho de gelo (por até 24h após a coleta). As moléculas extraídas podem ser armazenadas em temperaturas inferiores a -20°C.
RNA	Congelamento em nitrogênio líquido, armazenamento em solução estabilizadora de RNA ou manutenção em banho de gelo (por até 1h após a coleta). As moléculas extraídas devem ser armazenadas em temperaturas inferiores a -70°C.
Proteínas	Congelamento em nitrogênio líquido ou armazenamento em soluções contendo substâncias estabilizadoras de proteínas para transporte em banho de gelo. As moléculas extraídas podem ser armazenadas por até 24h a 4°C ou por congelamento de alíquotas em temperaturas inferiores a -20°C após adição de solução de glicerol 50% (concentração final).
Microbiota associada	Transporte em banho de gelo e manutenção sob refrigeração (4°C). As amostras devem ser processadas em até 24h para evitar perda de viabilidade celular.
Macrobiota associada	Processar amostras conforme descrito na Tabela 1.

curadoria do respectivo museu ou coleção, que também deve garantir o acesso público ao material. É papel do pesquisador optar por instituições que facilitem empréstimos ou visitas para consulta, no mínimo, em nível nacional.

### 3.1.1 MATERIAL PARA ESTUDOS TAXONÔMICOS E ECOLÓGICOS

Em estudos envolvendo o levantamento faunístico de uma determinada região, é comum a utilização de métodos não seletivos ou indiretos, comuns em investigações oceanográficas

ficas em geral, os quais permitem a coleta de grande quantidade de organismos. Esse procedimento serve tanto para conhecer a diversidade biológica de determinado local quanto para estudos amplos iniciais de bioprospecção. Em fundos inconsolidados, as ferramentas mais utilizadas são o *box-corer*, draga de Van Veen (Figura 2) e rede de arrasto (Figura 3C). Esses equipamentos são normalmente lançados a partir de uma embarcação em áreas costeiras rasas ou no mar profundo. Em fundos duros como recifes e costões, a coleta não seletiva pode ser feita por raspagem, coleta manual ou ainda *air-lift*, um sistema de sucção com bomba de vácuo ligada a um tubo e um saco de nylon, usado em costões com grande cobertura algálica. A escolha adequada dos instrumentos, baseada em estudos-pilotos prévios, é essencial. Uma ferramenta de coleta em fundos lamosos – um *box-corer*, por exemplo – seria pouco útil e facilmente danificada em um recife de coral.



**Figura 2.** Exemplos de ferramentas de amostragem “indireta” utilizadas em pesquisas oceanográficas. As amostras obtidas são constantemente utilizadas em estudos biológicos, uma vez que a fauna acompanhante (meiofauna e macrofauna) é indicadora do tipo de comunidade e ambiente. Câmeras podem ser acopladas em ambos os casos.

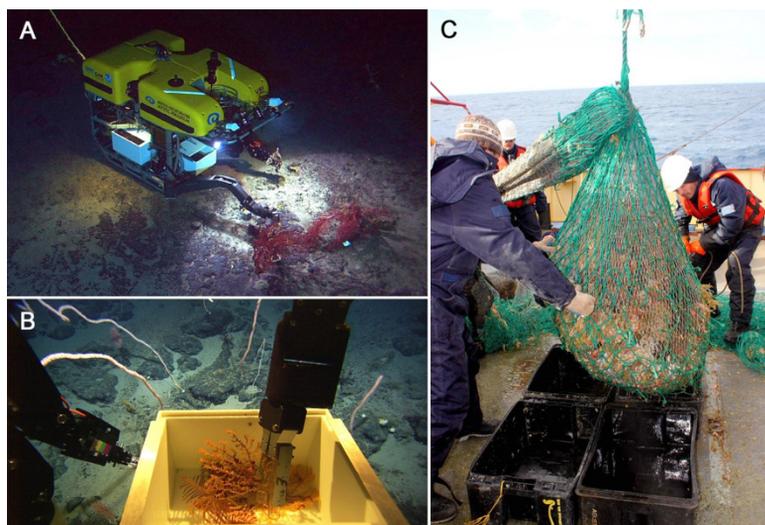
Uma desvantagem associada a métodos pouco seletivos, como o arrasto de fundo, é o impacto causado no ambiente amostrado. Embora essas técnicas ainda sejam usadas, devem ser evitadas, uma vez que são destrutivas e não garantem que os organismos de interesse serão obtidos. Além disso, muitas vezes a coleta danifica o organismo, dificultando sua posterior identificação. Invertebrados com crescimento modular, como corais, ascídias, esponjas e briozoários, têm a grande vantagem de poderem ser identificados, na maioria das espécies, com base em fragmentos, desde que preservado certo número de módulos. Isso também é importante do ponto de vista ecológico e de preservação das espécies, porque permite a coleta de material sem comprometer o animal como um todo, uma vez que as colônias tendem a regenerar as partes perdidas. Em corais coloniais, por exemplo, alguns coralitos são suficientes para distinguir espécies. Para outros organismos como esponjas e gorgônias, a identificação pode ser realizada mesmo com módulos danificados, uma vez que é baseada na análise de microestruturas esqueléticas.

Em pesquisas que contemplem estudos taxonômicos e ecológicos de um organismo ou grupo específico, apenas técnicas que assegurem a visualização prévia do espécime têm alguma garantia de sucesso. São métodos diretos que reduzem drasticamente impactos desnecessários ao ambiente. O custo e a viabilidade desse tipo de coleta em muito dependem da profundidade em que o organismo ocorre e da dificuldade em removê-lo do substrato. Independentemente da profundidade, a coleta é geralmente manual, com uso de ferramentas para raspagem ou remoção do organismo do substrato (espátula, martelo e ponteira, alicates, ferramentas de sucção etc.). É importante também o uso de luvas, tanto para evitar irritações e alergias provocadas por estruturas físicas ou metabólitos de alguns organismos marinhos, como para evitar a contaminação do material.

Em ambientes muito rasos (até 2m, em média) como ocorre na maioria dos recifes, a busca ativa por meio de mergulho livre (apneia) é a mais indicada, já que diminui a necessidade de aparatos, assim como exclui vários dos riscos associados a mergulho com gases. Em maiores profundidades, até 40m (mergulho recreacional ou autônomo), é necessário o uso de um aparelho de respiração subaquática autônomo ou SCUBA (*self-contained underwater breathing apparatus*), que apresenta duas principais desvantagens: limitação de profundidade e tempo de fundo. Ainda que o mergulho tenha sido aperfeiçoado em termos de maior autonomia e segurança por dispositivos como *rebreathers* e misturas gasosas como nitrox e trimix, o fator risco é limitante e precisa ser evitado. Por isso, o uso de submersíveis tripulados e veículos operados remotamente (ROVs - *remotely operated underwater vehicles*) (Figura 3 A,B) tem crescido nas últimas décadas. Além de não incluírem os riscos diretamente associados ao mergulho, também não são tão limitados pelo tempo de fundo. Entretanto, o custo operacional e de aquisição desses equipamentos acaba restringindo seu uso a regiões e instituições de maior poder aquisitivo. Uma das vantagens dos ROVs é o registro dos organismos em seu hábitat em tempo real. Na maioria dos casos, a documentação *in situ* é essencial, não somente pelo aspecto taxonômico, mas também ecológico. Nesse sentido, registros fotográficos, filmagens e anotações de campo são ferramentas importantíssimas, já que muitas informações podem se perder com a fixação do organismo e sua retirada do contexto ecológico. Algumas espécies de poríferos e corais negros, por exemplo, têm sua identificação baseada em aspectos de suas colônias vivas. Assim, mesmo em coletas por meios indiretos, recomenda-se fotografar os espécimes assim que possível.

Um aspecto que deve ser levado em conta nos métodos diretos é que, como muitos micro-organismos vivem associados a invertebrados, recomenda-se, sempre que possível, envolver o animal em saco plástico antes de sua remoção do substrato. Isso também evita que organismos como zoantídeos e esponjas liberem toxinas nocivas ou outros compostos alelopáticos quando injuriados. Em algumas situações, o substrato sobre o qual o organismo se fixa também deve ser coletado.

Para investigações de caráter ecológico, as amostras destinadas ao estudo da microbiota associada (simbiontes ou patógenos) devem ser armazenadas em gelo para transporte e mantidas sob refrigeração. Recomenda-se a triagem das amostras em até 24 horas após a coleta para evitar a perda de viabilidade das células. Amostras destinadas ao conhecimento da macrofauna associada devem ser processadas da mesma forma que aquelas para fins taxonômicos (Tabela 1).



**Figura 3.** Comparação entre métodos de coleta seletiva (direta: A, B) e generalista (indireta: C) em mar profundo. A: Veículo operado remotamente (ROV) Hercules coletando corais em mar profundo; B: garra do ROV depositando espécimes em caixas coletoras; C: rede de arrasto de fundo com material recém-coletado. Créditos das imagens: A, B: NOAA Ocean Explorer; C: Laura Schejter - INIDEP

### 3.1.2 MATERIAL PARA ESTUDOS BIOTECNOLÓGICOS

De modo semelhante ao realizado em estudos taxonômicos e ecológicos, a obtenção de material biológico destinado à investigação de produtos naturais resultantes do metabolismo de invertebrados marinhos deve priorizar o uso de métodos diretos, objetivando-se a coleta do organismo como um todo ou apenas de estruturas ou tecidos em que são produzidas as moléculas de interesse. Na preservação de organismos para fins biotecnológicos, o ideal é que sejam conservados fragmentos de indivíduos diferentes, a fim de representar a variabilidade amostrada. No caso de organismos coloniais, recomenda-se lavar o material em água destilada antes da fixação e congelamento para retirar possíveis simbiontes.

Para estudos moleculares, as amostras devem ser coletadas de modo a preservar a integridade do DNA ou RNA, levando-se em consideração que a estabilidade dessas moléculas varia de acordo com o tipo de tecido estudado. Idealmente, as amostras de tecido ou secreções devem ser picotadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou adicionadas em uma solução comercial de preservação de ácidos nucleicos como RNA<sup>later</sup><sup>™</sup> (Invitrogen) para estabilização e armazenamento de RNA ou Xpedition<sup>™</sup> (Zymo Research) para lise celular e estabilização de DNA, que garantem a estabilidade das moléculas em temperatura ambiente sem necessidade de refrigeração. Deve-se observar que essas soluções de preservação não são adequadas para fixação de material destinado a análises histológicas, devendo este ser coletado à parte. Quando o emprego dos métodos mencionados não for possível, recomenda-se que as amostras sejam mantidas em banho de gelo para transporte até o laboratório. É importante destacar que todo o material utilizado esteja limpo, estéril para evitar a contaminação cruzada (sobretudo em análises de metagenômica) e livre de nucleases (enzimas que degradam material genético), sendo esses

procedimentos críticos principalmente para estudos com transcritos de RNA que são mais facilmente degradados por serem fita simples. Também se faz necessário o uso de luvas para evitar degradação das moléculas pelas nucleases presentes nas mãos.

Para a extração de DNA, a amostra deve ser macerada preferencialmente em nitrogênio líquido e processada em até 24 horas. Devido à sua conformação em dupla fita, o DNA de amostras transportadas em banho de gelo permanece estável nos tecidos por até 24 horas sob refrigeração ou por duas semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As etapas de extração de material genético podem ser então realizadas por técnicas *in house* ou por uso de sistemas comerciais disponíveis para uma variedade de tecidos distintos. O DNA isolado deve ser então armazenado em presença de tampão (ex. tris-EDTA) em temperaturas inferiores a  $0^{\circ}\text{C}$  para evitar degradação por ação de desoxirribonucleases (DNAses).

Como as moléculas de RNA são mais passíveis de degradação por ribonucleases (RNAses), recomenda-se que os tecidos transportados em gelo sejam congelados, adicionados em solução estabilizadora ou processados em até uma hora após a coleta. Em caso de congelamento, o material deve ser descongelado diretamente na solução de lise para evitar degradação. Uma vez isolado, o RNA deve ser armazenado em temperaturas inferiores a  $-70^{\circ}\text{C}$ , preferencialmente em etanol, para evitar a ação das nucleases.

A grande vantagem de estudos moleculares é a obtenção de resultados precisos a partir de uma pequena quantidade de amostra. Em geral, estipula-se que cerca de 1-2g de tecido sejam suficientes para a obtenção do material genético, mas a quantidade ideal vai depender de fatores como o tipo de tecido e a quantidade de núcleos presentes (MELO et al., 2010). Genes e fragmentos de DNA e RNA, mesmo que presentes em pequenas concentrações, podem ser amplificados por técnicas convencionais de reações em cadeia de polimerase (PCR). Os produtos amplificados (amplicons) são então submetidos ao sequenciamento de bases nitrogenadas para identificação de espécies ou de genes ou ainda de vias metabólicas, a partir de comparação com sequências depositadas em bancos de dados, a exemplo do GenBank, mantido pelo NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para o estudo de genomas (conjunto de todos os genes presentes no organismo) ou de transcriptomas (conjunto de transcritos, moléculas de RNAm que refletem os genes que estavam sendo expressos no momento da coleta), o material genético extraído pode ser digerido com enzimas e diretamente clonado em vetores para a construção de bibliotecas genômicas ou de DNA complementar (cDNA, sintetizado utilizando sequências de RNAm como molde), permitindo conhecer os tipos de moléculas sintetizadas pelos organismos, vinculadas ao metabolismo normal ou associadas a uma condição de estresse.

Nos estudos envolvendo proteínas, as etapas para obtenção de material biológico são constituídas por: coleção do espécime, estabilização do material e posterior extração da população de proteínas relevante ao propósito da pesquisa. Uma vez que há grande heterogeneidade física e química tanto das proteínas quanto dos tecidos dos quais são originadas, não existe um método único para a obtenção desse material, sendo necessários ajustes de acordo com o tipo de amostra, o propósito analítico e a técnica empregada (GE Healthcare Life Sciences, 2014).

Inicialmente, amostras de tecido ou de fluidos corporais são coletadas observando-se as mesmas condições descritas para amostras de DNA/RNA. Para assegurar sua integridade, o

material deve ser imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras devem ser submetidas ao processo de ruptura celular (para tecidos), preferencialmente utilizando nitrogênio líquido, com posterior extração por uso de tampões de lise acrescidos de fatores estabilizadores para proteção das proteínas contra hidrólise enzimática, oxidação ou mudança conformacional (desnaturação). Uma vez extraídas, as proteínas são solubilizadas em tampões adequados, clarificadas por filtração ou centrifugação e posteriormente submetidas a procedimentos de quantificação.

Todas as etapas do processamento das amostras devem ser realizadas rapidamente e em gelo para evitar degradação do material. Uma vez isoladas, as proteínas podem ser armazenadas por diferentes métodos, de acordo com a estabilidade, tempo e aplicação da amostra. A maioria das proteínas pode ser armazenada a 4°C por até 24 horas. Acima desse período, recomenda-se a distribuição das amostras em alíquotas e seu congelamento a -20°C. Nessa temperatura, deve ser adicionada uma solução de glicerol 50% (concentração final) para evitar o congelamento da amostra. Em temperaturas inferiores, o uso da solução crioprotetora não é necessário, mas pode ajudar na manutenção de sua estabilidade.

Os produtos naturais decorrentes do metabolismo secundário de invertebrados marinhos geralmente são produzidos em pequenas quantidades, mas apresentando alta atividade biológica, provavelmente como uma forma adaptativa de superar a diluição das moléculas na água do mar. Devido à baixa concentração das moléculas, estudos dessa natureza requerem grande quantidade de amostra para obtenção de quantidades satisfatórias de extratos. Esse problema é ainda mais evidente em organismos como ctenóforos, alguns cnidários e esponjas, anelídeos e moluscos em que ou a maior parte do corpo é formada por água, ou são formados em sua maioria por estruturas rígidas que não são aproveitadas ou ainda apresentam tamanho diminuto. Não existe uma quantidade mínima ótima para coleta de tecido que se aplique a todos os grupos. É necessário realizar testes-pilotos para cálculo do rendimento específico para cada molécula em cada organismo estudado.

Uma vez coletadas, as amostras podem ser preservadas em etanol ou submetidas a congelamento ou processos de secagem em estufa. Para cada caso, devem ser observadas as características das moléculas de interesse para determinação das temperaturas de segurança, fotossensibilidade, volatilidade etc. A remoção da água das amostras é uma etapa importante principalmente em processos de extração por solventes orgânicos de baixa polaridade. Após maceração dos tecidos para aumentar a superfície de contato, as amostras são embebidas nos solventes selecionados, por um período que pode variar de horas a dias, em condições de temperatura e agitação específicas para o grupo de moléculas que se deseja estudar. Os extratos brutos são inicialmente recuperados por filtração para remoção da biomassa e posteriormente concentrados por processos como evaporação sob pressão reduzida, liofilização, secagem em estufa de circulação etc. Em seguida, os princípios ativos podem ser purificados por técnicas cromatográficas e submetidos aos processos de elucidação estrutural. É importante lembrar que bioensaios para monitoramento da atividade biológica devem ser realizados durante todo o processo de obtenção e purificação de moléculas bioativas. O armazenamento das moléculas extraídas deve levar em consideração as características físico-químicas de cada metabólito. Dessa forma, podem ser mantidos congelados, sob refrigeração ou à temperatura ambiente,

muitas vezes longe de umidade e ao abrigo da luz.

Uma questão importante a ser considerada na escolha dos táxons, tecidos, épocas e locais de coleta é o fato de que os metabólitos podem variar entre diferentes populações de uma mesma espécie ou ainda dentro de um mesmo organismo. No primeiro caso, a expressão de certas moléculas pode sofrer influência de fatores externos, podendo ser, por exemplo, estimulada pela presença de predadores, como feromônios de alarme, ou por condições ambientais de estresse, como as proteínas de choque térmico. Além disso, a síntese total ou parcial de certas moléculas pode ser realizada por micro-organismos associados e encontrados em ambientes específicos. Dessa forma, populações de localidades geográficas distintas podem ser desprovidas de tais micro-organismos, conseqüentemente não apresentando as moléculas em seus tecidos. É o que ocorre, por exemplo, em populações do cnidário *Palythoa caribaeorum*. Na região do Caribe, esse zoantídeo é conhecido por apresentar uma das toxinas mais potentes do ambiente marinho, a palitoxina, cuja síntese foi posteriormente também atribuída a um dinoflagelado tóxico do gênero *Ostreopsis* (Taniyama et al., 2003). Populações da mesma espécie do cnidário são encontradas ao longo de toda a costa do Brasil, porém em várias praias esses organismos não apresentam nenhum grau de toxicidade, o que sugere a ausência do dinoflagelado (Melo et al., 2012; Soares et al., 2006). No segundo caso, o conjunto de metabólitos pode variar por influência de fatores internos, a exemplo de moléculas presentes apenas em fases específicas de desenvolvimento, como os esteroides sexuais liberados por corais para sincronia reprodutiva (Tarrant; Atkinson; Atkinson, 2004). Assim, a quantidade e o tipo de metabólitos podem variar dependendo da localidade, das condições do ambiente, do período de coleta e até mesmo do método empregado. Isto ressalta a importância não apenas de intensificar as amostragens, mas também de relatar todos os dados sobre a coleta em publicações relacionadas àquele táxon.

## 4 | BIOTECNOLOGIA DE INVERTEBRADOS MARINHOS

A biotecnologia marinha pode ser definida como a aplicação industrial de recursos naturais marinhos, englobando o uso de animais vivos, de seu material genético ou de moléculas por eles sintetizadas, bem como o desenvolvimento de técnicas biológicas com base na observação de processos naturais. É uma área multidisciplinar, reunindo bases biológicas, químicas e da engenharia para a descoberta de novas drogas, remediação e monitoramento ambiental, avanço de técnicas para garantir a segurança e o fornecimento de alimentos de origem marinha, bem como o desenvolvimento de novos recursos e processos industriais, entre outros. Extratos para a indústria de cosméticos, nutracêuticos e substâncias anti-incrustantes também são exemplos de utilização de produtos isolados de organismos marinhos.

Ao longo da história, os principais usos dos recursos marinhos estiveram sempre relacionados às atividades pesqueiras, de exploração de óleo e gás, maricultura, turismo e lazer. No entanto, outros recursos cujo potencial é muito promissor incluem a exploração mineral em águas profundas e a utilização racional da biodiversidade marinha com fins biotecnológicos

(bioprospecção). As formas de explorar legalmente a biodiversidade marinha, com principal foco na busca de recursos genéticos, bioquímicos e químicos para fins industriais começaram a ganhar interesse em vários locais do planeta.

Os estudos biotecnológicos envolvendo organismos marinhos são muito mais recentes que aqueles realizados com plantas em ambiente terrestre. A principal razão disso é a dificuldade de acesso ao ambiente marinho, em especial o oceânico, e o conhecimento escasso que tínhamos desse ambiente, décadas atrás. Além disso, a dificuldade em trabalhar com moléculas bastante complexas e o pouco uso de organismos marinhos na medicina tradicional ocidental impediam a obtenção de informações empíricas de populações tradicionais para direcionar os estudos, como ocorre com plantas. O desenvolvimento e popularização do mergulho autônomo e o aumento de programas focados na descrição da diversidade taxonômica de mares e oceanos permitiram um impulso nos estudos a partir de 1950. A esses fatos somou-se o desenvolvimento de metodologias capazes de desvendar a estrutura de moléculas bem mais complexas. Apesar das dificuldades na realização de estudos com biotecnologia marinha, diversos dados já obtidos demonstram o potencial de uso dos invertebrados marinhos. Na Tabela 3 são apresentados exemplos de alguns dos principais produtos ou aplicação de organismos pertencentes a diversos grupos taxonômicos.

A busca por novos fármacos representa uma das linhas mais promissoras dentro da biotecnologia marinha. Devido às pressões ambientais já discutidas anteriormente, as moléculas produzidas por esses organismos são muito diferentes daquelas oriundas do ambiente terrestre, e, dessa forma, constituem uma fonte de possíveis novas classes de medicamentos.

A farmacologia marinha deu seus primeiros passos com a busca por substâncias detentoras de atividade biológica, principalmente focada na atividade antitumoral. Um dos pioneiros foi o Professor Werner Bergmann, da Universidade de Yale (EUA), que na década de 50 isolou os nucleosídeos espongouridina e espongotimidina da esponja *Tectitethya crypta* com atividade antitumoral e antiviral, e que serviram posteriormente de modelo para o desenvolvimento de inúmeros antivirais como o AZT, remédio básico no tratamento da AIDS. A farmacologia marinha levou vários anos para o seu desenvolvimento e no ano 2011 se estimava que 21.800 produtos já tivessem sido pesquisados. Blunt e colaboradores (2010), em uma revisão sobre produtos naturais de origem marinha, relacionam mais de 1000 moléculas isoladas apenas no ano de 2008 em todo o mundo, publicadas em 371 artigos internacionais. Esse número significou um aumento de mais de 11% do número de moléculas conhecidas em 2007, o que revela o grande desenvolvimento da área (Brasil, 2010), mas ainda corresponde a uma ínfima parcela dos produtos naturais produzidos por organismos marinhos. Nesse contexto, o bentos comporta um arsenal de novas substâncias que são utilizadas para sua defesa química e para sobrevivência em um meio muito exigente e competitivo, particularmente para os organismos sésseis.

A produção em larga escala de compostos bioativos sempre foi um desafio na história dos produtos naturais de invertebrados marinhos, desacelerando e impedindo, muitas vezes, a sua entrada no mercado farmacêutico. Apesar do enorme potencial econômico, a escassa quantidade em que os compostos aparecem nos organismos obrigaram os pesquisadores a desenvolver estratégias e métodos de produção para poder assegurar o fornecimento de matéria-prima durante o processo de desenvolvimento e comercialização do fármaco, sem impactar

**Tabela 3.** Exemplos de alguns dos produtos obtidos de invertebrados marinhos nos diferentes campos de aplicação.

ATIVIDADE	GRUPO	ORGANISMO	BIOPRODUTO	FONTE
<b>Farmacêutica</b>				
Citotóxica	Cnidaria(Octocorallia)	<i>Carijoa riisei</i>	Esteroides polioxigenados esterol glicosídeos	Almeida et al. (2014)
	Porifera	<i>Pachychalina alcaloidifera</i>	Ingenamina G e ciclostetaminas G-I, K, e L (pseudoalcaloides)	De Oliveira et al. (2004)
		<i>Plakortis angulospiculatus</i>	Plakortenone e Plakortide (policetídeos)	Kossuga et al. (2008)
	Tunicata (Ascidiacea)	<i>Cystodytes dellechiaiei</i>	Sebastianinas (alcaloides)	Torres et al. (2002)
Antimicrobiana	Cnidaria(Octocorallia)	<i>Leptogorgia setacea</i>	Homarina (alcaloide)	Almeida et al. (2014)
	Porifera	<i>Aplysina fistularis</i>	Dibromotirosina	Tymiak; Rinehart (1981)
		<i>Aplysina caissara</i>	Caissarina A, B e C	Saeki et al. (2002)
Anti-inflamatória	Cnidaria(Octocorallia)	<i>Plexaura homomalla</i>	Prostaglandinas	Light; Samuëlsson (1972)
	Porifera	<i>Dysidea avara</i>	Avarol e Avarone (sesquiterpeno)	Keyzers; Davies-Coleman (2005)
Antiproliferativa	Cnidaria(Octocorallia)	<i>Clavularia viridis</i>	Prostanoides halogenados	Shen et al. (2004)
	Cnidaria(Hexacorallia)	<i>Antipathes dichotoma</i>	Estéril hexadecanoatos	Alarif et al. (2013)
	Bryozoa	<i>Amathia wilsoni</i>	Amathaspiramidas (alcaloides)	Shimokawa et al. (2016)
Anti-Leishmania	Cnidaria(Octocorallia)	<i>Carijoa riisei</i>	Punaglandinas e pregnamas	Almeida et al. (2014)
Antimalária	Cnidaria(Octocorallia)	<i>Pseudopterogorgia kallos</i>	Bielschowskysinas (diterpenos)	Mayer et al. (2007)
Antituberculose	Cnidaria(Octocorallia)	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Homopseudopteroxazoles (alcaloide)	Mayer et al. (2007)
Antifúngica	Cnidaria(Hexacorallia)	<i>Palythoa caribaeorum</i> <i>Protospalythoa variabilis</i> <i>Zoanthus sociatus</i>	Enzimas esterases	Pagani et al. (2016)
Antileucêmica	Cnidaria(Octocorallia)	<i>Clavularia viridis</i>	Prostanoides halogenados	Shen et al. (2004)
Antiviral	Porifera	<i>Tectitethya crypta</i>	Espongotimidina e esponouridina	Bergmann; Feeney (1950)
		<i>Xestospongia muta</i>	Poliacetileno bromado	Patil et al. (1992)

ATIVIDADE	GRUPO	ORGANISMO	BIOPRODUTO	FONTE
Analgésica	Mollusca	<i>Conus magus</i>	$\omega$ -Conotoxina MVIIA / Ziconotide (Prialt®)	Jones et al. (2001)
Antimitótica	Porifera	<i>Dysidea etheria</i>	Dysidiolide (Sesterterpenoide)	Gunasekera et al. (1996)
Inibidora de fosfolipase A-2	Porifera	<i>Cacospongia mollior</i>	Scalaradial (dialdeído)	Marshall et al. (1994)
Inibidora de cisteíno e metaloproteases de veneno de cobra	Cnidaria	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Enzimas proteolíticas	Guarnieri et al. (2018)
Antitumoral	Tunicata (Ascidiacea)	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Briotastina e Ecteinascidina 743 (Yondelis®)	Rinehart et al. (1990)
		<i>Aplidium albicans</i>	Aplidin® (aplidina, plitidepsina)	Costa-Lotufo et al. (2009)
	Porifera	<i>Cacospongia scalaris</i> <i>Fasciospongia cavernosa</i>	Cacospongionolide e Scalaradial (Sesterterpenoides apoptóticos)	De Stefano et al. (2012)
	Bryozoa	<i>Bugula neritina</i>	Bryostatinas (lactonas)	Manning et al. (2005)
Antiparasitaria	Porifera	<i>Oceanapia</i> sp.	Tiocianatina (Nematicida Haemonchus contortus)	Mayer et al. (2007)
<b>Cosmética</b>				
Analgésica	Cnidaria (Octocorallia)	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Pseudopterosinas (creme facial Resilience®, da Estée Lauder)	Look et al. (1986)
<b>Medicina/Odontologia</b>				
Implantes cirúrgicos ortopédicos	Cnidaria (Hexacorallia)	<i>Esqueletos de corais</i>	ProOsteon®, Biocoral® (Interpore)	Damien; Revell (2004)
<b>Náutica</b>				
Anti-incrustante	Cnidaria (Octocorallia)	<i>Leptogorgia setacea</i>	Homarina	Almeida et al. (2014)
	Porifera	<i>Amphimedon compressa</i>	Amphitoxina (alcaloide)	Albrizio et al. (1995); Kelly et al. (2003)
<b>Nutracêutica</b>				
Antioxidante	Mollusca (Bivalvia)	<i>Cassostrea gigas</i> (ostra)	Peptídeo antioxidante	Qian et al. (2008)
<b>Agricultura</b>				
Pesticida	Annelida (Polychaeta)	<i>Lumbrineris heteropoda</i>	Nereistoxina (pesticida CAR-TAP) (traça do tomate <i>Tuta absoluta</i> e cítricos)	Kumar; Amalath; Dutta (2011)

ou alterar as populações naturais dos organismos. Durante os anos 1960, após a descoberta das prostaglandinas em várias espécies de corais moles (principalmente a gorgônia *Plexaura homomalla*), a coleta indiscriminada dessas espécies pôs em perigo suas populações em várias regiões do Caribe. Felizmente, métodos para síntese em laboratório foram rapidamente desenvolvidos, evitando, assim, o desaparecimento desses corais. As técnicas para produção em larga escala mais usadas (aquicultura e desenvolvimento de transgênicos) possuem vantagens e limitações, portanto não podem ser utilizadas de modo geral para qualquer organismo. A escolha do método deve depender da complexidade da molécula, a abundância do organismo na natureza, a fonte do composto (macro ou micro-organismo), condições de crescimento etc.

Muitos dos compostos marinhos isolados de organismos bentônicos são, na verdade, oriundos de micro-organismos associados ao animal, como simbioses ou parasitas. A determinação precisa da origem da síntese de um composto é uma tarefa árdua, e por isso geralmente se considera que, se o produto é similar a algum produto isolado de origem microbiana, ou se é encontrado em espécies filogeneticamente mais ou menos distantes, o mesmo deriva do micro-organismo. Costa-Lotufo e colaboradores (2009) afirmam que os micro-organismos marinhos tiveram implicações revolucionárias nos estudos com produtos naturais, não apenas pela diversidade química mas, principalmente, pela perspectiva de sustentabilidade, associada à possibilidade de fermentação para produção de material suficiente para as etapas pré-clínicas e clínicas do desenvolvimento de fármacos. Quase a metade (45%) dos produtos naturais de micro-organismos marinhos foi isolada após o ano 2000, demonstrando que o interesse é recente nessa área.

Para que um fármaco chegue às prateleiras das drogarias, são necessários em média de 12 a 15 anos. Estima-se que, de cada dez mil moléculas analisadas, apenas cerca de duzentas e cinquenta passam aos ensaios pré-clínicos sobre modelos experimentais de laboratório. Quando os ensaios pré-clínicos são completados, com prévia autorização das autoridades sanitárias, podem ser iniciados os ensaios em humanos. O desenvolvimento clínico é um processo complexo e demorado (em média seis anos), mas o resultado final é um medicamento que demonstrou segurança, eficácia e qualidade nos ensaios clínicos, e cuja comercialização foi autorizada por autoridade sanitária competente.

A descoberta de fármacos de origem marinha alcança a maturidade no século XXI com algumas substâncias já comercializadas, principalmente antitumorais como o Yondelis<sup>®</sup>, nome comercial da ecteinascidina-743 (ET-743), extraída da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, produzida pela empresa PharmaMar, indicada para o tratamento de sarcomas de tecidos moles e câncer de ovário. Outro exemplo é o Halaven<sup>®</sup> (mesilato de eribulina), nome comercial da halicondrina B extraída da esponja marinha *Halichondria okadai*, produzida pela empresa Eisai, indicada para o tratamento do câncer de mama. Outras substâncias com propriedades diversas também foram encontradas. É o caso da droga Prialt<sup>®</sup>, nome comercial da molécula sintética ziconotide, produzida com base na  $\omega$ -conotoxina MVIIA pela empresa Neurex (Elan Pharmaceuticals). Trata-se de um peptídeo inicialmente isolado a partir de neurotoxinas produzidas por moluscos do gênero *Conus*, que agem de forma sinérgica para imobilizar suas presas, atuando diretamente sobre o sistema neuromuscular. Foi demonstrado que essa molécula apresenta fortes propriedades analgésicas com efeitos mais potentes e duradouros que a morfina intratecal, sendo utilizada

para o tratamento de dor crônica causada por lesão na medula espinhal. Atualmente, já foram descobertos mais de 7.000 novos compostos de origem marinha.

Uma das grandes contribuições da biotecnologia marinha para a ciência foi a descoberta de pigmentos fluorescentes produzidos por alguns invertebrados, permitindo grandes avanços em investigações moleculares. Um marco no estudo dessas moléculas foi o isolamento da proteína fluorescente verde ou GFP (*green fluorescent protein*) a partir da hidromedusa *Aequorea victoria*, por Osamu Shimomura, em 1961. A luminescência desse cnidário é conferida por uma fotoproteína quimioluminescente denominada aequorina, que libera energia sob a forma de uma luz azul, quando ativada por íons de cálcio. Essa luz é então completamente absorvida por uma molécula de GFP acoplada, que passa a emitir a fluorescência na cor verde (De Farias, 2008; Shimomura; Johnson; Saiga, 1962). Desde a sua descoberta, diversos homólogos de coloração diferente já foram isolados ou sintetizados por técnicas de engenharia genética para ampliação do espectro de emissão-absorção dessas moléculas.

A principal aplicação dessas proteínas é o uso como marcadores fluorescentes em sistemas vivos para estudos de expressão e silenciamento de genes (Chudakov et al., 2010). Por exemplo, as proteínas clonadas podem ser utilizadas para a produção de organismos transgênicos por técnicas como microinjeção de RNAm em embriões ou transformação de bactérias por uso de plasmídeos, permitindo a observação direta do resultado da expressão ou silenciamento do gene-alvo em células e tecidos de organismos vivos. No campo da microscopia, os fluoróforos podem ser fusionados a alvos proteicos ou enzimáticos para o monitoramento de processos celulares específicos, tendo sido muito empregados em estudos relacionados ao câncer.

A biotecnologia marinha também tem atuado no fornecimento de nutracêuticos obtidos a partir de invertebrados marinhos, sobretudo crustáceos, moluscos e equinodermas (Kim, 2012). Os nutracêuticos (combinação dos termos “nutrição” e “farmacêutica”), por sua vez, consistem em suplementos dietéticos em forma de comprimidos, cápsulas ou pó preparados a partir de uma substância bioativa natural concentrada, sendo também consumidos em uma alimentação saudável para proporcionar benefícios na prevenção e tratamento de doenças. Espécies de crustáceos como camarão e caranguejo são boas fontes de quitina e quitosana, moléculas que participam do processo de aceleração da cicatrização de feridas e melhoram o sistema imune, podendo ser empregadas como agentes gelificantes e emulsificantes e como conservantes naturais e biofilmes consumíveis, ambos com propriedades antimicrobianas. Também são moléculas detentoras de atividades antioxidante, hipocolesterolêmica e anti-inflamatória. Polissacarídeos semelhantes a glicosaminoglicanos obtidos de pepinos-do-mar, ascídias, ouriços e nudibrânquios também têm sido empregados como suplementos dietéticos para manutenção da estrutura e da função de cartilagens, para o alívio de dores causadas por osteoartrites e como agentes anti-inflamatórios. Peptídeos bioativos isolados de crustáceos, moluscos e equinodermos possuem potencial de aplicação como nutracêuticos, com atividades anti-hipertensiva, antioxidante, anticoagulante e antimicrobiana.

No campo da biologia molecular, a biotecnologia marinha também tem sido aplicada em estudos envolvendo monitoramento ambiental e detecção de espécies invasoras. A presença desses invasores pode causar danos significativos para ecossistemas marinhos locais e a biodiversidade endêmica, afetando uma série de atividades associadas, como aqüicultura,

turismo, processos industriais, sendo nocivos também à saúde humana. A identificação rápida e acurada da presença desses organismos é um ponto-chave para implementação de técnicas eficientes de manejo. Isso tem sido alcançado graças ao desenvolvimento de ferramentas moleculares sensíveis e específicas com base em diferentes técnicas de PCR e ecogenômica. Em um primeiro momento, amostras ambientais são coletadas e então submetidas ao processo de extração de DNA total (genômico). Em seguida, utilizando-se sequências de iniciadores (*primers*) para um determinado marcador genético específico para a espécie ou táxon de interesse, são realizadas diferentes análises baseadas em técnicas de amplificação por PCR (como PCR comum, *multiplex*, *nested*, quantitativa ou acoplada a técnicas de hibridização, RFLP, RAPD, entre outras). Diversos métodos já foram relatados na literatura para detecção de invertebrados marinhos como gastrópodes, bivalves, crustáceos, equinodermos e ascídias (Bott, 2015).

A biotecnologia marinha também tem sido de grande importância para a conservação de espécies marinhas, fornecendo ferramentas para o diagnóstico de doenças que acometem invertebrados. Muitas dessas doenças têm forte impacto não só para a conservação, mas também para ecologia, economia e saúde humana. As ferramentas para diagnóstico incluem abordagens metodológicas como sequenciamento de alto rendimento, ômicas (genômica, proteômica e metabolômica), técnicas ópticas, química analítica e biologia molecular, as quais devem ser interpretadas juntamente com dados oriundos de análises mais tradicionais baseadas em histopatologia e microbiologia, de modo a se obter uma compreensão total do processo da doença e de seu contexto ecológico (Burge et al., 2016).

## 5 | PERSPECTIVAS, OPORTUNIDADES E DESAFIOS

Os avanços recentes na biotecnologia revelam que o meio marinho é, de fato, uma grande fonte de produtos naturais de interesse em diversos campos. A enorme quantidade de moléculas isoladas e inéditas demonstra seu potencial. Do ponto de vista farmacológico, quando considerados os compostos que passaram pelos ensaios clínicos, aqueles em fases pré-clínicas e clínicas, é possível constatar que invertebrados marinhos são grande fonte de novos medicamentos, com aplicações no tratamento do câncer, de dores, do HIV, de doenças neurodegenerativas, entre outras. A descoberta de drogas de origem marinha é maior que a média do resto da indústria farmacêutica. Da mesma forma houve avanços em campos ligados a outras indústrias, como a de cosméticos. Apesar da melhoria nos processos de isolamento e caracterização de bioativos marinhos, ainda existem desafios a serem vencidos. Os estudos atuais, além de focar na descoberta de novas moléculas, também buscam conhecer as rotas de biossíntese para possibilitar a melhoria de ferramentas que permitam o cultivo ou produção em grande escala.

No entanto, o maior desafio dos estudos biotecnológicos marinhos pode não ter relação com as ferramentas ou técnicas de isolamento. A biodiversidade marinha sofre fortes impactos antropogênicos, estando em constante ameaça. Ambientes marinhos em todo o mundo estão em sério declínio, principalmente como resultado da sobre-exploração, poluição e impactos

diretos e indiretos das mudanças climáticas. A perda de espécies e alterações de ecossistemas têm ocorrido em todo o mundo, e os ambientes marinhos, em especial os costeiros, têm sofrido degradação que leva à perda do patrimônio biológico. São necessárias ações imediatas para a proteção da diversidade biológica em mares e oceanos; caso contrário, moléculas que poderiam ter grande aplicação biotecnológica podem ser perdidas antes mesmo de sua descoberta. Assim, é prioritário investir no conhecimento da biodiversidade marinha e nos esforços para sua conservação. São necessárias ações conjuntas envolvendo pesquisadores de diferentes áreas, iniciativas públicas e privadas (como empresas interessadas no potencial biotecnológico de organismos marinhos) em prol do manejo sustentável e proteção dos ecossistemas marinhos.

## REFERÊNCIAS

Agência Nacional De Águas (ANA). (2011) Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. São Paulo/Brasília: CETESB/ANA, 326p. Disponível em: <<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

Alarif, W.M.; Abdel-Lateff, A.; Al-Lihaibi, S.S.; Ayyad, S.-E.N.; Badria, F.A.; Alsofyani, A.A.; Abou-Elnaga, Z.S. (2013) Marine bioactive steryl esters from the Red Sea black coral *Antipathes dichotoma*. **CLEAN – Soil, Air, Water**. 41(11): 1116-1121. DOI: 10.1002/clen.201200409.

Albrizio, S.; Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Pawlik, J.R. (1995) Amphitoxin, a new high molecular weight antifeedant pyridinium salt from the Caribbean sponge *Amphimedon compressa*. **Journal of Natural Products**. 58(5): 647-652. DOI: 10.1021/np50119a002.

Almeida, M.T.R.; Moritz, M.I.G.; Capel, K.C.C.; Pérez, C.D.; Schenkel, E.P. (2014) Chemical and biological aspects of octocorals from the Brazilian coast. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 24(4): 446-467. DOI: 10.1016/j.bjp.2014.05.002.

Bergmann, W.; Feeney, R.J. (1950) The isolation of a new thymine pentoside from sponges. **Journal of the American Chemical Society**. 72(6): 2809-2810. DOI: 10.1021/ja01162a543.

Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Munro, M.H.G.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R. (2010) Marine natural products. **Natural Product Reports**. 27(2): 165-237. DOI: 10.1039/B906091J.

Bott, N.J. (2015) Detection of invasive species. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 16:441-453. DOI: 10.1007/978-3-642-53971-8\_16.

Brasil. (2010) Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Caracterização do estado da arte em biotecnologia marinha no Brasil: Série B. **Textos básicos de saúde**. Brasília: Ministério da Saúde. 134p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caracterizacao\\_estado\\_arte\\_biotecnologia\\_marinha.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caracterizacao_estado_arte_biotecnologia_marinha.pdf)>. Acesso em: 18 ago. 2017.

Burge, C.A.; Friedman, C.S.; Getchell, R.; House, M.; Lafferty, K.D.; Mydlarz, L.D.; Prager, K.C.; Sutherland, K.P.; Renault, T.; Kiryu, I.; Vega-Thurber, R. (2016) Complementary approaches to diagnosing marine diseases: a union of the modern and the classic. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. 371(1689): 20150207. DOI: 10.1098/rstb.2015.0207.

Chudakov, D.M.; Matz, M.V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K.A. (2010) Fluorescent proteins and their applica-

tions in imaging living cells and tissues. **Physiological Reviews**. 90(3): 1103-1163, 2010. DOI: 10.1152/physrev.00038.2009.

Costa-Lotufo, L.V.; Wilke, D.V.; Jimenez, P.C.; Epifanio, R.D.A. (2009) Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**. 32(3): 703-716. DOI: 10.1590/S0100-40422009000300014.

Damien, E.; Revell, P.A. (2004) Coralline hydroxyapatite bone graft substitute: A review of experimental studies and biomedical applications. **Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics**. 2(2): 65-73.

De Farias, F.M.C. (2008) GFP: uma ferramenta brilhante para a visualização da vida. **Revista Virtual de Química**. 1(1): 2-8. DOI: 10.5935/1984-6835.20090002.

De Oliveira, J.H.H.L.; Grube, A.; Köck, M.; Berlinck, R.G.S.; Macedo, M.L.; Ferreira, A.G.; Hajdu, E. (2004) Ingenamine G and cyclostelletamines G-I, K, and L from the new Brazilian species of marine sponge *Pachychalina* sp. **Journal of Natural Products**. 67(10): 1685-1689. DOI: 10.1021/np0498713.

De Stefano, D.; Tommonaro, G.; Malik, S.A.; Iodice, C.; De Rosa, S.; Maiuri, M.C.; Carnuccio, R. (2012) Cacospongionolide and scalaradial, two marine sesterterpenoids as potent apoptosis-inducing factors in human carcinoma cell lines. **PLOS ONE**. 7(4): e33031. DOI: 10.1371/journal.pone.0033031.

Ge Healthcare Life Sciences. (2014) **Sample collection, stabilization, and protein extraction**. In: **Protein sample preparation handbook** (28-9887-41 AB). 2: 27-52. Disponível em: <[http://www.gelifsciences.com/file\\_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/Protein\\_sample\\_preparation\\_handbook.pdf](http://www.gelifsciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/Protein_sample_preparation_handbook.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2017.

Guarnieri, M.C.; Modesto, J.C.A.; Pérez, C.D.; Ottaiano, T.F.; Ferreira, R.S.; Batista, F.P.; Brito, M.V.; Campos, I.H.M.; Oliva, M.L.V. (2018) Zoanthid mucus as new source of useful biologically active proteins, **Toxicon**. 43:96-107.

Gunasekera, S.P.; Mccarthy, P.J.; Kelly-Borges, M.; Lobkovsky, E.; Clardy, J. (1996) Dysidiolide: A novel protein phosphatase inhibitor from the Caribbean sponge *Dysidea etheria* de Laubenfels. **Journal of the American Chemical Society**. 118(36): 8759-8760. DOI: 10.1021/ja961961+.

Häussermann, V. (2009) Protocol for sampling and preservation of marine organisms. In: Häussermann, V.; Försterra, G. (Eds.). **Marine Benthic Fauna of Chilean Patagonia: illustrated identification guide**. Puerto Montt: Nature in Focus. 88-92.

Jones, R.M.; Cartier, G.E.; Mcintosh, J.M.; Bulaj, G.; Farrar, V.E.; Olivera, B.M. (2001) Composition and therapeutic utility of conotoxins from genus *Conus*. Patent status 1996-2000. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. 11(4): 603-623. DOI: 10.1517/13543776.11.4.603.

Kelly, S.R.; Jensen, P.R.; Henkel, T.P.; Fenical, W.; Pawlik, J.R. (2003) Effects of Caribbean sponge extracts on bacterial attachment. **Aquatic Microbial Ecology**. 31(2): 175-182. DOI: 10.3354/ame031175.

Keyzers, R.A.; Davies-Coleman, M.T. (2005) Anti-inflammatory metabolites from marine sponges. **Chemical Society Reviews**. 34(4): 355-365. DOI: 10.1039/B408600G.

Kim, S.-K. (2012) Advances in food and nutrition research. **Marine medicinal foods: Implications and applications - Animals and microbes**. v. 65. Waltham: Academic Press. 280p.

Kossuga, M.H.; Nascimento, A.M.; Reimão, J.Q.; Tempone, A.G.; Taniwaki, N.N.; Veloso, K.; Ferreira, A.G.; Cavalcanti, B.C.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Mayer, A.M.S.; Hajdu, E.; Berlinck, R.G.S. (2008) Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. **Journal of Natural Products**. 71(3): 334-339. DOI: 10.1021/np0705256.

Kumar, A.S.P.; Amalnath, D.; Dutta, T.K. (2011) Cartap poisoning: A rare case report. **Indian Journal of**

**Critical Care Medicine.** 15(4): 233-235. DOI: 10.4103/0972-5229.92075.

Light, R.J.; Samuylsson, B. (1972) Identification of prostaglandins in the gorgonian, *Plexaura homomalla*.

**European Journal of Biochemistry.** 28(2): 232-240. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1972.tb01906.x.

Look, S.A.; Fenical, W.; Jacobs, R.S.; Clardy, J. (1986) The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 83(17): 6238-6240.

Manning, T.J.; Land, M.; Rhodes, E.; Chamberlin, L.; Rudloe, J.; Phillips, D.; Lam, T.T.; Purcell, J.; Cooper, H.J.; Emmett, M.R.; Marshall, A.G. (2005) Identifying bryostatins and potential precursors from the bryozoan *Bugula neritina*. **Natural Product Research.** 19:5: 467-491. DOI: 10.1080/14786410412331280041.

Marshall, L.A.; Winkler, J.D.; Griswold, D.E.; Bolognese, B.; Roshak, A.; Sung, C.M.; Webb, E.F.; Jacobs, R. (1994) Effects of scalaradial, a type II phospholipase A2 inhibitor, on human neutrophil arachidonic acid mobilization and lipid mediator formation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** 268(2): 709-717.

Mayer, A.M.S.; Rodriguez, A.D.; Berlinck, R.G.S.; Hamann, M.T. (2007) Marine pharmacology in 2003-4: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anti-malarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology & pharmacology: CBP.** 145(4): 553-581. DOI: 10.1016/j.cbpc.2007.01.015.

Melo, L.F.A.; Camara, C.A.G.; Oliveira, L.L.D.S.S.; Modesto, J.C.A.; Pérez, C.D. (2012) Toxicity against *Artemia salina* of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) used in folk medicine on the coast of Pernambuco, Brazil. **Biotemas.** 25(3): 145-151. DOI: 10.5007/2175-7925.2012v25n3p145.

Melo, M.R.; Martins, A.R.; Barbosa, I.V.; Romano, P.; Scholnik, W. (2010) Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** 46(5): 375-381. DOI: 10.1590/S1676-24442010000500006.

Migotto, A.E.; Vellutini, B.C. (2011) **Cifonauta: banco de imagens de biologia marinha.** Disponível em: <<http://cifonauta.cebimar.usp.br/>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

Muséum National D'histoire Naturelle. (Paris, France). **Conus magus.** Collection: Molluscs (IM), Specimen MNHN-IM-2000-2516.

NOAA (NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION). (2006) **Ocean Explorer Gallery.** Disponível em: <[http://oceanexplorer.noaa.gov/gallery/technology/technology\\_collection.html](http://oceanexplorer.noaa.gov/gallery/technology/technology_collection.html)>. Acesso em: 11 ago 2017.

Pagani, D.M.; Heidrich, D.; Paulino, G.V.B.; De Oliveira Alves, K.; Dalbem, P.T.; De Oliveira, C.F.; Andrade, Z.M.M.; Silva, C.; Correia, M.D.; Scroferneker, M.L.; Valente, P.; Landell, M.F. (2016) Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs. **Archives of Microbiology.** 198(10): 963-971. DOI: 10.1007/s00203-016-1254-0.

Patil, A.D.; Kokke, W.C.; Cochran, S.; Francis, T.A.; Tomszek, T.; Westley, J.W. (1992) Brominated polyacetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia muta*: inhibitors of HIV protease. **Journal of Natural Products.** 55(9): 1170-1177.

Qian, Z.-J.; Jung, W.-K.; Byun, H.-G.; Kim, S.-K. (2008) Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. **Bioresource Technology.** 99(9): 3365-3371. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.08.018.

Rinehart, K.L.; Holt, T.G.; Fregeau, N.L.; Stroh, J.G.; Keifer, P.A.; Sun, F.; Li, L.H.; Martin, D.G. (1990) Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **The Journal of Organic Chemistry**. 55(15): 4512-4515. DOI: 10.1021/jo00302a007.

Saeki, B.M.; Granato, A.C.; Berlinck, R.G.S.; Magalhães, A.; Schefer, A.B.; Ferreira, A.G.; Pinheiro, U.S.; Hajdu, E. (2002) Two unprecedented dibromotyrosine-derived alkaloids from the Brazilian endemic marine sponge *Aplysina caissara*. **Journal of Natural Products**. 65(5): 796-799. DOI: 10.1021/np0105735.

Shen, Y.-C.; Cheng, Y.-B.; Lin, Y.-C.; Guh, J.-H.; Teng, C.-M.; Ko, C.-L. (2004) New prostanoids with cytotoxic activity from Taiwanese octocoral *Clavularia viridis*. **Journal of Natural Products**. 67(4): 542-546. DOI: 10.1021/np030435a.

Shimokawa, J.; Chiyoda, K.; Umihara, H.; Fukuyama, T. (2016) Antiproliferative activity of amathaspiramide alkaloids and analogs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 64(8): 1239-1241. DOI: 10.1248/cpb.c16-00256.

Shimomura, O.; Johnson, F.H.; Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**. 59(3): 223-239. DOI: 10.1002/jcp.1030590302.

Soares, C.L.S.; Pérez, C.D.; Maia, M.B.S.; Silva, R.S.; Melo, L.F.A. (2006) Avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16(4): 463-468. DOI: 10.1590/S0102-695X2006000400004.

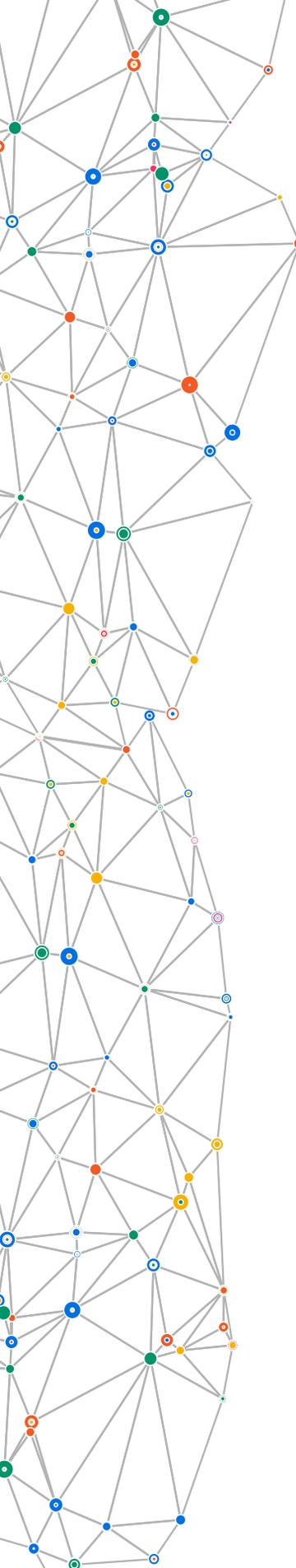
Taniyama, S.; Arakawa, O.; Terada, M.; Nishio, S.; Takatani, T.; Mahmud, Y.; Noguchi, T. (2003) *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus oivifrons*. **Toxicon**. 42(1): 29-33. DOI: 10.1016/S0041-0101(03)00097-7.

Tarrant, A.M.; Atkinson, M.J.; Atkinson, S. (2004) Effects of steroidal estrogens on coral growth and reproduction. **Marine Ecology Progress Series**. 269:121-129.

Torres, Y.R.; Bugni, T.S.; Berlinck, R.G.S.; Ireland, C.M.; Magalhães, A.; Ferreira, A.G.; Moreira Da Rocha, R. (2002) Sebastianines A and B, novel biologically active pyridoacridine alkaloids from the Brazilian ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. **The Journal of Organic Chemistry**. 67(15): 5429-5432. DOI: 10.1021/jo011174h.

Tymiak, A.A.; Rinehart, K.L. (1981) Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia aurea*). **Journal of the American Chemical Society**. 103(22): 6763-6765. DOI: 10.1021/ja00412a047.





# GENÉTICA DE POPULAÇÕES NA ERA DA GENÔMICA

Cintia P. J. Rua<sup>a</sup>  
Anderson Vilasboa<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>b</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

## RESUMO

A genética de populações é a ciência que estuda as frequências e a distribuição da variação genética em populações de organismos ao longo do tempo. Para estudar a diversidade das populações, ela utiliza técnicas moleculares que evoluíram bastante, tanto em termos tecnológicos quanto conceituais, desde a aplicação das aloenzimas como marcadores moleculares, há mais de meio século. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, foi possível acessar a variabilidade da molécula de DNA dos organismos, a princípio de forma indireta, com técnicas como RFLP e mais tarde, de forma direta, com a obtenção da sequência de nucleotídeos contidos num fragmento de DNA. A observação da variação genética entre populações de determinado organismo permite determinar se as populações estão conectadas através de fluxo gênico ou estruturadas, ou seja, apresentam algum grau de isolamento reprodutivo. O isolamento de populações pode levar à perda de variabilidade genética que reduz o potencial adaptativo das espécies e frequentemente ameaçam a capacidade de sobrevivência dessas espécies no longo prazo. A avaliação de estruturação de populações provê dados importantes na proposição de medidas de conservação de espécies e na determinação de limite entre espécies e detecção de espécies crípticas. Em meio a essas questões biológicas desenvolveu-se a genômica evolutiva que utilizando um maior volume de dados genômicos, se propõe a responder quais forças e fenômenos evolutivos moldaram os genomas das espécies. Dessa forma, as ferramentas da Era Genômica têm a capacidade de gerar um volume massivo de dados que encerram um grande potencial de resolver questões primordiais e essenciais da Genética de Populações.

# 1 | INTRODUÇÃO

Os ambientes marinhos comportam organismos que abrigam ricas e diversas comunidades microbianas. Esses organismos, chamados holobiontes, são grandes fontes de substâncias com potencial bioativo (Brasil, 2010). Organismos marinhos tais como esponjas, corais e macroalgas acumulam moléculas usadas em seu metabolismo que podem apresentar características úteis ao homem, seja na produção de remédios ou outras aplicações na indústria. Exemplos dessas moléculas isoladas a partir de organismos marinhos são a espongouridina e a espongotimidina, substâncias isoladas de esponjas marinhas nos anos 1950, que permitiram o desenvolvimento de remédios antivirais usados amplamente hoje em dia (Costa-Lotufo et al., 2009). A correta identificação das espécies de holobiontes e a delimitação de suas populações são de fundamental importância para a biotecnologia marinha. Neste capítulo, veremos a importância do estudo de populações e as ferramentas moleculares mais modernas que permitem responder questões acerca de estruturação e conectividade populacional, fluxo gênico, diversidade biológica e genética desses organismos.

# 2 | CONCEITO DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A genética de populações pode ser definida, de forma bastante simplificada, como a ciência que estuda as frequências e a distribuição dos alelos em uma população de um dado organismo ao longo do tempo (Hamilton, 2009). A genética de populações nasce a partir da conciliação entre as ideias de continuidade das características genéticas ao longo do tempo, advindas de estudos mendelianos e os conceitos de mudança providos pela evolução biológica darwiniana. A genética de populações mais moderna utiliza técnicas moleculares para estudar regiões específicas do genoma e avaliar suas frequências nas populações. Dessa forma, por meio de dados empíricos e modelos matemáticos, é possível avaliar e responder questões como: “quanta variabilidade genética existe em uma população?”, ou “como a diversidade genética evoluirá ao longo do tempo?”, ou ainda “quais forças evolutivas estão atuando em uma determinada população?”

# 3 | DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTUDOS POPULACIONAIS

Um elemento muito importante na composição genética das espécies é a diversidade genética. A diversidade genética pode ser entendida como o conjunto de todos os alelos em todos os genes presentes no genoma dos indivíduos de uma população e suas respectivas frequências (Gregory & Hebert, 1999). É a diversidade genética que pode, em última análise, garan-

tir a sobrevivência de longo prazo das espécies. Isso porque quanto maior é a diversidade genética de uma espécie, maior é a quantidade de variação capaz de permitir a um organismo se adaptar às mudanças do ambiente. Com maior variação, há maior probabilidade de que as variantes genéticas presentes na população possam ser úteis para permitir a adaptação da espécie aos desafios do novo ambiente (Primack, 2006).

Temos presenciado uma era de grande redução de diversidade genética em muitos organismos, promovida sobretudo pela ação do homem sobre o ambiente (poluição, perda de habitat, aquecimento global, etc.). Para que possamos efetivamente conhecer e manejar espécies de interesse, mantendo os serviços ecológicos prestados pela diversidade, é importante analisar e descrever a diversidade genética de populações. Existem muitas medidas de variabilidade que são usadas em genética de populações com o intuito de descrever a diversidade (diversidade gênica, diversidade alélica, heterozigosidade, diversidade nucleotídica) (Hamilton, 2009). Cada uma delas tem uma série de especificidades e o conjunto delas permite traçar um amplo panorama sobre a quantidade total de diversidade genética em uma população em seus diversos níveis.

## 4 | BIOLOGIA MOLECULAR E ESTUDOS POPULACIONAIS

Estudos em genética de populações utilizando metodologias provenientes da biologia molecular começaram há apenas meio século, com medidas de variação genética em *loci* de aloenzimas (Casillas & Barbadilla, 2017; Charlesworth & Charlesworth, 2017). Desde então, alcançamos muitos avanços tecnológicos e conceituais que esclareceram, em nível molecular, fenômenos que geram a variabilidade genética.

Os marcadores moleculares podem ser definidos como um conjunto de técnicas que visam acessar e permitir a análise dos polimorfismos de DNA presentes nos indivíduos. As aloenzimas foram os primeiros marcadores moleculares aplicados na genética de populações (Charlesworth & Charlesworth, 2017). As aloenzimas são proteínas que diferem na mobilidade eletroforética, como resultado de diferenças na sequência de aminoácidos, correspondentes às variações nas sequências de DNA (Hartl & Clark, 2007). As diferentes posições no gel de eletroforese, após a migração das moléculas sob o efeito do campo elétrico, correspondem aos diferentes alelos de um *locus* de aloenzima (Hartl & Clark, 2007).

Durante muitas décadas, a eletroforese (do grego *electro* = eletricidade + *phorésis* = transporte) de aloenzimas foi uma técnica amplamente usada em estudos populacionais. A técnica consiste basicamente na migração das proteínas totais dos tecidos dos organismos analisados sob efeito de um campo elétrico. O tecido biológico obtido da espécie de interesse deve ser macerado e aplicado em um gel, geralmente feito à base de amido, que funcionará como uma peneira molecular, tanto para o tamanho da proteína como para a sua carga elétrica líquida. Após a aplicação de uma corrente elétrica e, em consequência, a migração das moléculas pelo gel, processo conhecido popularmente como corrida, é necessária a revelação do local exato no gel onde dada enzima chegou durante o processo de migração. Essa revelação é feita

através de uma reação enzimática derivada da atividade da própria enzima migrante ao encontrar o seu substrato específico e todos os cofatores necessários para o funcionamento dessa enzima, que são adicionados ao gel durante a etapa de revelação. Dessa forma, pode-se observar os padrões de bandas presentes no gel, que são interpretados como genótipos enzimáticos. Com isso, somos capazes de verificar se um dado indivíduo diploide possui uma única versão de uma enzima (sendo assim um homozigoto) ou se apresenta duas ou mais versões dessa mesma enzima (heterozigoto). Para cada indivíduo é feita a determinação dos genótipos e, a partir deles, são compiladas as frequências gênicas de cada alelo.

O estudo de poucas dezenas de *loci* de aloenzimas forneceu dados de heterozigozidade ou diversidade genética (H) e polimorfismo genético (p) de centenas de espécies (Thorpe & Solé-Cava, 1994; Bohonak, 1999). Após décadas de genotipagem de *loci* de aloenzimas, as medidas de variação genética trouxeram informações sobre a relação entre variabilidade gênica e tamanho populacional, com implicações para a determinação de limites entre estoques e a conservação das espécies (Pearse & Crandall, 2004). A revelação de uma quantidade de variação genética, muito maior do que havia sido prevista, culminou num grande avanço conceitual com a teoria neutralista de evolução molecular, que afirma que a maioria das mutações são efetivamente neutras e por isso não sofrem seleção natural (Schlotterer, 2004; Casillas & Barbadilla, 2017; Charlesworth & Charlesworth, 2017).

A eletroforese de aloenzimas permitiu, pela primeira vez, a análise simultânea de muitos *loci* por um custo relativamente baixo. No entanto, essa técnica apresenta sérias limitações. Aloenzimas são termolábeis, ou seja, sensíveis às elevadas temperaturas, e, portanto precisam ser mantidas congeladas abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$  desde a coleta até a sua análise. Outras limitações importantes são: 1) a baixa variabilidade por *locus* (i.e. poucos alelos por sistema) e 2) a variabilidade não é diretamente acessada (uma proteína é o produto de um gene), apenas os polimorfismos de DNA que alteram a sequência de aminoácidos podem ser observados, excluindo polimorfismos causado por mutações sinônimas (Avisé, 2004). Esse tipo de alteração representa apenas  $\frac{1}{4}$  de todas as possibilidades mutacionais que levam a substituições de aminoácidos (Solé-Cava, 2012; Casillas & Barbadilla, 2017). Por fim, algumas dificuldades metodológicas, que impediam a comparação direta e incremental de estudos entre diferentes laboratórios, fizeram com que essa técnica caísse em desuso, especialmente após os avanços tecnológicos nos estudos com DNA.

Num segundo momento, os estudos populacionais buscaram acessar a variabilidade genética diretamente na molécula de DNA, principalmente após o desenvolvimento da PCR (reação da polimerase em cadeia) nos anos 1980 (Schlotterer, 2004; Charlesworth & Charlesworth, 2017).

O uso do DNA como fonte de informação genética tem duas grandes vantagens: ele apresenta código específico e universal, de modo que estudos mundiais podem ser comparados e o DNA é uma das moléculas mais estáveis da célula, podendo ser fervido ou congelado sem sofrer grandes modificações, e podendo ser mantido com grande estabilidade em álcool ou seco (Avisé, 2004). Apesar dessas vantagens, o uso do DNA para estudos de genética de populações só se tornou realmente prático a partir do desenvolvimento da técnica de amplificação de *loci* gênicos específicos pela PCR. A PCR é uma técnica baseada no processo de cópia do DNA que

ocorre naturalmente em todas as células, mediado pela enzima DNA polimerase. O advento da técnica de PCR permitiu que essa reação de duplicação do DNA fosse feita em um tubo de ensaio e que ocorresse em cadeia, ou seja, ciclos sucessivos de duplicação das fitas do DNA, levando a um aumento exponencial da concentração do DNA de interesse.

Os polimorfismos das sequências de DNA podem ser acessados basicamente por meio de duas formas: o sequenciamento direto do DNA e a análise de polimorfismos de tamanho oriundos da digestão do DNA amplificado por enzimas de restrição (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*).

Os polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs) são detectados pela ausência/ presença de substituições na sequência de DNA que são reconhecidas pela enzima de restrição. As enzimas de restrição são enzimas que reconhecem determinadas sequências de DNA e promovem cortes nas fitas do DNA que apresentam aquela sequência específica. As mutações alteram os sítios de restrição e geram fragmentos de tamanhos diferentes; daí resulta o polimorfismo.

Estudos biogeográficos e filogenéticos utilizaram bastante esse marcador molecular, por uma questão de simplicidade e menor custo. Entretanto, com o desenvolvimento e barateamento das técnicas de sequenciamento automático de DNA, a abordagem de RFLP acabou ficando limitada a alguns casos específicos. A análise de polimorfismos de DNA levou ao desenvolvimento do equivalente nucleotídico da heterozigotidade (H): a diversidade nucleotídica  $\pi$ , para representar a diversidade genética em sequências de DNA (Casillas & Barbadilla, 2017).

O sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados por PCR foi aplicado em inúmeras espécies, enriquecendo os bancos de dados com sequências que revelaram não somente características das dinâmicas populacionais, mas também características de marcadores genéticos. Por exemplo, os níveis de variação em sítios de mutação silenciosa diferem em organismos distintos em taxas muito menores do que a variação detectada em estudos de aloenzimas; SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) superam todos os tipos de variantes estruturais e as inserções de elementos de transposição (TE) segregam como polimorfismos de baixa frequência (Casillas & Barbadilla, 2017). Além disso, revelou-se que sítios nucleotídicos próximos não segregam independentemente. Os alelos agregam-se em blocos que variam de tamanho em espécies diferentes. Essa estrutura de haplótipo é influenciada por recombinação, por forças seletivas e demográficas. Dessa forma, a variabilidade deve ser descrita por medidas de variação genética multidimensionais (Casillas & Barbadilla, 2017). Fez-se necessário, portanto, o desenvolvimento de novas métricas estatísticas para quantificar a variação genética e prover o nível máximo de resolução genética que permite inferir sobre a história das populações e os processos evolutivos que a delinearão (Casillas & Barbadilla, 2017). Nesse cenário, diversos softwares vêm sendo desenvolvidos para análise automatizada.

Paralelamente ao sequenciamento de fragmentos de DNA, os microssatélites se tornaram bastante populares. Microssatélites são repetições em *tandem* de motivos curtos que não somam mais de 100 pares de bases (bp). Os *loci* de microssatélites podem ser amplificados por PCR, são altamente polimórficos, abundantes nos genomas e distribuídos por toda a eucromatina (Schlotterer, 2004). Os microssatélites podem ser desenvolvidos para praticamente todas as espécies e oferecem uma fonte altamente polimórfica de marcadores, inclusive para organismos

não-modelo (Bhargava & Fuentes, 2010). Enquanto novas tecnologias de sequenciamento não haviam se popularizado, a análise de diversidade genética em uma substancial parcela de estudos era baseada em microssatélites. No entanto, já eram conhecidas as dificuldades de interpretações dos dados e os erros assumidos ao utilizar modelos evolutivos que não refletem a realidade dos microssatélites (Ellegren, 2004). Existem, pois, grandes desafios à análise de microssatélites quando grupos apresentam grandes diferenças em números de alelos, homoplasia e alelos nulos (Putman & Carbone, 2014).

Os microssatélites evoluem de forma bastante complexa (Bhargava & Fuentes, 2010). Seus diferentes alelos não se diferenciam por substituições de nucleotídeos, mas sim por número de repetições em *tandem* de unidades de um a seis nucleotídeos (Ellegren, 2004). Além disso, os mecanismos que direcionam o aumento ou diminuição no número de repetições podem variar de acordo com o tipo de microssatélite e a região da molécula de DNA (codificante ou não) em que se encontra (Ellegren, 2004).

Outra questão desvantajosa é a necessidade de se desenvolver microssatélites específicos para cada espécie a ser estudada, tendo em vista a baixa taxa de sucesso no uso de microssatélites heterólogos. O desenvolvimento de microssatélites específicos demanda uma laboriosa tarefa de bancada e a atribuição visual de genótipo feita após a separação dos microssatélites por tamanho em sequenciador de capilar pode ser um desafio (Suez et al., 2016). Por isso, alternativas vêm sendo buscadas de forma a usufruir das vantagens dos microssatélites, ao mesmo tempo em que se busca superar os problemas e obstáculos.

O desenvolvimento tecnológico permitiu a expansão e massificação do sequenciamento. Na primeira década do século XXI surgiram as tecnologias conhecidas como *next generation sequencing* (NGS), que representaram um expressivo salto no volume de dados gerados por sequenciamento (Metzker, 2010; Quail et al., 2012). Passamos de algumas dezenas de *loci* para análise de centenas ou milhares de marcadores polimórficos dispersos em toda parte do genoma. Nesse contexto, as ferramentas de bioinformática tornaram-se cruciais desde a aquisição e verificação de qualidade de dados até sua análise, armazenamento e representação dos resultados. A estatística para medir a variação genética permaneceu a mesma, mas fizeram-se necessários novos formatos de dados e métodos de pré-processamento para lidar com os problemas de dados fragmentados e erros de sequenciamento em conjuntos de dados cada vez maiores (Casillas & Barbadilla, 2017). A busca por microssatélites diretamente em dados de sequenciamento de NGS também vem sendo realizada, assim como novos algoritmos estão sendo desenvolvidos para sobrepujar os artefatos da técnica (Davey et al., 2011; Metz et al., 2016; Suez et al., 2016). Diferentemente de décadas atrás, a análise de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) vem ganhando espaço rapidamente. O grande volume de dados gerados por NGS compensa o investimento em análise de genótipos de SNPs, inclusive em organismos não modelo (Helyar et al., 2011; De Wit et al., 2015).

Os SNPs apresentam baixa variabilidade, exibindo apenas dois alelos por *locus*. No entanto, essa baixa variabilidade por *locus* é compensada pela grande disponibilidade desse tipo de sítio nos genomas (Vignal et al., 2002; Gibson & Muse, 2004; Morin et al., 2004). Estima-se que um SNP ocorra em intervalos de apenas algumas centenas de pares de bases, o que torna o número de *loci* disponíveis para análise extremamente elevados. Em humanos, por exemplo,

estima-se que 90% de toda a variabilidade ao nível do DNA seja desse tipo de polimorfismo e já foram descritos mais de 100 milhões de SNPs no genoma humano. Os SNPs podem ocorrer em regiões codificantes, mas ocorrem principalmente em regiões não codificantes. Algumas das vantagens da utilização dos SNPs incluem a facilidade em indicar o genótipo correto, sem subjetividades nas genotipagens, grande abundância e ampla distribuição ao longo de todo o genoma, possibilidade de identificar SNPs ligados a regiões seletivamente importantes no genoma, possibilidade de automação dos processos de descoberta, detecção dos polimorfismos e análise dos dados. A gradativa redução dos custos dos sequenciamentos NGS vai tornando cada vez mais acessível a utilização desses SNPs em estudos populacionais de organismos modelos e não modelos (Morin et al., 2004; Ekblom & Galindo, 2011; Seeb et al., 2011).

O sequenciamento de nova geração está levando a genética de populações à era genômica, refinando e esclarecendo padrões e processos de variação nucleotídica estudados previamente em pequenos conjuntos de dados e permitindo a descrição de mecanismos de seleção e os limites impostos pela arquitetura genômica sobre a adaptação (Luikart et al., 2003; Stinchcombe & Hoekstra, 2008; Hohenlohe et al., 2010).

Não há dúvida sobre as contribuições da biologia molecular e das novas tecnologias nos estudos populacionais. Entretanto, os princípios da genética de populações permanecem os mesmos, assim como questões específicas continuarão requerendo análises apropriadas com a aplicação do marcador molecular mais adequado. A genética de populações deixou de ser empiricamente insuficiente, para se tornar uma ciência interdisciplinar que depende mais do que nunca de ferramentas de bioinformática em todas as etapas (Schlotterer, 2004).

## 5 | ESTRUTURAÇÃO E CONECTIVIDADE ENTRE POPULAÇÕES E A SUA IMPORTÂNCIA PARA A CONSERVAÇÃO

Na maior parte das vezes, em estudos de genética de populações, estamos interessados em acessar os polimorfismos ditos neutros, ou seja, aquelas variantes genéticas que não alteram a capacidade de sobrevivência dos organismos em seu ambiente e por isso podem ser mantidas nas populações. Quando duas populações estão separadas geograficamente, as frequências de alelos neutros nos diversos genes irão divergir por Deriva Gênica, que é uma força evolutiva que resulta da variância amostral das frequências de uma geração para a outra, sendo, portanto, um processo aleatório (Hamilton, 2009). Essa diferenciação pode ser contrabalanceada pela reprodução de indivíduos entre populações, o chamado Fluxo Gênico. Baseados nesse princípio, podemos assumir que se duas populações compartilham um mesmo polimorfismo neutro, possivelmente existe um maior nível de fluxo gênico entre elas do que entre duas populações que tenham uma maior diferenciação. Assim, a análise dos polimorfismos gênicos permite estimar o grau de diferenciação entre as populações e, indiretamente, a conectividade entre elas (Hamilton, 2009).

A conectividade entre as populações de organismos marinhos depende de uma série

de fatores tanto intrínsecos (i.e., tempo de duração da larva, capacidade de dispersão) quanto extrínsecos (i.e., fatores oceanográficos, correntes marítimas). Essa dinâmica de fatores é que, em última análise, vai determinar o grau de estrutura populacional nesses organismos (Selkoe et al., 2008; Selkoe et al., 2010).

Dizemos que uma população está estruturada quando a diversidade genética não está distribuída de forma homogênea ao longo de toda a distribuição, ou seja, encontra-se compartimentalizada de alguma maneira, com certos alelos restritos a determinadas partes da distribuição da espécie. A estruturação é contrabalanceada pelo fluxo gênico que vai permitir que os alelos (através dos gametas) migrem de um lugar para outro. O fluxo gênico vai homogeneizar a composição genética entre as populações, enquanto o isolamento reprodutivo vai tornar as populações cada vez mais divergentes geneticamente (Hartl & Clark, 2007).

Em geral, como um panorama, as populações de espécies marinhas sésseis como esponjas e corais são populações altamente estruturadas, com baixo fluxo gênico e elevados níveis de endocruzamento, pois a capacidade de dispersão é bastante limitada e restrita quase exclusivamente à fase larvar.

Esse padrão geral pode ser verificado em um estudo recente com duas espécies de esponjas do Mediterrâneo (*Ircinia fasciculata* e *Ircinia variabilis*) com o intuito de determinar a estrutura populacional e os sinais de *bottleneck* (gargalos populacionais) devido a eventos de mortalidade em massa em *I. fasciculata*, além de estabelecer os níveis de hibridização entre *I. fasciculata* e *I. variabilis*, duas espécies do mesmo gênero que ocorrem nas mesmas localidades no Mediterrâneo (Riesgo et al., 2016). Pensando geneticamente, eventos de *bottleneck* levam à perda de variabilidade genética devido, principalmente, à perda de alelos raros. A perda de variabilidade genética reduz o potencial adaptativo das espécies e frequentemente ameaça a capacidade de sobrevivência dessas espécies no longo prazo (Frankham et al., 2010). Riesgo e colaboradores lançaram mão das modernas ferramentas genéticas (microsatélites desenvolvidos a partir da técnica de pirosequenciamento e sequenciamento de DNA) para traçar um panorama bastante abrangente sobre a história evolutiva das duas espécies estudadas. Os dados genéticos permitiram detectar uma série de barreiras ao fluxo gênico, mostrando que *I. fasciculata* apresentava elevado nível de estruturação populacional, com boa conectividade dentro dos grupos e baixa conectividade entre grupos. Foi observado que os padrões de estruturação coincidiam com os padrões de circulação das correntes marinhas dentro no Mar Mediterrâneo e, portanto, que essas massas d'água eram barreiras eficientes para evitar a dispersão das larvas na espécie. Além disso, *I. fasciculata* demonstrou sinais claros de perda de variabilidade genética, sustentando a ideia de que os eventos de mortalidade em massa observados estão levando a gargalos populacionais e, com isso, dilapidando a variabilidade genética da espécie. No entanto, a detecção de hibridização entre *I. fasciculata* e *I. variabilis* pode ser um alento. A hibridização pode ter um papel importante para contrabalançar a perda de variabilidade genética. A hibridização traz novos alelos para o *pool* genético das espécies envolvidas, aumentando a variabilidade genética e permitindo um aumento no potencial evolutivo destas.

## 6 | DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES

A delimitação de espécies nunca foi tarefa fácil, principalmente por haver diversos conceitos de espécies (Wiens, 2007). O conceito filogenético, desenvolvido independentemente por Eldredge e Cracraft (1980) e Nelson e Platnick (1981), afirma que um grupo de indivíduos que compartilha ancestralidade e exibe um padrão de descendência constitui uma espécie (Lee, 2003). Esse conceito tem particular importância para organismos para os quais outros conceitos não são testáveis ou aplicáveis, como o conceito biológico de espécie, proposto por Mayr em 1963. O uso do conceito filogenético permitiu grandes avanços na sistemática de grupos taxonômicos com poucas ou nenhuma característica morfológica diagnóstica e de organismos em que não se pode determinar isolamento reprodutivo.

O uso de marcadores moleculares na inferência filogenética é fundamental e por isso vem acompanhando o avanço da tecnologia (Carstens et al., 2013). Concomitantemente, desenvolvem-se novos *softwares* e modelos evolutivos para a reconstrução filogenética de *loci* de DNA nuclear e mitocondrial (Camargo & Sites, 2013).

Grandes projetos reuniram esforços de pesquisadores ao redor do mundo para eleger um, ou alguns poucos *loci*, com resolução suficiente para diferenciar espécies – os chamados *barcodes* (Hebert et al., 2003). Os *barcodes* ganharam destaque com a promessa de identificar toda a biodiversidade do planeta antes que boa parte dela fosse extinta, por meio do sequenciamento do gene da enzima citocromo oxidase subunidade I (CO1). No entanto, a tarefa se mostrou muito mais complicada, uma vez que um único *locus* não foi capaz de resolver a sistemática de todos os grupos biológicos (Solé-Cava & Worheide, 2007; McFadden et al., 2011; Coissac et al., 2016). Paralelamente, outros pesquisadores sugeriam a necessidade de utilizar o maior número possível de *loci* (Coissac et al., 2016). O advento das novas tecnologias de sequenciamento que permitem o acesso a todo o genoma, independentemente de conhecimento prévio sobre as regiões do DNA, vem suprir essa necessidade por grande quantidade de *loci*. Assim, a filogenômica vem ganhando espaço e contribuindo para resolver a história evolutiva, seja de grupos biológicos mais complicados, que apresentaram filogenias ambíguas com a aplicação de poucos *loci* (Li et al., 2015), seja com maior robustez às inferências filogenéticas, pela utilização de dezenas de *loci* ou até mesmo genomas inteiros (Whelan et al., 2015).

Embora todos os ramos das ciências biológicas dependam do conhecimento prévio de qual espécie se está estudando, ainda existem muitos grupos em que não se pode determinar sua identificação e os limites daquelas espécies. Diversos grupos de cnidários, por exemplo, apresentam a sistemática não resolvida, devido à dificuldade de interpretação das poucas características morfológicas, aliada à baixa variabilidade do DNA mitocondrial (Shearer et al., 2002; McFadden et al., 2011). Os novos métodos de acesso à informação genética parecem bastante promissores para resolver questões desses grupos biológicos. Um exemplo disso é o estudo de corais construtores de recifes do gênero *Pocillopora*. Por meio de uma técnica conhecida como *restriction site-associated DNA sequencing* (RAD sequencing), os autores propuseram uma sistemática divergente da sistemática morfológica estabelecida e amplamente utilizada

até aquele momento, baseando-se em dados que sugerem eventos de introgressão (Combosch & Vollmer, 2015). A popularização de tecnologias de NGS levou ao desenvolvimento de novos marcadores, como o chamado *RAD sequencing*. Essa técnica gera dados de genotipagem de SNPs provenientes de fragmentos de tamanhos predeterminados de qualquer parte do genoma, gerados pelo corte de enzimas de restrição (Reitzel et al., 2013). Já foi mostrado que esse método é capaz de identificar variabilidade intraespecífica, assim como determinar limites entre espécies de octocorais (Pante et al., 2015) e detectar espécies crípticas (Herrera & Shank, 2016).

## 7 | GENÔMICA EVOLUTIVA

Genômica evolutiva é um tema que envolve desde o conhecimento de mecanismos moleculares que levam partes diferentes do genoma a evoluir de forma e em taxas diferentes até uso de genomas inteiros para compreender como os genomas sofreram modificações ao longo do tempo, gerando as espécies atuais. Até o desenvolvimento da PCR, esse campo desenvolveu-se muito lentamente, devido à limitante falta de evidências. Com a possibilidade de amplificar e sequenciar fragmentos do genoma foi possível conhecer particularidades do DNA não codificante; as diferentes taxas de duplicação e deleção e recombinação a que as diferentes regiões genômicas estavam submetidas e a influência das forças evolutivas nas regiões codificantes adjacentes; e foi possível demonstrar a ocorrência de eventos de transferência gênica horizontal e seu papel na evolução de genomas bacterianos (Ridley, 2004).

Mais recentemente, o maior volume de dados e o acesso a todo o genoma permitem comparar genomas completos ou marcadores espalhados em todo o genoma de uma grande variedade de espécies, especialmente SNPs (De Wit et al., 2015). Dessa forma, podemos examinar a influência de forças evolutivas sobre determinadas regiões e inferir fenômenos que moldaram os genomas das espécies. Um exemplo disso é o estudo que examinou milhares de proteínas de 20 espécies de corais, 5 outros cnidários e 7 outros metazoários basais como esponjas e ctenóforos. Esses dados permitiram determinar a base genômica responsável pela formação do recife, pelos mecanismos sensores do ambiente, a maquinaria necessária para acomodar a associação com os simbiosomas do gênero *Symbiodinium* e a contribuição da HGT (transferência genética horizontal) na evolução dos corais (Bhattacharya et al., 2016). Em outro estudo, foram examinados mais de 160 SNPs, o que permitiu determinar que alguns genes da anêmona do gênero *Aiptasia* estão sob forte seleção purificadora, sugerindo importante papel adaptativo na linhagem desse gênero. Além disso, foram detectados *loci* sob influência de seleção balanceadora. Parte desses genes podem estar envolvidos com a interação simbiótica com os *Symbiodinium* (Bellis et al., 2016).

## 8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo abordamos como a genética de populações está se beneficiando com a popularização dos avanços tecnológicos na era da genômica. Atualmente, observamos um caminho irreversível rumo à genomificação dos estudos populacionais, graças à redução de custos dos equipamentos e reagentes e ao aumento de ferramentas de bioinformática que permitem lidar e analisar conjuntos de dados cada vez maiores. Como uma série de avanços metodológicos que vieram anteriormente, o uso de sequenciamento de nova geração, que antes estava restrito aos estudos de genética médica e aos organismos modelos, está cada vez mais acessível para os estudos em organismos não modelo. Além disso, graças à amplitude na distribuição das informações genéticas acessadas (i.e., milhares de *loci* localizados ao longo de todo o genoma), cada vez mais poderão ser acessados genes de interesse biotecnológico que permitirão a geração de benefícios para o homem, além de revelar regiões genômicas envolvidas em fenômenos-chave, como a estruturação genética e regiões genômicas envolvidas com a especiação e a adaptação dos organismos a novos ambientes. Sem sombra de dúvida vivemos uma época de ouro para os estudos de genética de populações e da evolução!

## REFERÊNCIAS

- Avice, J.C. (2004) **Molecular markers, natural history and evolution**. Sinauer Associates, Sunderland.
- Bellis, E.S.; Howe, D.K.; Denver, D.R. (2016) Genome-wide polymorphism and signatures of selection in the symbiotic sea anemone *Aiptasia*. **BMC Genomics**. 17: 160.
- Bhargava, A.; Fuentes, F.F. (2010) Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular Biotechnology**. 44: 250-266.
- Bhattacharya, D.; Agrawal, S.; Aranda, M. et al. (2016) Comparative genomics explains the evolutionary success of reef-forming corals. **eLife**. 5.
- Bohonak, A.J. (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. **The Quarterly Review of Biology**. 74: 21-45.
- Brasil (2010) **Caracterização do estado da arte em biotecnologia marinha no Brasil**. Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília.
- Camargo, A.; Sites, J.Jr. (2013) Species Delimitation: A Decade After the Renaissance. **The Species Problem - Ongoing Issues**. (Pavlinov IY, ed.) Ch. 09. InTech, Rijeka.
- Carstens, B.C.; Pelletier, T.A.; Reid, N.M.; Satler, J.D. (2013) How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**. 22: 4369-4383.
- Casillas, S.; Barbadilla, A. (2017) Molecular Population Genetics. **Genetics**. 205: 1003-1035.
- Charlesworth, B.; Charlesworth, D. (2017) Population genetics from 1966 to 2016. **Heredity**. 118: 2-9.
- Coissac, E.; Hollingsworth, P.M.; Lavergne, S.; Taberlet, P. (2016) From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. **Molecular Ecology**. 25: 1423-1428.
- Combosch, D.J.; Vollmer, S.V. (2015) Trans-Pacific RAD-Seq population genomics confirms introgressive hybridization in Eastern Pacific *Pocillopora* corals. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 88: 154-162.
- Costa-Lotufo, L.V.; Wilke, D.V.; Jimenez, P.C.; Epifanio, R.D.A. (2009) Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & Perspectivas. **Química Nova**. 32: 703-716.

Davey, J.W.; Hohenlohe, P.A.; Etter, P.D.; Boone, J.O.; Catchen, J.M.; Blaxter, M.L. (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics**. 12: 499-510.

De Wit, P.; Pespeni, M.H.; Palumbi, S.R. (2015) SNP genotyping and population genomics from expressed sequences - current advances and future possibilities. **Molecular Ecology**. 24: 2310-2323.

Ekblom, R.; Galindo, J. (2011) Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. **Heredity**. 107: 1-15.

Ellegren, H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**. 5: 435-445.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (2010) **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press.

Gibson, G.; Muse, S.V. (2004) **A Primer of Genome Science**. Sinauer Associates.

Gregory, T.R.; Hebert, P.D. (1999) The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. **Genome Research**. 9: 317-324.

Hamilton, M.B. (2009) **Population Genetics**. Wiley-Blackwell, Oxford.

Hartl, D.L.; Clark, A.G. (2007) **Principles of Population Genetics**. Sinauer and Associates Sunderland, MA.

Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.S.L.B.; DeWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B**. 270: 313-321.

Helyar, S.J.; Hemmer-Hansen, J.; Bekkevold, D.; et al. (2011) Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. **Molecular Ecology Resources**. 11 Suppl 1: 123-136.

Herrera, S.; Shank, T.M. (2016) RAD sequencing enables unprecedented phylogenetic resolution and objective species delimitation in recalcitrant divergent taxa. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 100: 70-79.

Hohenlohe, P.A.; Bassham, S.; Etter, P.D.; Stiffler, N.; Johnson, E.A.; Cresko, W.A. (2010) Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. **PLoS Genetics**. 6: e1000862.

Lee, M.S. (2003) Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. **Journal of Evolutionary Biology**. 16: 179-188.

Li, X.; Yang, Y.; Henry, R.J.; Rossetto, M.; Wang, Y.; Chen, S. (2015) Plant DNA barcoding: from gene to genome. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**. 90: 157-166.

Luikart, G.; England, P.R.; Tallmon, D.; Jordan, S.; Taberlet, P. (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. **Nature Reviews Genetics**. 4: 981.

McFadden, C.S.; Benayahu, Y.; Pante, E.; Thoma, J.N.; Nevarez, P.A.; France, S.C. (2011) Limitations of mitochondrial gene barcoding in Octocorallia. **Molecular Ecology Resources** 11: 19-31.

Metz, S.; Cabrera, J.M.; Rueda, E.; Giri, F.; Amavet, P. (2016) FullSSR: Microsatellite Finder and Primer Designer. **Advances in Bioinformatics**. 6040124.

Metzker, M.L. (2010) Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**. 11: 31-46.

Morin, P.A.; Luikart, G.; Wayne, R.K. (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**. 19: 208-216.

Pante, E.; Abdelkrim, J.; Viricel, A.; Gey, D.; France, S.C.; Boisselier, M.C.; Samadi, S. (2015) Use of RAD

sequencing for delimiting species. **Heredity**. 114: 450-459.

Pearse, D.E.; Crandall, K.A. (2004) Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**. 5: 585-602.

Primack, R. (2006) **Essentials of Conservation Biology**. Sinauer Associates.

Putman, A.I.; Carbone, I. (2014) Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. **Ecology and Evolution**. 4: 4399-4428.

Quail, M.A.; Smith, M.; Coupland, P.; Otto, T.D.; Harris, S.R.; Connor, T.R.; Bertoni, A.; Swerdlow, H.P.; Gu, Y. (2012) A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**. 13: 341.

Reitzel, A.M.; Herrera, S.; Layden, M.J.; Martindale, M.Q.; Shank, T.M. (2013) Going where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. **Molecular Ecology**. 22: 2953-2970.

Ridley, M. (2004) **Evolution**. Blackwell Science Ltd., Oxford.

Riesgo, A.; Pérez-Portela, R.; Pita, L.; Blasco, G.; Erwin, P.M.; López-Legentil, S. (2016) Population structure and connectivity in the Mediterranean sponge *Ircinia fasciculata* are affected by mass mortalities and hybridization. **Heredity**. 117: 427-439.

Schlotterer, C. (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**. 5: 63-69.

Seeb, J.E.; Carvalho, G.; Hauser, L.; Naish, K.; Roberts, S.; Seeb, L.W. (2011) Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. **Molecular Ecology Resources**. 11 Suppl 1: 1-8.

Selkoe, K.A.; Henzler, C.M.; Gaines, S.D. (2008) Seascape genetics and the spatial ecology of marine populations. **Fish and Fisheries**. 9: 363-377.

Selkoe, K.A.; Watson, J.R.; White, C.; Horin, T.B.; Iacchei, M.; Mitarai, S.; Toonen, R.J. (2010) Taking the chaos out of genetic patchiness: seascape genetics reveals ecological and oceanographic drivers of genetic patterns in three temperate reef species. **Molecular Ecology**. 19: 3708-3726.

Shearer, T.L.; Van Oppen, M.J.H.; Romano, S.L.; Worheide, G. (2002) Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). **Molecular Ecology**. 11: 2475-2487.

Solé-Cava, A.M. (2012) Biodiversidade molecular e genética da conservação. **Biologia Molecular e Evolução** (Matioli SR & Fernandes FMC, eds.), p. 256. Holos.

Solé-Cava, A.M.; Worheide, G. (2007) The perils and merits (or The Good, the Bad and the Ugly) of DNA barcoding of sponges - a controversial discussion. **Porifera Research - Biodiversity, Innovation and Sustainability** (Custódio, M.R.; Lôbo-Hajdu, G.; Hajdu, E.; Muricy, G. eds.), pp. 603-612. Museu Nacional, Rio de Janeiro.

Stinchcombe, J.R.; Hoekstra, H.E. (2008) Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. **Heredity**. 100: 158-170.

Suez, M.; Behdenna, A.; Brouillet, S.; Graca, P.; Higuete, D.; Achaz, G. (2016) MicNeSs: genotyping microsatellite loci from a collection of (NGS) reads. **Molecular Ecology Resources**. 16: 524-533.

Thorpe, J.P.; Solé-Cava, A.M. (1994) The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. **Zoologica Scripta** 23: 3-18.

Vignal, A.; Milan, D.; SanCristobal, M.; Eggen, A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**. 34: 275-305.

Whelan, N.V.; Kocot, K.M.; Halanych, K.M. (2015) Employing Phylogenomics to Resolve the Relationships among Cnidarians, Ctenophores, Sponges, Placozoans, and Bilaterians. **Integrative and Comparative Biology**. 55: 1084-1095.

Wiens, J.J. (2007) Species delimitation: new approaches for discovering diversity. **Systematic Biology**. 56: 875-878.





# GENÔMICA, METAGENÔMICA E FERRAMENTAS DE ANOTAÇÃO

Pedro Milet Meirelles<sup>a</sup>  
Genivaldo Gueiros Z. Silva<sup>b</sup>  
Diego G. de Almeida<sup>c</sup>  
Diogo Tschoeke<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal da Bahia

<sup>b</sup> San Diego State University

<sup>c</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

## RESUMO

A (meta)genômica oferece novas oportunidades para as ciências marinhas e pode revelar interações intra e interespecíficas de organismos que compartilham o mesmo hábitat e identificar organismos que vivem em habitats específicos. Além disso, essas abordagens genômicas possibilitam também a busca de novos compostos de interesse biotecnológico. A genômica é a ciência que estuda o genoma dos organismos, visando entender a sua estrutura, organização e função. O uso de abordagens independentes de cultivo para avaliar a diversidade microbiana, como Metagenômica, é cada vez mais comum para estudar as comunidades marinhas. Apesar desta grande importância, estima-se que apenas 0,001 a 0,1% dos micro-organismos que vivem na água do mar foram cultivados até agora. Com a evolução dos métodos de sequenciamento de DNA, hoje é possível obter enormes quantidades de dados (taxonômicos e funcionais) nessas comunidades. Entretanto, a análise, interpretação e integração de dados continuam sendo um grande desafio. Ferramentas de bioinformática para anotação de genomas e metagenomas também são abordadas. Neste capítulo apresentaremos os fundamentos e um breve histórico de como a genômica e a metagenômica surgiram; como ambas têm contribuído para o avanço das ciências marinhas, e como a biotecnologia marinha se beneficia da (meta)genômica.

# 1 | INTRODUÇÃO

A genômica é a área científica que se refere ao mapeamento, sequenciamento e análises do conjunto, completo ou não, de genes e cromossomos de um organismo, o genoma (Xu, 2006). A genômica permite definir o conjunto de genes, arquitetura e plasticidade de genomas, tais como os genomas de cepas vacinais ou de cepas de casos clínicos e de surtos ou epidemias. Também é possível determinar os níveis de expressão gênica por meio de análises pós-genômicas, por exemplo, do conjunto de RNA mensageiros e proteínas expressas em uma determinada condição.

Frederick Sanger e Walter Gilbert receberam o prêmio Nobel de Química do ano de 1980 por suas contribuições como desenvolvedores do sequenciamento de ácidos nucleicos. Contudo, a área da genômica só ganhou forte projeção após o anúncio do sequenciamento completo do genoma humano em 2001 (Venter et al., 2001). Os genomas dos seres vivos contemplam o código genético, o “livro da vida” que define, juntamente a aspectos ambientais, as características básicas dos organismos (Lesk, 2012). Desde os seus primórdios, o estudo dos genomas (e conseqüentemente dos transcriptomas) cresce como um abrangente ramo da ciência. Atualmente, com o avanço da bioinformática e o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração, novos dados são constantemente adicionados a esta área e novos conhecimentos são gerados.

## 1.1 DEFINIÇÕES DE GENE, GENOMA E GENÔMICA

A genômica é a área de conhecimento que envolve o sequenciamento, análise da estrutura e função de genomas. Engloba também a análise evolutivas e comparativas. Pode fornecer importantes conhecimentos sobre as funções do organismo e sua história evolutiva, servindo, entre outras coisas, para o auxílio no estudo da expressão gênica, da transcrição e a tradução da informação genética do genoma. O genoma pode ser definido como o conjunto completo de DNA de um organismo. Praticamente todas as células do corpo humano contêm uma cópia completa dos aproximadamente três bilhões de pares de bases de DNA, ou letras, que formam o genoma humano. Pode ser também considerado, por exemplo, como o conjunto de genes de um organismo, ou o conjunto completo de sua informação genética, incluído seus genes, suas seqüências regulatórias e seu DNA não codificador. O gene é toda seqüência nucleotídica (DNA ou RNA) necessária e suficiente para a síntese de um polipeptídeo ou de uma molécula de RNA estável.

As principais ferramentas utilizadas na genômica são os sequenciadores de DNA, utilizados para identificar o conteúdo das bases nitrogenadas, e os computadores, dado que as seqüências geradas durante o sequenciamento são analisadas com o auxílio do computador. Com o rápido aumento do número de seqüências, particularmente seqüências de genomas completos, e o grande incremento na quantidade de seqüências de DNA disponíveis nos bancos

de dados públicos, houve uma transformação desta área da biologia, a bioinformática, que acabou por constituir-se em uma área de pesquisa muito importante atualmente (Ashburner et al., 2000; Notebaart et al., 2005). Entretanto, ainda é um grande desafio extrair o máximo de informações possíveis dos genomas sequenciados (Tatusov et al., 1997; 2003).

## 1.2 BREVE HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DA GENÔMICA

As primeiras iniciativas da criação de metodologias de sequenciamento foram direcionadas às moléculas de RNA, tais como RNA ribossomal (rRNA), RNA transportador (tRNA) e genomas de RNA fita simples de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias), em razão do tamanho reduzido, geralmente menores do que moléculas de DNA eucariótico, e pelo fato de não possuírem fita complementar. Além disso, as enzimas RNases capazes de clivar sequências de RNA em fragmentos menores já eram conhecidas nessa época (Heather; Chain, 2016). Em 1965, Robert Holley e colaboradores determinaram, através de diversos processos de digestão enzimática, a sequência de um tRNA de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo esta a primeira sequência nucleotídica a possuir estrutura conhecida (Holley et al., 1965).

O primeiro genoma completo foi sequenciado em 1976, o genoma RNA bacteriófago MS2, cuja sequência foi determinada diretamente de uma sequência de RNA com 3.569 nucleotídeos (Fiers et al., 1976), entretanto o primeiro sequenciamento completo de um gene codificante de proteína, um capsídeo do bacteriófago MS2, foi realizado quatro anos antes, em 1972, através do método de sequenciamento desenvolvido por Sanger, Walter Fiers e sua equipe. Após essa primeira experiência, Walter Gilbert e Frederic Sanger anunciaram o desenvolvimento de um método rápido para sequenciamento, um método de sequenciamento químico (Maxam; Gilbert, 1977). No sequenciamento do genoma do bacteriófago  $\phi$ X174 utilizou-se o método com Dideoxi nucleotídeos (Sanger et al., 1977); e em 1982, no sequenciamento do genoma do bacteriófago  $\lambda$  com 48.502 bases (Sanger et al., 1982). Esses eventos deram início ao desenvolvimento da genômica no mundo. Desde então, as técnicas de sequenciamento passaram a evoluir de forma rápida e a geração de dados produzidos em larga escala possibilitou o desenvolvimento de estudos de genômica comparativa. O primeiro estudo realizado em 1986 demonstrou a relação entre os genomas do vírus da varicela e do vírus Epstein-Barr (Kookin, 2002).

Em 1995, foi concluído o sequenciamento do genoma do *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al., 1995), inaugurando a "Era Genômica" propriamente dita, com o estudo de genomas completos de organismos celulares. O desenvolvimento de uma nova metodologia de sequenciamento (Venter et al., 1996), conhecida como *whole-genome shotgun approach* (WGS), acelerou o sequenciamento de genomas, gerando uma quantidade cada vez maior de dados (Koonin, 2002). Em 1996, Goffeau e colaboradores finalizaram o sequenciamento do genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1996), e dois anos depois, em 1998, foi concluído o genoma do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Worm Sequence Consortium, 1998). Posteriormente ao genoma de *C. elegans*, outros genomas de importantes modelos biológicos foram finalizados, o da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* que possuía aproximadamente 122 milhões de pares de bases de DNA e codifica 17 mil proteínas (Adams et al., 2000) e o da planta *Arabidopsis thaliana* com genoma de aproximadamente 116 milhões de pares de bases de DNA e

33 mil proteínas (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Dando prosseguimento a estas análises genômicas, podemos dizer que a publicação do genoma rascunho do homem (*Homo sapiens*) no ano de 2001, tanto pelo consórcio público (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) como pelo consórcio privado (Venter et al., 2001), marca profundamente a história da genômica, visto que o sequenciamento de nosso genoma levou mais de uma década para ser realizado, ao custo de pelo menos US\$ 500 milhões.

## 2 | SEQUENCIAMENTO DE DNA

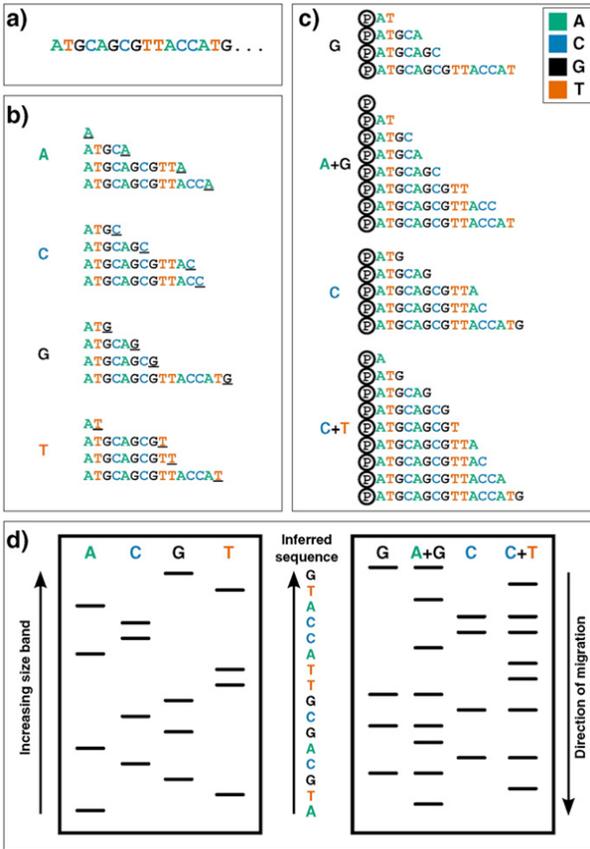
### 2.1 PRIMEIRA GERAÇÃO DE TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO

As metodologias que deram origem ao que se considera como primeira geração de sequenciamentos de ácidos nucleicos foram desenvolvidas na década de 1970, com base em uma nova técnica de análise baseada na fragmentação aleatória de sequências de DNA nucleotídicas marcadas radioativamente através de reações químicas de clivagem de cadeias em bases específicas, utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida para a análise dos tamanhos dos fragmentos e detecção da posição de cada nucleotídeo na sequência de interesse (Figura 1). Esta técnica foi amplamente adotada pela comunidade científica, sendo considerada um marco na história das tecnologias de sequenciamento (Heather; Chain, 2016).

Também em 1977, foi desenvolvido o sequenciamento Sanger, criado pelo cientista que deu nome à técnica. Esta metodologia causou grande impacto no sequenciamento de ácidos nucleicos e consiste na utilização de análogos químicos de dNTPs, os ddNTPs (dideoxirribonucleotídeos trifosfatados) que não possuem o grupamento hidroxila 3' requerido para a extensão das cadeias de DNA através da formação de ligações com o fosfato 5' do dNTP seguinte. Através do preparo de quatro reações de PCR, cada uma contendo um tipo de ddNTP com maiores concentrações em relação ao seu dNTP análogo, são obtidos fragmentos de DNA de todos os tamanhos possíveis. Ao analisar os resultados em gel de poliacrilamida, é possível, através da utilização de autorradiografia, inferir qual nucleotídeo compunha a última posição na sequência original (Figura 1b e 1d) (Heather; Chain, 2016; Sanger; Nicklen; Coulson, 1977). Melhorias foram feitas à técnica original do sequenciamento Sanger, como a substituição da detecção de fragmentos por radiomarcagem pela detecção por fluorescência, além da utilização de eletroforese capilar em substituição ao gel de poliacrilamida. Estas modificações automatizaram os processos de sequenciamento e abriram as portas para o surgimento das plataformas comerciais de sequenciamento (Heather; Chain, 2016)

### 2.2 SEGUNDA GERAÇÃO DE TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO

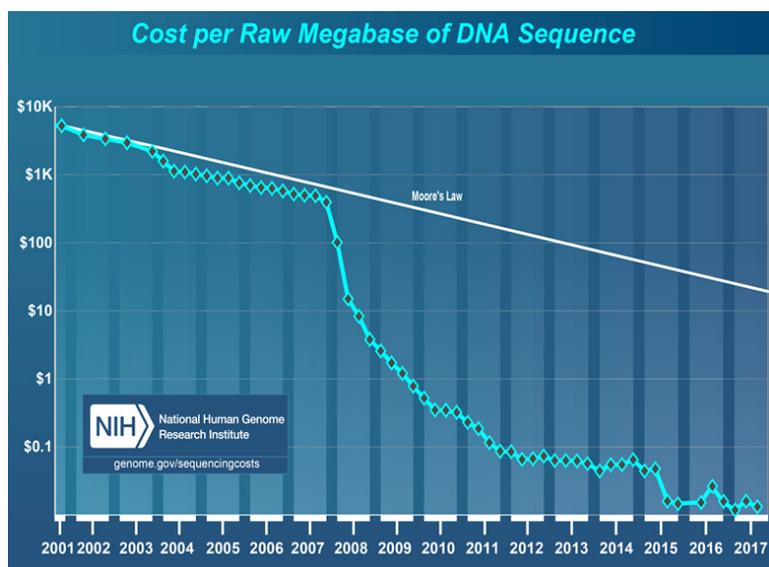
A automação dos processos de sequenciamento de DNA sofreu avanços consideráveis



**Figura 1.** Primeira geração de tecnologias de sequenciamento. Legenda: (A) Sequência de DNA hipotética a ser sequenciada. (B) Sequenciamento por terminação de cadeia de Sanger: ddNTP rádio ou fluorescentemente marcados (que uma vez incorporados a uma sequência, impedem sua extensão) são incluídos em reações de PCR em baixas concentrações. Desta forma, em cada uma das quatro reações preparadas com um ddNTP específico, fragmentos de sequência são gerados com truncamentos nas extremidades 3' à medida que há a inclusão de um ddNTP na sequência. (C) Método do sequenciamento químico de Maxam e Gilbert: primeiramente, a sequência de DNA é marcada, de modo geral, pela inclusão de um P32 radioativo na extremidade 5' (representado pelo símbolo Ⓟ). Diferentes tratamentos químicos são aplicados para, seletivamente, remover as bases das pequenas porções de DNA. O composto hidrazina remove bases pirimidínicas (citosina e timina), enquanto hidrazina em altas concentrações de sal remove apenas citosinas. Ácidos podem ser utilizados para a remoção de bases purínicas (adenina e guanina), com dimetil sulfato sendo utilizado para a remoção de apenas guaninas (embora adeninas também possam ser afetadas em uma proporção muito menor). O composto piperidina é utilizado para a clivagem da ligação fosfodiéster, produzindo fragmentos de tamanhos variados. (D) Os fragmentos gerados nas duas metodologias podem ser visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida de alta resolução: as sequências são inferidas a partir da leitura de baixo para cima no gel, uma vez que os fragmentos de menor tamanho migram mais rapidamente. No sequenciamento Sanger (esquerda) os nucleotídeos da sequência são inferidos através da localização da faixa em que o fragmento está presente, pois cada faixa representa um ddNTP. O sequenciamento Maxam-Gilbert requer um passo lógico adicional: timinas (T) e adeninas (A) podem ser diretamente inferidas através da localização do fragmento nas faixas da pirimidina e purina, respectivamente, enquanto guaninas (G) e citosinas (C) são indicadas pela presença dupla de fragmentos nas faixas "G" e "A+G" e "C" e "C+T", respectivamente. Fonte – Adaptado de Heather; Chain (2016).

a partir de meados da década de 80 com o surgimento da segunda geração de métodos de sequenciamento (Figura 3). A segunda geração marcou o início do sequenciamento de “próxima” geração (NGS, *next-generation sequencing*), um conjunto de tecnologias avançadas com a capacidade de produzir alto número de dados por baixo custo em comparação aos métodos baseados na técnica de Sanger (Figura 2) (Escalona; Rocha, Posada, 2016).

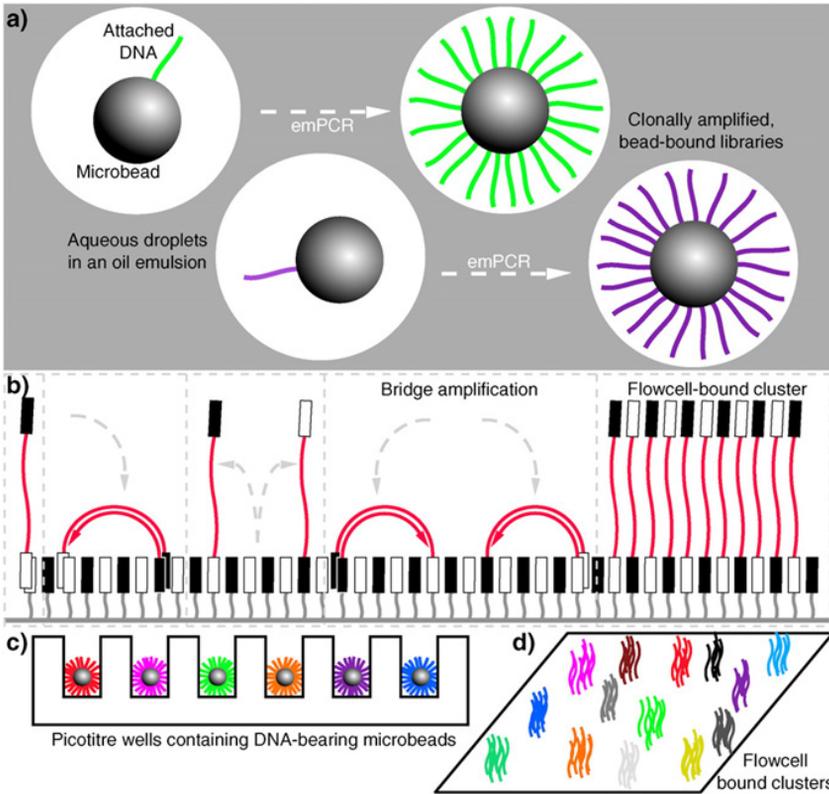
A era do *big data* (grandes dados) promovida pelas plataformas NGS modificou irreversivelmente as ciências ômicas e conseqüentemente a biologia de sistemas, aumentando exponencialmente a quantidade de informações biológicas disponíveis e tornando a bioinformática ainda mais integrada e necessária. O advento das tecnologias NGS também possibilitou o desenvolvimento de outras abordagens, como, por exemplo, o sequenciamento profundo de transcriptomas por RNA-seq e *Ribosome profiling*, que beneficiam amplamente análises proteômicas e peptidômicas.



**Figura 2.** Progressão anual do valor, em dólar, de cada megabase (1 milhão de bases) de DNA sequenciado com uma qualidade específica. Legenda: Entre 2007 e 2008 houve a explosão do sequenciamento Illumina (principal plataforma de segunda geração), e conseqüentemente a alta produção de dados a baixo custo. Fonte - National Human Genome Research Institute <[genome.gov/27541954/dna-sequencing-costs-data](http://genome.gov/27541954/dna-sequencing-costs-data)>.

As principais plataformas comerciais de sequenciamento de segunda geração incluem o Genome Sequencer da Roche 454 Life Sciences (sequenciamento 454) e SOLiD System da Applied Biosystems, que já foram descontinuadas, além do Solexa Genome Analyzer da Illumina (sequenciamento Illumina) (Miller; Koren; Sutton, 2010). O principal ponto negativo das plataformas de segunda geração é o tamanho dos fragmentos de sequenciamento produzidos (*reads*) (Baker, 2012). Os *reads* gerados pelos sequenciamentos em base Sanger variam entre 500 e 1000 pares de base (pb), enquanto as principais plataformas de segunda geração produzem *reads* menores, que variam em torno de 400 pb na plataforma 454 e 100 pb ou menos nas plataformas Illumina e SOLiD (Miller; Koren; Sutton, 2010).

Em 2007, por exemplo, uma única corrida de sequenciamento produzia no máximo um gigabase de dados (1Gb). Em 2014 ultrapassou-se um terabase (1Tb) de dados em uma corrida. Tendo-se em consideração a habilidade e velocidade de gerar grandes volumes de dados, o se-



**Figura 3.** Amplificação paralelizada em algumas plataformas de sequenciamento de DNA de segunda geração. Legenda: (A) Moléculas de DNA amplificadas de forma clonal em PCR de emulsão (emPCR). Através da ligação de adaptadores, e da reação de PCR, há a produção de bibliotecas de DNA com terminações 5' e 3'. Estas seqüências são divididas em fitas únicas e atracadas a microesferas através dos adaptadores. O complexo microesfera-DNA é emulsificado através da utilização de reagentes de amplificação aquosa em óleo, produzindo gotículas de emulsão com apenas uma microesfera (ilustrado nas gotículas mais à esquerda com diferentes moléculas indicadas em diferentes cores). A amplificação clonal ocorre durante o emPCR, quando cada molde de DNA é fisicamente separado dos outros, com suas moléculas filhas permanecendo ligadas à microesfera. Esta é a base conceitual dos sequenciamentos das plataformas 454, Ion Torrent e dos protocolos de sequenciamento Polony. (B) Utilização de pontes de amplificação para a produção de aglomerados de populações de DNA clonal em uma reação de PCR em fase sólida planar, conforme sequenciamento Solexa/Illumina. Moléculas de DNA fita simples com seqüências terminais complementares a dois diferentes adaptadores se anelam quando o microcompartimento (ou célula) de amplificação é lavado e são replicadas em uma área confinada durante o PCR isoterma, curvando-se sobre adaptadores próximos, produzindo um aglomerado local de moléculas idênticas. Os esquemas (c) e (d) ilustram como estas duas diferentes formas de amplificação clonal de seqüências podem ser lidas de uma forma altamente paralelizada: as microesferas produzidas no emPCR são lavadas em uma placa com múltiplos poços com tamanho suficiente para alocar apenas uma microesfera. (C) Enzimas DNA polimerase são adicionadas aos poços e cada nucleotídeo é retirado por vez e a incorporação de cada dNTP monitorada via pirofosfato ou liberação de íons de hidrogênio. (D) Os agrupamentos de cada célula de fluxo produzidos através das pontes de amplificação são detectados por nucleotídeos terminadores reversíveis fluorescentes presentes no final da seqüência em cada reação de extensão, requerendo medição a cada ciclo seguida de remoção de terminadores. Fonte – Adaptado de Heather; Chain (2016).

quenciamento de nova geração permite rapidamente a geração de bases de dados inteiras. Nos dias de hoje, pode-se sequenciar mais de cinco genomas humanos em uma corrida de aproximadamente uma semana, com custos de reagente de menos de cinco mil dólares por genoma. Comparado com o primeiro genoma humano, sequenciado em cerca de 10 anos, com o método de Sanger, e ao custo estimado de três bilhões de dólares, a tarefa de sequenciar um organismo atualmente é mais rápida e menos custosa.

Em consequência dessa explosão na quantidade de sequências de DNA disponíveis, o volume de dados disponíveis no GenBank está aumentando de forma exponencial. Estima-se que essa base de dados dobre de tamanho a cada 1,4 anos (Higgs; Attwood, 2005). Atingimos um estágio em que os computadores são essenciais para armazenar, recuperar e analisar dados de sequências biológicas. Sendo considerada por muitos, o centro da pesquisa na biologia moderna, especialmente nos estudos de genomas/metagenomas inteiros e na análise de dados de sequenciadores de nova geração, a bioinformática auxilia na obtenção de dados de qualidade e na construção e melhoria de algoritmos mais eficientes para a análise de dados (Metzker, 2011).

Podemos observar, por exemplo, na tabela 1 abaixo a quantidade de bases de DNA e de sequências que sequenciadores Illumina podem gerar (<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/comparison-tool.html>) e verificamos que, dependendo do modelo, pode-se chegar à marca de 20 bilhões de leituras por corrida e 6 Tb de informação gerada.

**Tabela 1.** Tabela comparativa entre os diferentes modelos de sequenciador da Illumina, onde podemos observar a quantidade de informação em Gigabase (Gb) que cada equipamento gera, o tempo de cada corrida, a quantidade de leituras por amostra, o tamanho máximo das leituras por equipamento, a quantidade de amostras diferentes que pode ser analisada em uma única corrida, além do preço relativo por amostra em cada equipamento.

SEQUENCIADOR	QUANTIDADE DE DADOS GERADOS	TEMPO DE CORRIDA	LEITURAS POR CORRIDA	TAMANHO MÁXIMO DAS LEITURAS	AMOSTRAS POR CORRIDA	PREÇO RELATIVO POR AMOSTRA
iSeq 100	1.2 Gb	9-17.5 hr	4 milhões	2 × 150 bp	1-8	Custo alto
MiniSeq	1.8-7.5 Gb	24 hr	8-25 milhões	2 × 150 bp	50	Custo médio
MiSeq	0.3-15 Gb	5-55 hr	1-25 milhões	2 × 300 bp	1-384	Custo alto
NextSeq	20-120 Gb	11-29 hr	130-400 milhões	2 × 150 bp	1	Custo alto
HiSeq 4000	125-1500 Gb	< 1-3.5 dias	2.5-5 bilhões	2 × 150 bp	6-12	Custo médio
NovaSeq 6000	134-6000 Gb	13-44 hr	Até 20 bilhões	2 × 150 bp	4-48	Custo baixo

### 2.3 TERCEIRA GERAÇÃO DE TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO

As tecnologias PacBio e Oxford Nanopore foram desenvolvidas mais recentemente, e permitem o sequenciamento de longas sequências de DNA. Estas novas tecnologias geram leituras com > 10Kb. Porém, apresentam taxa de erro superior ao Illumina.

## 3 | ESTRUTURA E FUNÇÃO DE GENOMAS

Mas o que é um genoma? Conjunto haploide de informações presentes no DNA de determinado organismo. E qual sua função? Existem os genomas procarióticos e genomas eucarióticos que são formados por sua vez por cromossomos, formados por uma única molécula de DNA. O genoma humano apresenta 22 pares de cromossomos autossomos mais um par sexual (XX ou XY); já os procariotos de modo geral apresentam somente um cromossomo. O genoma consiste na anatomia molecular de uma espécie e representa a descrição de todos os genes, elementos regulatórios ou regiões não-funcionais de um determinado organismo. Além de abrir portas para estudos mais específicos, baseados em genes e proteínas de potencial biotecnológico, estudos evolutivos, explicações sobre aspectos da biologia do organismo e genômica comparativa. Como mencionado por Craig Venter, “A sequência é apenas o início”. Considerando-se um genoma procarioto, podemos encontrar as seguintes características de um genoma procarioto: ausência de um complemento diploide de genes (alelos); uso de quase todo o genoma na codificação e na regulação (superposição); colinearidade dos genes e seus produtos proteicos; tendência de apresentar genes codificando funções relacionadas agrupados (óperons); existência de unidades genéticas acessórias (plasmídios, bacteriófagos e transposons), ao passo que os genomas eucarióticos de modo geral características contrárias, são pelo menos diploides (de modo geral), pouco percentual de sequências codificantes de proteínas no genoma, ausência de óperons.

## 4 | METAGENÔMICA

### 4.1 DEFINIÇÃO DE METAGENÔMICA

O termo metagenômica, ou seja, além dos genomas, refere-se a uma abordagem independente de cultivo baseada na análise de sequências de DNA de uma mistura de populações microbianas, ou seja, é uma análise genômica de DNA microbiano total extraído diretamente de amostras ambientais, clínicas, ou industriais (Handelsman et al., 1998). A metagenômica vem sendo aplicada para responder questões fundamentais da microbiologia, como: Quantos são? Quem são? E o que fazem os micro-organismos? Por isso, a metagenômica representa uma importante ferramenta para estudo da ecologia microbiana e prospecção do potencial metabólico através da análise da diversidade taxonômica e localização de genes e óperons responsáveis pela síntese de moléculas com propriedades de interesse biotecnológico (Handelsman, 2004). A metagenômica revolucionou nossa habilidade de caracterizar o potencial metabólico e a taxonomia de micro-organismos ambientais, através de comparações de todo o conteúdo gênico das comunidades microbianas, para além de marcadores ribossomais como o gene 16S rRNA. Portanto, é possível obter informações taxonômicas e metabólicas de um ambiente simulta-

naemente. Com o auxílio das novas plataformas de sequenciamento de alta vazão, hoje é possível conhecer detalhadamente a assinatura genética de ambientes distintos. A metagenômica oferece nova luz à ecologia microbiana, podendo revelar interações intra e interespecíficas dos organismos que compartilham um mesmo hábitat e ainda identificar organismos que vivem em hábitats específicos (Wooley; Godzik; Friedberg, 2010).

## 4.2 HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DA METAGENÔMICA

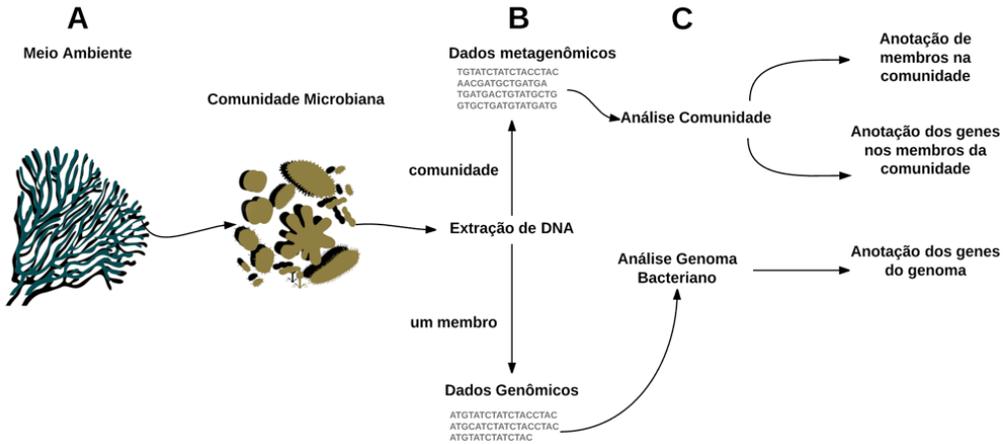
As técnicas moleculares, como sequenciamento de moléculas de DNA, surgidas e difundidas nas décadas de 1960 e 1970, tornaram-se eficientes para o estudo da diversidade de comunidades microbianas (Stahl et al., 1984). Carl Woese provou em seus estudos a existência dos três domínios da vida (Archaeaia, Bacteria, e Eucarya) através do estudo dos cronômetros moleculares rRNA (Woese; Fox, 1977). As análises independentes de cultivo através de bibliotecas 16S rRNA permitiram acesso à diversidade de comunidades microbianas de uma amostra sem necessidade de cultivo e isolamento. Dessa forma, a então desconhecida diversidade de ambientes completamente distintos, do bacterioplâncton a ambientes extremos, começou a ser elucidada. Subsequentemente, foi sugerida a abordagem metagenômica que avalia o conjunto completo de genes em uma determinada amostra, permitindo analisar a diversidade taxonômica e funcional.

### 4.2.1 ABORDAGEM METAGENÔMICA

As duas abordagens no estudo de diversidade microbiana são a dependente e a independente de cultivo. Ambas permitem caracterizar a diversidade, por isso são consideradas complementares. A diversidade de micro-organismos presentes nos ambientes é extremamente grande. Por exemplo, estima-se que apenas 0,001 a 0,1% dos micro-organismos da água do mar são cultiváveis (Amann; Ludwig; Schleifer, 1995), por isso são cada vez mais empregadas abordagens independentes de cultivos para estudar a diversidade, dinâmica e biogeografia de comunidades microbianas.

Para desenvolver um estudo com abordagem metagenômica, são seguidas diversas etapas, tais como coleta de amostras ambientais, extração de ácidos nucleicos, sequenciamento, análises de bioinformática, e modelagem matemática (Figura 4). A partir do momento em que os objetivos da pesquisa são definidos e todo o delineamento experimental elaborado, os pesquisadores vão a campo (ou laboratório) coletar as amostras. Diversos estudos com abordagem metagenômica foram feitos em invertebrados marinhos, sedimentos, fezes, material em decomposição, plantas, centrais de tratamento de esgoto. Para amostras sólidas, os pesquisadores devem coletar e preservar o material, geralmente, congelando-o. Se as amostras estiverem em estado líquido, por exemplo, água do mar, um determinado volume é filtrado e o filtro contendo a comunidade microbiana é preservado para posterior análise.

Em laboratório o DNA é extraído e purificado através de diversas reações químicas para que possa ser sequenciado. A extração do DNA consiste em diversas etapas. As células microbianas devem ser rompidas para liberar seu material genético na solução; os componentes ce-



**Figura 4.** Workflow para análise de dados genômicos e metagenômicos: A) Amostra microbiana onde em metagenômica se estuda a comunidade e em genoma um membro da comunidade que pode passar por cultura; B) O DNA é extraído para sequenciamento; C) Em metagenômica se estuda quem são os organismos na comunidade microbiana e o papel biológico dos genes e em genômica o papel do organismo em estudo no ambiente.

lares (e.g. proteínas, lipídeos, RNA) devem ser removidos, através de digestão enzimática e separação físico-química. O DNA presente na solução é precipitado, lavado e quantificado para que a solução tenha o mínimo de impurezas. Com a solução de DNA purificado, bibliotecas metagenômicas são construídas e sequenciadas (ver seção Sequenciamentos, do presente capítulo). O resultado obtido pelas reações de sequenciamento são arquivos de texto em formatos específicos (e.g. fastq e fasta) contendo a sequência de nucleotídeos e a qualidade da leitura da máquina para cada base nitrogenada. Nesses arquivos estão presentes misturas de genomas e genes de toda a comunidade microbiana. O próximo desafio é atribuir significado biológico para cada uma das sequências através de ferramentas de bioinformática. Esse processo computacional é chamado de anotação.

#### 4.2.2 ANOTAÇÃO DOS METAGENOMAS

Um grande gargalo para os trabalhos que envolvem a abordagem metagenômica é a anotação. Atualmente a quantidade de dados de genomas e metagenomas gerados é muito grande. Para atribuir significado biológico a cada uma das sequências, estas devem ser comparadas com banco de dados contendo informações sobre os genomas, genes e taxonomia dos micro-organismos conhecidos (ver capítulo "Gestão de dados de biotecnologia marinha"). Há diversas ferramentas para realizar essa busca nos bancos de dados, porém existem plataformas que realizam toda a busca e quantificação dos resultados da busca automaticamente. Um exemplo de plataforma é o servidor MG-RAST (*MetaGenomic Rapid Annotation by Subsystem Technology*) (Meyer et al., 2008). O MG-RAST faz a anotação dos metagenomas através de subsistemas. Um subsistema é definido como um conjunto de papéis funcionais que, juntos, implementam um

determinado processo biológico ou estrutural (Overbeek et al., 2005). Cada subsistema é curado, ou seja, revisado, por um grupo de cientistas especializados em vias metabólicas específicas, categorizando os principais genes envolvidos nessas vias, possibilitando aos pesquisadores interpretação mais fácil e geral. Por exemplo, quando nos deparamos com o termo “Metabolismo secundário”, temos noção imediata de que se trata de algo que é metabolizado para defesa do organismo, não é mesmo? E que tal “Fosforibosiltranilato isomerase”? Este é um gene que é parte do metabolismo de produtos secundários. Geralmente os cientistas procuram entender o potencial metabólico em termos mais amplos.

## 5

## FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA PARA A ANOTAÇÃO DE GENOMAS E METAGENOMAS

O RAST (anotação rápida usando tecnologia de subsistemas) (Aziz et al., 2008) e RASTtk (RAST tool kit) (Brettin et al., 2015) são duas das ferramentas mais conhecidas para anotação de genomas microbianos. RAST foi lançado em 2008, com o intuito de anotar genomas microbianos de forma automática usando o banco de dados SEED. Esse banco de dados foi desenvolvido pelos membros do laboratório nacional de Argonne (Estados Unidos), em 2004, com o objetivo de agrupar proteínas que implementam um processo biológico específico ou uma estrutura complexa em um subsistema. Os subsistemas do SEED são divididos em três níveis, em que o primeiro nível é o mais geral e o terceiro é a classe mais específica e uma função associada ao gene.

O primeiro passo antes de anotar um genoma no RAST é fazer a montagem do genoma usando uma ferramenta como SPAdes que gerará sequências longas, as quais serão submetidas ao servidor do RAST onde a análise é realizada. Uma das vantagens de usar o RAST é que o programa é livre para o uso de qualquer pesquisador por meio de um website, que facilita o uso, pois não requer a instalação de múltiplos programas. Entretanto, apesar das vantagens o RAST tem suas limitações: por exemplo, as configurações padrões do RAST nem sempre são a melhor escolha de anotação. Por outro lado, o RASTtk permite construir uma anotação personalizada com foco na ferramenta para encontrar as regiões dos genes, softwares de anotação, e diferentes formatos de saída.

Entre as diferenças entre RAST e RASTtk está o modo em que os programas encontram as regiões dos genes (ORFs). Por exemplo, o RAST apenas usa Glimmer3, mas o RASTtk abre a possibilidade de o usuário escolher entre Glimmer3 (Delcher et al., 2007), GeneMarkS (Besemer et al., 2001) e Prodigal (Hyatt et al., 2010). Outra grande diferença é o modo como RASTtk anota o genoma: k-mers são usados (8 aminoácidos) para encontrar ocorrências entre ORFs e banco de dados. O RAST é mais tradicional, usa BLAT para alinhar as ORFs contra o SEED.

A Tabela 2 contém um resumo das principais ferramentas para anotar genomas e metagenomas, tanto taxonômica como funcionalmente.

**Tabela 2.** Lista de ferramentas para anotação taxonômica e funcional de metagenomas e anotação de genomas.

ANÁLISE	NOME DA FERRAMENTA	TIPO DE ANÁLISE	MÉTODO	WEBPAGE	VERSÃO ONLINE
Metagenômica	FOCUS	Anotação taxonômica	k-mers e NNLS	<a href="http://edwards.sdsu.edu/FOCUS">http://edwards.sdsu.edu/FOCUS</a>	Sim
	MG-RAST	Anotação taxonômica e funcional	Homologia	<a href="https://metagenomics.anl.gov">https://metagenomics.anl.gov</a>	Sim
	SUPER-FOCUS	Anotação funcional	Homologia em um banco de dados reduzido	<a href="http://edwards.sdsu.edu/SUPERFOCUS">http://edwards.sdsu.edu/SUPERFOCUS</a>	Não
	RTMG		k-mers	<a href="https://edwards.sdsu.edu/rtmg">https://edwards.sdsu.edu/rtmg</a>	Sim
Genômica	RASTtk			<a href="https://rast.nmpdr.org">https://rast.nmpdr.org</a>	Não
	RAST				Homologia

Em metagenômica, o uso de grandes arquivos para análise tem se tornado cada dia mais comum, devido à redução no custo de sequenciamento e ao acesso ubíquo a plataformas de sequenciamento. As ferramentas computacionais para a interpretação da bioinformática de dados metagenômicos, entretanto, não escalam bem com volumes crescentes dos dados, impedindo a análise oportuna e diminuindo a informação obtida desses arquivos. A maioria das ferramentas de anotação atuais usa homologia, isto é, alinhamentos de todas as sequências com um banco de dados de referência (Mitra et al., 2011). Outro método muito usado são *k*-mers que usam subsequências de tamanho *k* para encontrar ocorrências nas sequências de DNA. Por exemplo, Kraken (Wood; Salzberg, 2014) usa *k*-mers de 31 nucleotídeos para mapear o banco de dados. Os valores *k*-mer maiores aumentam a precisão em comparação com tamanhos menores de *k*-mer (Silva et al., 2014). Um dos problemas em usar maiores tamanhos de *k*-mer, no entanto, é a grande quantidade de memória RAM necessária para armazenar o banco de dados.

Os *pipelines* baseados em homologia geralmente usam ferramentas de busca de sequência para identificar o melhor representante em um grande banco de dados sequência por sequência. Duas populares ferramentas de anotação taxonômica e funcional são MG-RAST (Meyer et al., 2008) e MEGAN 6 (Huson et al., 2016). Ambas classificam espécies e funções presentes em amostras de metagenomas através do alinhamento contra um banco de dados. Atualmente, MG-RAST primeiro identifica as regiões dos genes (ORFs) nas sequências com FragGeneScan (Rho et al., 2010) e então produz alinhamentos das sequências de aminoácidos traduzidas contra o banco de dados M5nr (Wilke et al., 2012) usando o alinhador BLAT (Kent, 2002). MEGAN cria perfis taxonômicos com base nos arquivos de resultados tabulados criados a partir de programas como o BLAST (Altschul et al., 1997), ou alternativas de alinhadores mais rápidas, incluindo DIAMOND (Buchfink et al., 2015) e RAPSearch2 (Zhao et al., 2012) contra o banco de dados não redundante (NR). Uma limitação de abordagens baseadas em homologia é o fato de que todas as sequências da consulta têm de ser alinhadas com todas as sequências na base de dados e à

medida que o tamanho dos *inputs* aumenta, a análise pode prolongar-se de dias para semanas ou meses (Silva et al., 2014).

Abordagens baseadas em composição exploram perfis de composição k-mer para identificar taxa na amostra metagenômica. Esses métodos não utilizam alinhamento, o que acelera o perfil de dados (Gao et al., 2015). Por exemplo, uma das primeiras ferramentas de anotação de metagenômas, PhyloPythia (McHardy et al., 2007), usa aprendizado de máquina and 4-mers (*k*-mers de tamanho 4) para classificar cada sequência no metagenome, mas se limita a sequências de metagenômas que são longas. Similarmente, FOCUS (Silva et al., 2014) usa mínimos quadrados não-negativos (NNLS) para classificar todos os tipos de amostras metagenômicas usando *k*-mers de 6, 7 ou 8 nucleotídeos.

Além do MG-RAST e MEGAN para anotação funcional de metagenomas, SUPER-FOCUS (anotação com um banco de dados reduzido de subsistemas usando FOCUS) (Silva et al., 2015) e RTMG (metagenômica em tempo real) (Edwards et al., 2012) são alternativas mais rápidas (em tempo de análise) e precisas que os dois competidores para a anotação funcional de dados metagenômicos. SUPER-FOCUS usa o FOCUS para fazer uma anotação rápida da comunidade microbiana presente na amostra e usa homologia para alinhar os dados apenas contra os subsistemas que se presume estarem presentes na comunidade microbiana, diferentemente do MG-RAST e MEGAN que alinham os dados contra um banco de dados completo, o que demanda muito mais tempo. RTMG usa um banco de dados com todas as assinaturas que são únicas de tamanho *k* (onde *k* varia de 7 a 12 aminoácidos) relacionadas a um subsistema, e usa essas assinaturas para realizar a classificação funcional dos dados metagenômicos.

## 6

## APLICAÇÕES NA BIOTECNOLOGIA MARINHA

Além de identificar as espécies e funções presentes em uma amostra, a anotação de metadados de metagenomas permite análise ecológica detalhada de dados microbianos, especialmente ligando genótipos e fenótipos, medidas biogeoquímicas e localizações geográficas (Haggerty; Dinsdale, 2017). Um fator essencial para a ecologia microbiana é a capacidade de comparar as comunidades através de descrições quantitativas da diversidade, incluindo o número de espécies (riqueza), sua abundância relativa (uniformidade) e vários índices de diversidade que levam em conta a riqueza e uniformidade. As medidas fundamentais para a diversidade são as identificações de unidades biológicas reais, das quais a diversidade é derivada. Na ecologia microbiana, essas unidades podem ser definidas em diferentes níveis taxonômicos, variando de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) a filós (Youssef et al., 2015).

A genômica e bioinformática voltada para a saúde pública e biodiversidade pode auxiliar nos estudos relacionados à biotecnologia, como vacinas, busca por novas moléculas com ação antimicrobiana, na área de epidemiologia, de resistência, de monitoramento e de saúde pública e ambiental. Por exemplo, a análise do sequenciamento do genoma de uma bactéria resistente a antibióticos permite descobrir os mecanismos de resistência. Já através da metagenômica é

possível detectarmos organismos patogênicos que não seriam detectados por métodos tradicionais de isolamento e cultivo, ou quando encontramos uma proteína que é um potencial alvo vacinal através de programas de predição de epítomos.

A genômica e a metagenômica podem inclusive mostrar um novo tipo de vírus, como o caso de um bacteriófago presente nas fezes humanas que possui incidência seis vezes maior nos metagenomas do que qualquer outro bacteriófago conhecido, e que nunca havia sido descrito. O trabalho de Dutilh e colaboradores (2014) encontraram um bacteriófago denominado crAssphage que possui como possível hospedeiro bactérias do tipo Bacteroidetes, demonstrando o potencial destas técnicas tanto para a descoberta de novas espécies como para vigilância e monitoramento.

Por meio do mapeamento de habitats e do estudo do funcionamento dos sistemas marinhos e associados (por ex., tapetes microbianos), será possível entender melhor o potencial das diferentes regiões e o papel da geodiversidade e da dinâmica marinha na estruturação da biodiversidade e da produtividade desses sistemas. O desenvolvimento da biotecnologia tem mostrado a importância do conhecimento, conservação e uso da biodiversidade. Quanto maior a biodiversidade, maiores são as possibilidades e oportunidades para descoberta e desenvolvimento de produtos e processos.

Atualmente, diversos estudos têm conseguido recuperar genomas completos dos metagenomas. Isso porque o sequenciamento de DNA se tornou mais acessível, a um custo muito menor nos últimos dez anos, e também graças a maior disponibilidade de recursos computacionais para realizar as análises de bioinformática. Essa etapa adicional (montagem de genomas) demanda altíssima capacidade de computação, porém após ter conseguido reconstruir os genomas, é necessário também anotá-los. Passos semelhantes aos mencionados acima são adotados para anotação, no entanto os resultados provenientes desses estudos revolucionaram diversos campos da biologia e da bioprospecção. Exemplos marcantes são estudos em aquíferos, que adicionaram uma ampla gama de grupos bacterianos à árvore da vida (Hug et al., 2015), e a descoberta de arqueias que dão pistas para a origem dos eucariotos (Spang et al., 2015).

A bioprospecção genômica e metagenômica microbiana visa à busca por genes com potencial biotecnológico. Por meio da bioinformática é possível definir as sequências gênicas de interesse geradas pelo sequenciamento de genomas. A genômica contribui para a geração da informação necessária acerca da estrutura e funções dos genes e tem estimulado inovações tecnológicas, com o desenvolvimento de novos produtos com maior valor agregado (Wargacki et al., 2012). No trabalho de Wargacki et al. (2012), foram empregados genes de vibrios para fermentação de alginato na engenharia genética, visando obter linhagens capazes de produzir etanol a partir de biomassa da alga *Laminaria*. Em outro exemplo, descobriram-se bactérias marinhas quimio-organotróficas fotossintetizantes (Amaral et al., 2012). A energia (ATP) produzida pelos micro-organismos na presença de luz por meio da ação da proteorodopsina pode ser convertida em bioenergia. Além disso, esses micro-organismos produzem várias enzimas, tais como proteases e lipases. O reduzido tempo de duplicação desses micro-organismos, a alta capacidade de produzir proteases, lipases e outras moléculas bioativas, e a versatilidade metabólica (crescimento com as mais variadas fontes de energia, incluindo maltose, quitina,

N-acetilglicosamina e hidrocarbonetos), parecem ser características promissoras para aplicações tecnológicas. Em outra frente de trabalho do nosso grupo, foi estabelecida vasta coleção de micro-organismos marinhos de diferentes regiões da costa brasileira ([www.taxvibrio.Incc.br](http://www.taxvibrio.Incc.br)). Dentre esses micro-organismos existem linhagens com grande atividade enzimática (agrolítica, proteolítica e lipolítica) (Alves et al., 2010; Chimetto et al., 2009; Santos et al., 2011). Novos ramos da vida ainda estão sendo descobertos por meio da genômica (Coutinho et al., 2018; Parks et al., 2017). Por exemplo, acreditava-se originalmente que as duas etapas do processo de oxidação da amônia em nitrato e nitrito fossem realizadas por consórcios separados de micro-organismos oxidantes de amônia e oxidantes de nitrito. Mas genomas reconstruídos de metagenomas (MAGs, *metagenome-assembled genomes*) do filo Nitrospira mostraram ser capazes de realizar ambas as etapas do processo de oxidação da amônia (Daimset al., 2015). Finalmente, a recuperação de MAGs de um aquífero profundo levou à descoberta do filo Bathyarchaeota (Evans et al., 2015). O conteúdo do genoma desses organismos revelou que o metabolismo do metano não se restringia à arqueia do filo Euryarchaeota como se sugeriu anteriormente (EVANS et al., 2015). A ecogenômica também revelou novos papéis ecológicos para micro-organismos que têm sido objeto de extensas pesquisas há décadas, como o SAR11 (Pelagibacterubique). Acreditava-se originalmente que esse clado estivesse limitado a ambientes marinhos óxicos, mas uma combinação de *single cell genomics* e metagenômica revelou que algumas linhagens dentro da SAR11 ocorrem em zonas mínimas de oxigênio (Giovannoni et al., 2017; Tsementzi et al., 2016). Esta linhagem de SAR11 possui uma enzima funcional de nitrato reductase que realiza a primeira etapa do processo de desnitrificação, demonstrando que os membros do SAR11 podem contribuir para a perda de nitrogênio oceânico. A alta similaridade entre linhagens óxicas e anóxicas sugere que a adaptação a ambientes anóxicos surgiu recentemente durante a evolução deste grupo (Tsementzi et al., 2016). Similarmente, as linhagens oceânicas de superfície e de profundidade de SAR11 mostraram um conteúdo genético surpreendentemente similar, mas diferenças sutis no tamanho dos genomas, nas regiões intergênicas e no conteúdo de aminoácidos que podem estar ligados a adaptações a esses dois nichos ecológicos diferentes (Cameron et al., 2014). Essas diferenças sutis entre as linhagens óxicas/anóxicas e de superfície/profundidade do SAR11 demonstram que esse grupo pode evoluir rapidamente a mudanças que permitem que essas bactérias ocupem outros nichos ecológicos.

## REFERÊNCIAS

Altschul, S.F. et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389-3402.

Alves, N. et al. (2010) Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. **Environmental Microbiology Reports.** 2: 90-95.

Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews.** 59:143-169.

- Amaral, G.R. et al. (2012) Genome sequence of the bacterioplanktonic, mixotrophic *Vibrio campbellii* strain PEL22A, isolated in the Abrolhos Bank. **J Bacteriol.** 194(10):2759–60.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature.** 408(6814):796–815.
- Ashburner, M. et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat Genet.** 25(1): p. 25–9.
- Aziz, R.K. et al. (2008) The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics.** 9: 75.
- Baker, M. (2012) De novo genome assembly : what every biologist should know. **Nature Methods.** 9(4).
- Baxevanis, D. (2002) **Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins**, Wiley Online Library. Volume 43, Second Edition DOI: 10.1002/0471223921.
- Besemer, J. et al. (2001) GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. **Nucleic Acids Res.** 29: 2607–2618.
- Brettin, T. et al. (2015) RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Sci. Rep.** 5: srep08365.
- Buchfink, B. et al. (2015) Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nat. Methods.** 12: 59–60.
- Cameron, J. et al. (2014) Single-cell enabled comparative genomics of a deep ocean SAR11 bathytype. **ISME J.** 8: 1440–1451.
- Chimetto, L.A. et al. (2009) Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). **J Appl Microbiol.**
- Consortium, T.H.M.P. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature.** 486: 207–214.
- Coutinho, F. et al. (2018) Metagenomics sheds light on the ecology of marine microbes and their viruses. **Trends Microbiol.** 26(11):955–965.
- Daims, H. et al. (2015) Complete nitrification by *Nitrospira bacteria*. **Nature.** 528: 504–50911.
- Evans, P.N. et al. (2015) Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. **Science.** 350: 434–8.
- Dutilh B.E., et al. (2014) A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. **Nat Commun.** 5:4498.
- Edwards, R.A. et al. (2012) Real time metagenomics: using k-mers to annotate metagenomes. **Bioinforma. Oxf. Engl.** 28: 3316–3317.
- Edwards, R.A. et al. (2006) Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. **BMC Genomics.** 7: 57.
- Escalona, M. et al. (2016) A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data. **Nature Reviews Genetics.** 17(8): 459–469.
- Evans, P.N. et al. (2015). Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. **Science.** 350: 434–8.
- Fiers, W. et al. (1976) Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. **Nature.** 260(5551):500–7.
- Fleischmann, R.D. et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science.** 269(5223):496–512.

- Gao, S. et al. (2015) Alignment-free methods for metagenomic profiling. **BMC Bioinformatics**. 16: P4.
- Garcia, G.D. et al. (2013) Metagenomic analysis of healthy and white plague-affected *Mussismilia braziliensis* corals. **Microb. Ecol.** 65: 1076-1086.
- Giovannoni, S.J. et al. (2017) SAR11 Bacteria: the most abundant plankton in the oceans. **Ann. Rev. Mar. Sci.** 9: 231-255
- Goffeau, A. et al. (1996) A vintage year for yeast and Yeast. **Yeast**. 12(16): 1603-5.
- Haggerty, J.M.; Dinsdale, E.A. (2017) Distinct biogeographical patterns of marine bacterial taxonomy and functional genes. **Glob. Ecol. Biogeogr.** 26: 177-190.
- Heather, J.M.; Chain, B. (2016) The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics*, v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016. Disponível em: HIGGS PG; ATTWOOD TK. **Bioinformatics and Molecular Evolution**. 2005. Wiley-Blackwell
- Handelsman, J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol Mol Biol Rev.** 68:669-685.
- Handelsman, J. et al. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem Biol.** 5:R245-9.
- Holley, R.W. et al. (1965) Structure of a ribonucleic acid. **Science**. 147(3664): 1462-1465.
- Hug, L.A. (2016) A new view of the tree of life. **Nature Microbiology**. 1(5): 16048. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>
- Huson, D.H. et al. (2016) MEGAN community edition - interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. **PLoS Comput. Biol.** 12: e1004957.
- Hyatt, D. et al. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics**. 11: 119.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. 409:860-921.
- Kent, W.J. (2002) BLAT - the BLAST-like alignment tool. **Genome Res.** 12: 656-664.
- Koonin, E.V.; Galperin, M.Y. (2002) **Sequence - Evolution - Function Computational Approaches in Comparative Genomics**, Kluwer Academic Publishers Group, 488 p., e-book: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=sef>).
- Lesk, A.M. (2012) **Introduction to genomics**. 2nd edition. p. 397.
- McHardy, A.C. et al. (2007) Accurate phylogenetic classification of variable-length DNA fragments. **Nat. Methods**. 4: 63-72.
- Maxam, A.M.; Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 74(2): p. 560-4.
- Meyer, F. et al. (2008) The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics** 9:386.
- Metzker, M.L. (2010) Sequencing technologies - the next generation. **Nat Rev Genet**. 11(1):31-46.
- Miller, J.R. et al. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**. 95(6): 315-327.
- Mitra, S. et al. (2011) Functional analysis of metagenomes and metatranscriptomes using SEED and KEGG. **BMC Bioinformatics**. 12: S21.
- Notebaart, R.A. et al. (2005) Correlation between sequence conservation and the genomic context after gene duplication. **Nucleic Acids Res.** 33(19): 6164-71.

- Overbeek, R. et al. (2005) The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**. 33:5691-5702.
- Parks et al. (2017) Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. **Nature Microbiology**. 2(11): 1533.
- Rho, M. et al. (2010) FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. **Nucleic Acids Res**. 38: e191-e191.
- Sanger, F. et al. (1982) Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. **J Mol Biol**. 162(4):729-73.
- Sanger, F. et al. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Nati. Acad. Sci**. 75(4): 59S-76S.
- Santos, E.O. (2011) Genomic and proteomic analyses of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* reveal a diverse virulence repertoire. **ISME J**. 5(9):1471-83.
- Silva, G.G.Z. et al. 2014. FOCUS: an alignment-free model to identify organisms in metagenomes using non-negative least squares. **PeerJ**. 2:e425.
- Silva, G.G.Z. et al. 2015. SUPER-FOCUS: A tool for agile functional analysis of shotgun metagenomic data. **Bioinformatics**. 32:354-361.
- Spang, A. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. **Nature**. 521(7551), 173-179. <https://doi.org/10.1038/nature14447>
- Stahl, D.A. (1984) Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. **Science**. 224:409-411.
- Staley, J.T.; Konopka, A. (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annu. Rev. Microbiol**. 39: 321-346.
- Takatani, N. et al. (2014) Draft genome sequences of marine flavobacterium *Algibacter lectus* strains SS8 and NR4. **Genome Announcements**. 2.6: e01168-14.
- Tatusov R.L. et al. (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. **BMC Bioinformatics**. 11(4): 41.
- Tatusov R.L. et al. (1997) A genomic perspective on protein families. **Science**. 278(5338): 631-7.
- Trindade-Silva, A.E. et al. (2012) Taxonomic and functional microbial signatures of the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **PLOS ONE**. 7: e39905.
- Tsementzi, D. (2016) SAR11 bacteria linked to ocean anoxia and nitrogen loss. **Nature**. 11;536(7615):179-83.
- Venter, J. et al. (2001) The sequence of the human genome. **Science**. 291(5507):1304-1351.
- Venter, J. et al. (1996) A new strategy for genome sequencing. **Nature**, 381(6581): 364-6.
- Wargacki, A.J. (2012) An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. **Science**. 335(6066):308-13.
- Wilke, A. et al. (2012) The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. **BMC Bioinformatics**. 13: 141.
- Wood, D. E.; Salzberg, S. L. (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome Biol**. 15: R46.
- Wooley, J.C. et al. (2010) A primer on metagenomics. **PLoS Comput Biol**. 6:e1000667.
- Worm Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, 282(5396):2012-8.
- Xu, J. (2006). Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Mol Ecol**. 15(7): 1713-31.

Youssef, N.H. et al. (2015) Assessing the global phylum level diversity within the bacterial domain: A review. **J. Adv. Res.** 6: 269–282.

Zhao, Y. et al. (2012) RAPSearch2: a fast and memory-efficient protein similarity search tool for next-generation sequencing data. **Bioinforma. Oxf. Engl.** 28: 125–126.





# TRANSCRIPTÔMICA E METATRANS- CRIPTÔMICA

Louisi de Oliveira<sup>a</sup>  
Gabriela Calegario<sup>a</sup>  
Giselle Cavalcanti<sup>a</sup>  
Adriana Fróes<sup>a</sup>

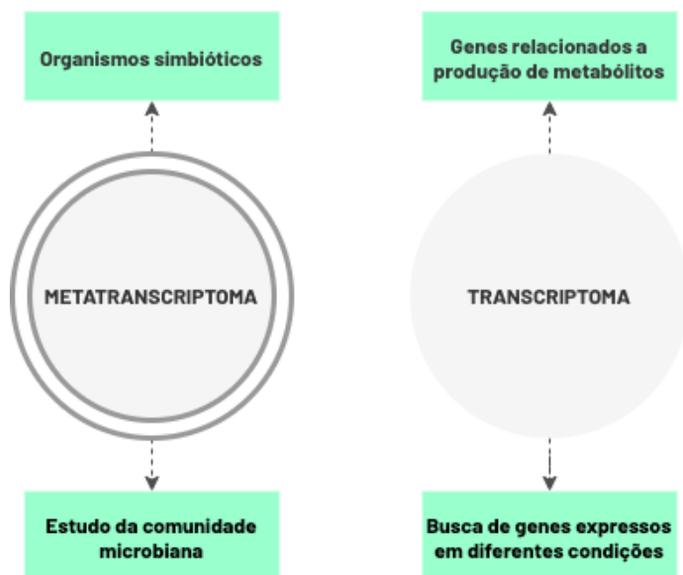
<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

## RESUMO

A transcriptômica e a metatranscriptômica adotam uma visão holística do perfil de expressão gênica de uma célula, tecido, organismo ou comunidade. Essas técnicas analíticas objetivam: (I) catalogar todos os possíveis tipos de transcritos, incluindo mRNAs, RNAs não codificantes e pequenos RNAs; (II) determinar a estrutura transcricional de genes; (III) quantificar alterações nos níveis de expressão dos transcritos durante o desenvolvimento e/ou em resposta a diferentes condições de estudo. Os transcriptomas fornecem informações essenciais sobre quando e quais genes estão sendo expressos em vários tipos de células e tecidos. No âmbito da biotecnologia marinha, o acesso a informações de transcriptomas possibilita conhecer genes de resistência a antibióticos ou defensivos agrícolas, bem como genes relacionados à síntese de metabólitos especializados com aplicações farmacológicas ou industriais. Ademais, o sequenciamento do metatranscriptoma em comunidades marinhas complexas possibilita conhecer o perfil genético de micro-organismos não cultiváveis, a composição taxonômica e a função desempenhada pelo microbioma ativo em um determinado ambiente. A metatranscriptômica tem revelado uma diversidade inexplorada de genes e rotas metabólicas com grande potencial biotecnológico, especialmente para as áreas de bioenergia e farmacologia. Neste capítulo, exploraremos ainda as estratégias de análise da expressão gênica. Atualmente, o RNA-seq (sequenciamento de RNA) é a abordagem mais utilizada para o estudo da transcriptômica e/ou metatranscriptômica. Para o acesso a esse mundo de informações geradas pelo sequenciamento de alta performance, dispõe-se de ferramentas de bioinformática que vêm sendo desenvolvidas e atualizadas, de modo a superar o desafio da análise de grandes quantidades de dados.

# 1 O QUE É TRANSCRIPTÔMICA E METATRANSCRIPTÔMICA

O termo transcriptoma refere-se ao conjunto completo de moléculas de RNA (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs) em um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular. Metatranscriptoma refere-se ao conteúdo total de transcritos gênicos (moléculas de RNA) em uma comunidade de organismos, compreendida como uma entidade única. A informação para a vida é armazenada na molécula de DNA, constituindo o genoma dos organismos, mas é expressa através da transcrição. Portanto, o transcriptoma é o reflexo direto da expressão gênica. Dessa maneira, o perfil do transcriptoma pode variar segundo a fase de vida, o estado fisiológico, os estímulos físicos, químicos, biológicos ou a ocorrência de doenças. O estudo do transcriptoma, isto é, as análises dos níveis de expressão gênica e sua regulação e estrutura, é essencial para a interpretação dos elementos funcionais do genoma, sendo, portanto, o centro dos interesses da genômica funcional (Figura 1). Para organismos com genomas grandes, ricos em íntrons e regiões repetitivas, o estudo do transcriptoma oferece a vantagem de permitir a análise apenas da fração codificante, reduzindo a complexidade para o estudo de organismos não-modelo.



**Figura 1.** Metatranscriptoma e transcriptoma: métodos diferentes para responder a diferentes perguntas.

As primeiras técnicas para o estudo de transcritos individuais foram utilizadas no final dos anos 70. Com o uso da enzima transcriptase reversa, bibliotecas de mRNA foram preparadas e convertidas em DNA complementar (cDNA), mais estável para o armazenamento (Sim et al., 1979). Nos anos 1980, o método de Sanger começou a ser usado para sequenciar transcritos individuais aleatórios dessas bibliotecas, chamadas *Expressed Sequence Tags* (ESTs). Esse

método, proeminente durante os anos 1990, foi usado como uma alternativa para determinar o conteúdo gênico de um organismo, sem ser necessário sequenciar o genoma completo. Em 1995, foi desenvolvido o método SAGE - Análise Serial da Expressão Gênica (*Serial Analysis of Gene Expression*), que empregava o sequenciamento Sanger de fragmentos concatenados de transcritos aleatórios. Uma variação do método SAGE que aplicava técnicas de sequenciamento de alta performance, conhecida como Análise Digital da Expressão Gênica, foi brevemente empregada. As comparações dos níveis de expressão por *Northern blotting*, e mais tarde, por PCR quantitativa foram também bastante utilizadas, porém são métodos laboriosos e apenas acessam uma pequena fração de um transcriptoma. Conseqüentemente, a maneira pela qual um transcriptoma é expresso e regulado continuou desconhecida até o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de alta performance.

Atualmente, as principais técnicas para o estudo de transcriptomas são microarranjo e RNA-seq. A técnica de microarranjo foi primeiramente empregada em 1995 e compara a abundância de transcritos entre amostras através da hibridização com um conjunto de sondas de DNA de sequência conhecida. Até o final dos anos 2000, uma variedade de microarranjos foi produzida para organismos modelos ou economicamente importantes. Avanços no *design* e na fabricação dos arranjos melhoraram a especificidade das sondas e permitiram que mais genes fossem testados em um único experimento. Além disso, a melhora na detecção de fluorescência aumentou a sensibilidade e a acurácia para a análise de transcritos pouco abundantes.

A primeira tentativa de estudo de um transcriptoma humano parcial aconteceu no início dos anos 1990 e reportou 609 sequências de RNA mensageiro do cérebro humano (Adams et al., 1991). Atualmente, transcriptomas de diferentes organismos, condições fisiológicas, e até de uma única célula são rotineiramente gerados. Essa explosão na transcriptômica foi governada pelo rápido desenvolvimento de novas tecnologias com menor custo e maior sensibilidade. De fato, a transcriptômica tem se beneficiado do rápido avanço tecnológico, especialmente nas áreas de sequenciamento de alta performance. O termo RNA-seq refere-se à metodologia de sequenciamento de transcritos completos - moléculas de RNA convertidas em cDNA - e oferece informações adicionais sobre a estrutura do transcrito, como, por exemplo, variantes de processamento (*splicing* alternativo). O Sequenciamento Massivo de Assinaturas Paralelas (MPSS, *Massively Parallel Signature Sequencing*) foi um dos primeiros exemplos de análise de expressão gênica em larga escala, gerando sequências de 16 a 20 pares de bases através de uma complexa série de hibridizações, e foi utilizado em 2004 para validar a expressão de  $10^4$  genes em *Arabidopsis thaliana* (Meyers et al., 2004). Já em 2006, a tecnologia 454 foi utilizada pela primeira vez para RNA-seq, gerando  $10^5$  sequências de transcritos (Bainbridge et al., 2006). O RNA-seq começou a ser amplamente utilizado depois de 2008, quando a inovadora tecnologia Solexa/Illumina permitiu a geração de  $10^9$  sequências de transcritos. O sequenciamento de alta performance foi essencial para o estabelecimento da transcriptômica como uma área de pesquisa em vertiginosa expansão.

A análise da expressão de RNA em diferentes condições ou escalas temporais nos permite conhecer o repertório gênico de uma comunidade (metatranscriptômica) ou organismo (transcriptômica) e compreender mecanismos de regulação da expressão. A transcriptômica também auxilia na inferência de funções de genes ainda não estudados e permite desvendar

vias metabólicas de interesse biotecnológico para a produção de fármacos, biopolímeros ou biocombustíveis. Análises metatranscriptômicas permitem explorar mudanças na expressão gênica em diferentes organismos que compõem determinada comunidade e têm sido instrumentais para a biotecnologia marinha, com destaque para o seu uso no monitoramento e remediação ambiental.

## 2 | ABORDAGENS METODOLÓGICAS

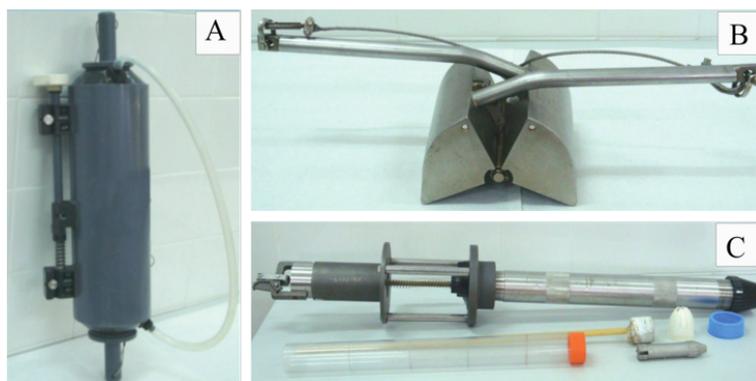
### 2.1 COLETA E PRESERVAÇÃO

O primeiro passo para os estudos de transcriptoma e metatranscriptoma consiste na coleta e preservação do material. Essa etapa, muitas vezes subestimada, é essencial para a obtenção de resultados de qualidade. De maneira geral, os estudos de transcriptoma e metatranscriptoma podem ser divididos em qualitativos e quantitativos. Os estudos qualitativos têm por objetivo conhecer o repertório gênico expresso por um organismo ou comunidade e são, na maioria dos casos, descritivos. Já os estudos quantitativos visam comparar os níveis de expressão gênica entre indivíduos ou comunidades. Durante o delineamento amostral devem ser levados em consideração o custo e a viabilidade da coleta, o tamanho do efeito esperado e a variância dentro dos grupos amostrados. Além disso, é preciso definir o número de réplicas e a profundidade de sequenciamento necessários, levando-se em conta a hipótese a ser testada.

As coletas devem ser feitas de forma aleatória e o procedimento adotado depende do objeto de estudo. No âmbito da biotecnologia marinha, é comum a análise de micro-organismos cultivados ou de amostras ambientais compostas por água do mar, sedimentos e holobiontes marinhos, tais como algas, corais, esponjas, moluscos e peixes. Por não se tratar do objetivo principal deste capítulo, as estratégias de coleta serão descritas brevemente (informações mais detalhadas podem ser encontradas em (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo 2011; CETESB/ANA).

A coleta de água do mar pode ser feita na superfície ou em profundidades determinadas usando uma garrafa de Nansen, Niskin ou Van Dorn (Figura 2A). Essas garrafas são submergidas abertas até a profundidade de interesse e fechadas com o auxílio de um dispositivo especial, chamado mensageiro, lançado ao longo de um cabo. Em seguida, a água deve ser filtrada para separar as frações de micro-organismos planctônicos que se deseja analisar. Nesse caso, recomenda-se a filtração seriada de água do mar em filtros com 1,0 $\mu$ m de poro para a coleta de eucariotos, 0,2 $\mu$ m para a coleta de bactérias, e filtração tangencial com *cut-off* de peso molecular de 30kDa para concentrar os vírus.

A coleta de sedimentos pode ser feita de forma estratificada, preservando a separação em camadas de acordo com a profundidade, ou de forma não estratificada, em que há mistura das camadas do sedimento no momento da coleta. Para as coletas de sedimento superficial, pode-se utilizar diversos modelos de coletores de acordo com a granulometria, sendo o mais comum o de Van Veen (Figura 2B). Já a coleta estratificada deve ser feita com o uso de um



**Figura 2.** Instrumentos de coleta: A. Garrafa de Niskin. B. Coletor de van Veen. C. Testemunhador modelo Kajak-Brinkhurst. Imagens adaptadas de (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2011; CETESB/ANA).

testemunhador ou *corer*, espécie de tubo que penetra no sedimento e possui um dispositivo de fechamento para confinar a amostra enquanto é trazida para a superfície (Figura 2C).

As coletas de holobiontes podem ser feitas por meio de dragas, no caso de organismos bentônicos, ou redes de espera, redes de arrasto ou espinhel, no caso da coleta de organismos nectônicos. Para ambos os casos, uma estratégia mais seletiva e, portanto, com menor impacto, é a coleta através de mergulho autônomo.

Quando se trata da preservação de amostras biológicas para análises de RNA, o tempo é fator fundamental. O RNA é extremamente sensível à degradação, portanto algumas medidas devem ser tomadas imediatamente após a coleta para garantir a sua integridade. Para evitar a ação de RNases e possíveis alterações no perfil de expressão gênica do organismo ocasionadas pelo estresse durante a coleta, os filtros de água, amostras de tecidos ou sedimentos devem ser rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Estima-se que a meia-vida de uma molécula de RNA mensageiro em células bacterianas é de 5 minutos (Moran et al., 2013). Portanto, o ideal é que o tempo transcorrido desde a coleta até o congelamento das amostras, incluindo o pré-processamento (ex.: triagem, filtração), seja inferior a 5 minutos. Alguns reagentes são comercializados como alternativa para inativar RNases e preservar a integridade do RNA, possibilitando a manutenção das amostras a temperatura ambiente por uma semana ou a 4°C por um mês.

## 2.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

### 2.2.1 EXTRAÇÃO DE RNA E ISOLAMENTO

O processamento de amostras para a extração de RNA varia de acordo com o tipo de material. No caso de tecidos, por exemplo, é comum a maceração em nitrogênio líquido, e para bactérias cultivadas, o uso de choque térmico para romper a parede celular. A subsequente extração de RNA é feita de acordo com duas estratégias principais: extração orgânica e extração em coluna. Os métodos de extração orgânica são considerados o padrão-ouro para preparo de RNA, por permitir a rápida desnaturação de nucleases e a estabilização do RNA, além de ser facilmente escalonado para a extração de grandes quantidades de amostras. De forma geral, a amostra deve ser homogeneizada em solução de lise contendo fenol e após a centrifugação

ocorre a formação de três fases. A fase superior aquosa contém o RNA e deve ser transferida para um novo tubo, onde o RNA deve ser precipitado através da adição de etanol ou isopropanol 100%. Em seguida, adiciona-se etanol 70% para remover impurezas e, após a centrifugação e descarte do sobrenadante, o RNA é reidratado em água ultrapura ou tampão de armazenamento. Esse método tem como desvantagens a geração de resíduos químicos tóxicos e a dificuldade de automatização dos protocolos, entre outras.

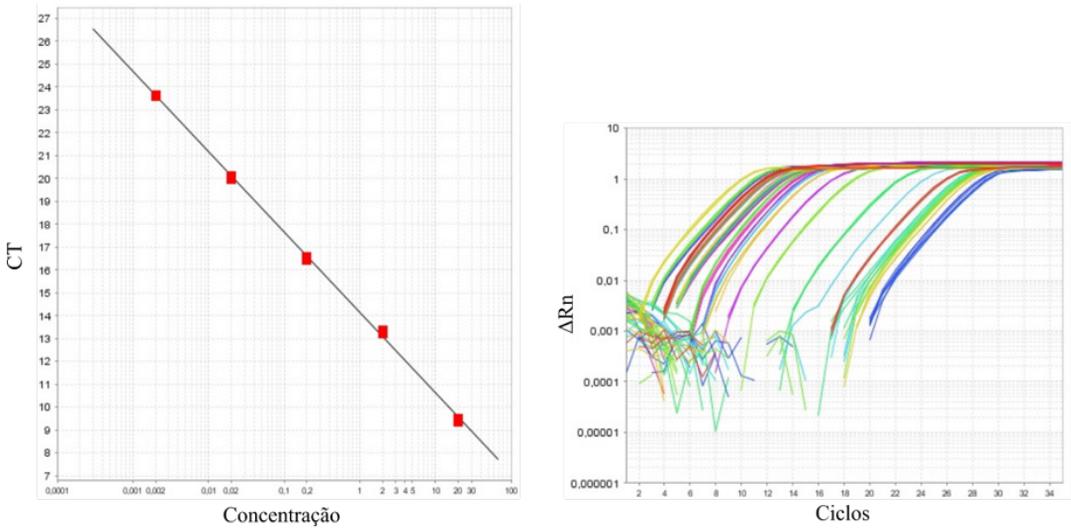
Já a extração em coluna utiliza membranas, em geral de fibra de vidro, sílica derivatizada ou troca iônica, que retêm os ácidos nucleicos e deixam passar resíduos da lise celular. As células são rompidas com um tampão contendo inibidores de RNase e essa solução é passada através da coluna. Soluções de limpeza são passadas através da coluna e, ao final, o RNA é dissociado da membrana com o uso de um tampão de eluição. Esses métodos têm como vantagem a rapidez, a facilidade de manuseio e a possibilidade de automatização, porém o nível de eficiência depende da composição da amostra.

Após a extração, é fundamental o tratamento do RNA total com DNase, visto que a contaminação com DNA prejudica todas as etapas posteriores, da quantificação de RNA à análise dos resultados do sequenciamento. Devido à alta sensibilidade do RNA à degradação, recomenda-se o seu armazenamento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em soluções que inibem a ação de RNase, tais como 0,1mM EDTA ou tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,0).

### 2.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE RNA E AVALIAÇÃO DO GRAU DE INTEGRIDADE E PUREZA

Após a extração de RNA, a quantificação e a avaliação do grau de pureza podem ser feitas através de espectrofotometria UV-Vis, medindo-se a absorbância a 260 nanômetros ( $A_{260}$ ). O cálculo de concentração baseia-se na lei de Beer-Lambert, que prevê um aumento linear na absorbância com o aumento da concentração de ácidos nucleicos. Já o grau de pureza do RNA é inferido com base na razão  $A_{260}/A_{280}$  com valores ideais na faixa de 1,8-2,1. Valores mais baixos para a razão  $A_{260}/A_{280}$  em geral indicam a contaminação com proteínas, as quais absorvem radiação próximo a 280nm. Além disso, uma medida secundária da pureza dos ácidos nucleicos é fornecida pela razão  $A_{260}/A_{230}$ , que deve apresentar valores acima de 1,5. Valores baixos para a razão  $A_{260}/A_{230}$  frequentemente indicam contaminação com sais, ureia, EDTA, carboidratos ou fenol. Esse método de quantificação é bastante utilizado devido à praticidade, porém pode levar a quantificações imprecisas devido à influência do pH da solução e de possíveis impurezas, incluindo contaminações com DNA.

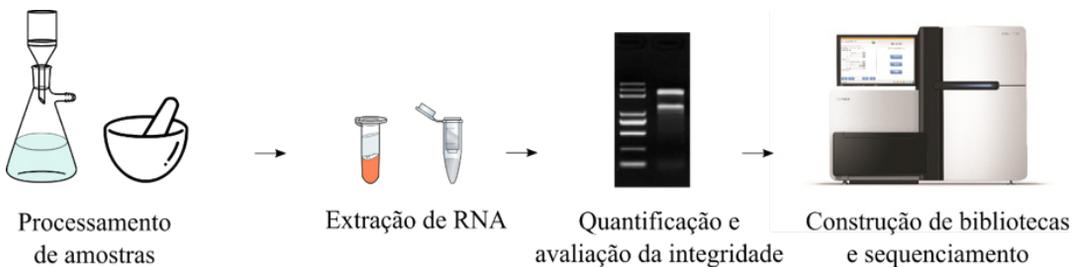
Um método mais preciso é a quantificação através de espectroscopia de fluorescência, que utiliza fluoróforos que se ligam de forma específica ao tipo de molécula alvo (RNA, DNA ou proteína), emitindo fluorescência intensa quando excitados por luz. Através do uso de uma curva-padrão com concentrações conhecidas de RNA, é possível correlacionar a intensidade de fluorescência com a concentração de RNA, gerando uma quantificação extremamente precisa e até certo ponto independente do grau de pureza da amostra. Outra técnica de quantificação de RNA bastante precisa é a PCR em tempo real. Para isso, o RNA precisa ser primeiramente convertido em cDNA com o uso da enzima transcriptase reversa. Em seguida, inicia-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) contendo, além dos reagentes básicos (cDNA, nucleotídeos,



**Figura 3.** Curva-padrão com concentrações conhecidas de DNA (esquerda) e gráfico mostrando a emissão de fluorescência em cada amostra a cada ciclo de amplificação (direita) em uma reação de PCR em tempo real.

DNA-polimerase, tampão e *primers*), um fluoróforo que se liga exclusivamente a fitas duplas de DNA. Assim, a cada ciclo de polimerização, o fluoróforo é excitado com luz e a fluorescência é medida. Utilizando uma curva-padrão, pode-se calcular a concentração de RNA na amostra original com base na emissão de fluorescência a cada ciclo de amplificação (Figura 3).

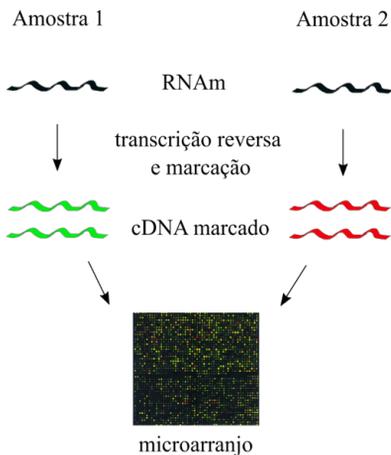
A integridade do RNA é frequentemente avaliada através de eletroforese e um bom indicativo da integridade do RNA total é a presença de bandas intactas de RNAr (Figura 4). Amostras de RNA parcialmente degradado apresentam-se com um arrasto de bandas com fragmentos de tamanho variado. Alguns equipamentos, como o Bioanalyzer (Agilent), foram desenvolvidos para fazer essa eletroforese em um volume reduzido e atribuem um valor RIN (*RNA Integrity Number*) ao nível de integridade do RNA, sendo recomendado o uso de amostras com RIN maior que 7.



**Figura 4.** Etapas básicas para o estudo de transcriptomas e metatranscriptomas através de sequenciamento de RNA.

## 2.3 PLATAFORMAS ANALÍTICAS

Atualmente o método mais utilizado para estudos de expressão gênica em comunidades e organismos não modelo é o sequenciamento de RNA. No entanto, técnicas de microarranjo são ainda utilizadas para a análise de expressão diferencial em organismos modelo. A técnica depende da disponibilidade, ou do preparo, de lâminas contendo fragmentos curtos de DNA, sendo cada fragmento correspondente a um gene do organismo de estudo. Após a extração de RNA de duas amostras que se deseja comparar, é feita a síntese de cDNA e a marcação com dois fluoróforos diferentes, um para cada amostra. Os dois conjuntos de cDNA marcados são então hibridizados com os fragmentos de DNA fixados na lâmina e após a excitação por luz ocorre a emissão de fluorescência. Com base na análise da fluorescência é possível comparar o nível de expressão gênica entre as amostras. No exemplo mostrado na Figura 5, os genes com nível de expressão maior na amostra 1 aparecem como pontos verdes, os genes mais expressos na amostra 2 aparecem como pontos vermelhos e os que possuem o mesmo nível de expressão em ambas as amostras aparecem como pontos amarelos. A análise do nível de fluorescência é feita de forma automatizada.



**Figura 5.** Etapas da análise de microarranjo utilizada para comparar o nível de expressão gênica em duas amostras.

A tecnologia de sequenciamento avançou consideravelmente nos últimos 20 anos, possibilitando a redução do custo e o aumento da eficiência em estudos de transcriptômica e metatranscriptômica. Os principais passos para a construção de bibliotecas de RNA são a seleção, a fragmentação, a síntese de cDNA, a ligação de adaptadores e a amplificação (Figura 6). Para que haja uma detecção eficiente dos transcritos de interesse, é necessário remover o RNA ribossomal (RNAr), que representa 95 a 98% do RNA total e traz pouca ou nenhuma informação em estudos de transcriptoma. Essa etapa é chamada de seleção e consiste no isolamento do RNA mensageiro (RNAm) ou na remoção de RNAr. A seleção de RNAm é comumente usada para estudos em que se deseja analisar apenas a fração codificante do transcriptoma de eucariotos. Nesse caso, são utilizadas partículas magnéticas ligadas a um segmento curto de DNA constituído por repetições de nucleotídeos de timina (oligo-dT), que se liga à cauda poli-A desses RNAm. Após a ligação, os tubos ou placas de reação devem ser colocados em uma estante magnética,

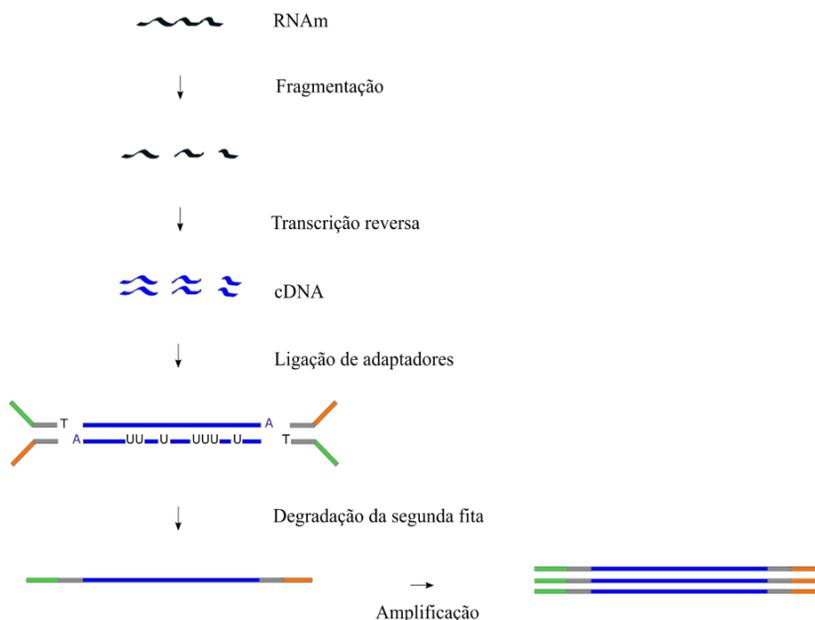
o sobrenadante deve ser descartado, as partículas magnéticas lavadas com etanol 70–80% e, por fim, o RNAm deve ser eluído em tampão que rompe a ligação com as partículas magnéticas. No entanto, para estudos de isolados bacterianos ou comunidades de procariotos, a estratégia mais comum é a depleção de RNAr. Esse método baseia-se na utilização de partículas magnéticas contendo sequências de DNA complementares ao RNAr do organismo em estudo. Assim, o RNAr é retido nas partículas magnéticas e o RNA de interesse permanece em solução.

Após a seleção, a fragmentação do RNA é feita com o uso de enzimas, íons metálicos, calor ou sonicação. Os fragmentos de RNA gerados servem de molde para a síntese de cDNA através da ação da enzima transcriptase reversa, utilizando *primers* aleatórios. Em seguida, o RNA é degradado pela RNase H, e a DNA polimerase sintetiza a segunda fita de cDNA. A próxima etapa é a ligação de adaptadores ao cDNA, necessária para a amplificação da biblioteca e o sequenciamento. A forma mais comum de incorporação de adaptadores é iniciada pelo reparo das extremidades do fragmento gerando pontas cegas, e pela adição de um nucleotídeo de adenina à extremidade 3' dos fragmentos de cDNA. Ocorre então o pareamento a um nucleotídeo timina na extremidade de um dos adaptadores, e o outro adaptador, iniciado por um fosfato em 5', é direcionado para se ligar à outra fita de cDNA, garantindo dessa forma a adição direcional de dois tipos de adaptadores em cada fragmento de cDNA (Figura 6).

Os métodos mais recentes e mais utilizados para a construção de bibliotecas preservam a informação referente a qual fita de DNA deu origem às moléculas de RNA a serem analisadas. Essa informação é especialmente relevante para o estudo de genes com posição sobreposta que são transcritos em fitas diferentes, além de permitir identificar transcritos anti-senso com potencial atividade regulatória. Em geral, essa informação é preservada através da marcação da segunda fita de cDNA pela incorporação de nucleotídeos uracila ao invés de timina (Figura 6). Durante a etapa de amplificação utiliza-se uma DNA polimerase que não consegue ultrapassar os pontos de inserção desse nucleotídeo e, assim, a fita contendo dUTP é eliminada. Alternativamente, a segunda fita de cDNA pode ser degradada pela ação da enzima uracil-N-glicosilase (Figura 6). Dessa forma, apenas a primeira fita de cDNA, que corresponde ao reverso complemento do RNAm original, será sequenciada.

A amplificação da biblioteca é importante para o aumento do sinal a ser detectado pelo sequenciador e é feita através de PCR, utilizando *primers* complementares a regiões específicas dos adaptadores. Além disso, os adaptadores são necessários para a fixação dos fragmentos à superfície de sequenciamento e podem conter sequências únicas para cada amostra (índice ou código de barras), o que permite o sequenciamento simultâneo de várias amostras de transcriptoma ou metatranscriptoma e o discernimento da origem das sequências através de bioinformática.

Atualmente, o método de sequenciamento de segunda geração mais utilizado é o da plataforma Illumina que se baseia em uma reação de PCR com nucleotídeos modificados pela ligação de um fluoróforo na extremidade OH da base nitrogenada, interrompendo a síntese quando incorporados. Cada tipo de nucleotídeo é marcado com um fluoróforo diferente que emite um sinal característico quando excitado por luz a cada ciclo de incorporação. Esse sinal é registrado e o fluoróforo é removido, permitindo um novo ciclo de síntese e a incorporação de um novo nucleotídeo. Novos métodos de sequenciamento estão sendo desenvolvidos e são coletivamente



**Figura 6.** Etapas gerais da construção de bibliotecas de RNA para o sequenciamento de segunda geração.

chamados métodos de sequenciamento de terceira geração. A grande vantagem desses métodos é a possibilidade de sequenciar fragmentos grandes, em média 10 mil pares de base, ao passo que o sequenciamento de segunda geração gera leituras com cerca de 300 pares de base. A plataforma PacBio oferece uma inovação importante ao acrescentar a marcação fluorescente na extremidade fosfato da base nitrogenada, em vez da extremidade OH, evitando o bloqueio da síntese. Dessa forma, o método faz uso da velocidade de reação intrínseca da polimerase.

O avanço das estratégias de sequenciamento tem permitido o crescimento exponencial da quantidade de dados gerados na forma de sequências de RNA. A análise e interpretação desses dados depende de conhecimentos de bioinformática e de uma estrutura computacional robusta. Os métodos de análise de sequências detalhados na próxima seção permitem atribuir significado biológico às informações geradas através de análises de microarranjo e RNAseq.

## 2.4 ANÁLISE DE DADOS DE RNAseq

Dentro do assunto biotecnologia marinha, serão abordados exemplos de metodologia para análise da comunidade microbiana de corais e esponjas, mas esta pode se estender para outras comunidades microbianas, sempre lembrando que são necessárias adaptações nos métodos de análise em cada caso. O número de sequências geradas pelas plataformas de sequenciamento de alta performance aumenta exponencialmente a cada ano, levando à necessidade do desenvolvimento constante de ferramentas de bioinformática para a análise desses dados. No caso das análises de dados de RNA-seq, a ausência de genomas de referência, incluindo aqui os genomas dos organismos marinhos de interesse, torna muito desafiadora a análise e interpretação dos dados através das ferramentas computacionais.

Alguns exemplos de aplicações dos dados de RNA-seq são:

- Determinação do perfil de expressão gênica de comunidades microbianas;
- Identificação das atividades metabólicas de comunidades microbianas;
- Descoberta de novos genes e vias regulatórias;
- Análise de expressão diferencial, como, por exemplo, entre comunidades microbianas de organismos marinhos saudáveis e doentes ou de diferentes locais.

A obtenção dos transcritos e a quantificação da expressão gênica se baseia na geração de sequências curtas de RNA que são montadas em transcritos completos (também chamados de *contigs*) e mapeados em um genoma de referência. Geralmente, para a obtenção dos dados de RNA-seq, populações de RNA isoladas são convertidas em cDNA para o sequenciamento. Não existe uma estratégia universal para as diferentes aplicações e cenários de análise em que o RNA-seq pode ser utilizado. Dessa forma, é aconselhável sempre pesquisar na literatura antes de iniciar a análise de dados, a fim de definir a melhor estratégia de acordo com o tipo de organismo em estudo, a hipótese testada, o desenho experimental executado, os tipos de amostras utilizadas, entre outros.

De forma geral, as principais etapas para análise de dados de RNA-seq são: pré-processamento dos dados, montagem e mapeamento das sequências, normalização e análise da expressão diferencial e anotação funcional dos transcritos (Figura 7).



**Figura 7.** Fluxograma representando uma estratégia para a análise de dados de RNA-seq (ex. Plataforma Illumina).

### 2.4.1 PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS

Previamente a análise dos dados de RNA-seq, que são os dados gerados pelas plataformas de sequenciamento de alta performance, é necessário realizar etapas de pré-processamento das sequências, de forma a garantir que sejam utilizados dados de qualidade nas análises posteriores, além de assegurar alta qualidade na montagem do transcriptoma. Antes de iniciar as etapas de pré-processamento é interessante verificar a estatística dos dados de sequenciamento, como a média do tamanho das sequências, a porcentagem de possíveis sequências truncadas, a qualidade do sequenciamento, a possível presença de adaptadores, além de quais regiões das sequências podem apresentar inconsistências. O programa FastQC ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)) (Andrews, 2010) facilita a etapa de seleção dos parâmetros a serem utilizados nos programas de controle de qualidade.

A etapa de pré-processamento tem como objetivo identificar e remover potenciais erros de sequenciamento, contaminantes, sequências duplicadas e bases de baixa qualidade. Além disso, quando necessário, é realizada a remoção de adaptadores e índices e da cauda Poli-A (no caso de dados de RNAm). PRINSEQ e TRIMOMMATIC (Bolger; Lohse; Usadel, 2014) são exemplos de programas que realizam a etapa de remoção da cauda Poli-A; TagCleaner (Schmieder et al., 2010) é utilizado para remover adaptadores, sequências ambíguas e sequências artificiais concatenadas; e o Adapter Removal (Schubert; Lindgreen; Orlando, 2016) é utilizado para remover os adaptadores.

Vale ressaltar que, caso o foco do estudo seja o RNAm, é interessante incluir uma etapa de filtro para a remoção das sequências de RNAr remanescentes ainda que elas tenham sido removidas durante a construção das bibliotecas. Para a detecção dessas sequências contaminantes, pode-se utilizar o alinhamento múltiplo de uma base de RNAr com os dados de RNA-seq (Li et al., 2009), utilizando programas como o Bowtie (Langmead et al., 2009) ou Bowtie2 (Langmead; Salzberg, 2012), que alinham milhões de sequências de RNA-seq por hora de CPU. O Bowtie tem uma opção que armazena as sequências não alinhadas em um arquivo separado. As sequências dos dados de RNA-seq que alinharem com as sequências da base de RNAr são removidas. Outra opção de programa de alinhamento para a remoção das sequências de RNAr é o BLAST (BLASTn) (Altschul et al., 1990). As bases de RNA ribossomais que podem ser utilizadas incluem a base de subunidades ribossomais pequenas (16S/18S SSU) e subunidades grandes (23S/28S LSU) de procariotos e eucariotos, que compõem a base SILVA, com atualizações e versões periódicas disponíveis (<http://www.arb-silva.de/>).

Alguns exemplos de programas utilizados para análise de dados de RNAseq são mencionados ao longo desta seção. No entanto, antes de prosseguir com as análises bioinformáticas, é aconselhável realizar uma revisão na literatura sobre os programas mais recentes desenvolvidos e utilizados para determinado tipo de dado.

### 2.4.2 MONTAGEM E MAPEAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

#### **Montagem**

Após o pré-processamento, as sequências de RNA-seq resultantes de cada condição a ser analisada (ex: condição doente x condição saudável) são montadas em transcritos completos. No caso da metatranscriptômica, transcritos de diferentes espécies microbianas estão misturados, tornando-se mais difícil a montagem de transcritos completos. O programa de montagem mais utilizado, no momento, para montar dados de metatranscriptoma é o Trinity, pois independe do alinhamento com um genoma de referência. O alinhamento dos transcritos pode ser visualizado a partir de ferramentas como o Artemis (Rutherford et al., 2000) ou o DNAPlotter (Carver et al., 2008), de forma a verificar a cobertura das sequências por base. A montagem é realizada para tentar reconstruir os RNAs originais e avaliar sua abundância. Existem diversos programas para montagem de transcriptoma (Tabela 1) que se dividem basicamente em três estratégias: estratégia baseada em referência, estratégia *de novo* e estratégia combinada.

A estratégia baseada em referência utiliza um genoma como referência para reconstruir o transcriptoma. Alguns exemplos de programas que realizam essa abordagem são: TopHat (Trapnell et al., 2012), SpliceMap (Au et al., 2010), MapSplice (Wang et al., 2010) e GSNAP (Wu et al., 2016). Algumas vantagens dessa estratégia são: permitir a montagem de transcritos de baixa abundância; possibilitar o uso de computação paralela; necessitar de poucos gb de RAM; permitir a descoberta de novos transcritos que não estão em anotações já existentes; descartar os artefatos e contaminantes (que não alinham), e facilitar a reconstrução de transcriptomas complexos, com muitos íntrons e eventos de processamento alternativo.

No entanto, algumas desvantagens podem ser apontadas devido à dependência de um genoma de referência, visto que genomas completos de organismos marinhos ainda são raros. Além disso, a qualidade da montagem é extremamente dependente da qualidade do genoma de referência; genes que se encontram muito próximos ou sobrepostos podem ser interpretados como um único transcrito, e leituras que estejam muito distantes no genoma ou em cromossomos diferentes não são agrupadas.

A montagem *de novo* não utiliza um genoma de referência. Ela se baseia na redundância das leituras para encontrar sobreposições entre as sequências geradas. Alguns programas usam o gráfico *De Bruijn* para reconstruir transcritos de uma ampla faixa de níveis de expressão e então processar a montagem de *contigs* e remover redundâncias. Algumas vantagens dessa estratégia são: não depender de um genoma de referência; providenciar um novo conjunto de dados de transcritos para genomas que não apresentam alta qualidade; permitir a detecção de transcritos exógenos ou que estão faltando no genoma; não ser influenciada por íntrons longos; detectar transcritos *trans-spliced*, resultantes de rearranjos cromossômicos, e poder ser utilizada para a montagem de transcriptoma de organismos complexos. Como desvantagens, podemos listar: o consumo de elevada memória RAM para a montagem de organismos eucariotos complexos; a grande quantidade de dados intermediários gerados; a complexidade dos gráficos *De Bruijn* necessários para analisar o possível processamento alternativo dos transcritos; o longo tempo de processamento dos dados, podendo durar dias ou semanas; a necessidade de uma cobertura maior do sequenciamento; a dificuldade de diferenciar um erro de leitura de uma variante genética ou processamento alternativo dos transcritos, e a possibilidade de considerar trechos similares (ex. parálogos) como um só transcrito.

**Tabela 1.** Principais programas de montagem utilizados em análises de dados de RNA-seq.

PROGRAMA	ANO EM QUE FOI DESPONIBILIZADO	ANO DA ÚLTIMA ATUALIZAÇÃO	REFERÊNCIA
Velvet-Oases	2008	2011	Zerbino; Birney, 2008 Schulz et al., 2012
SOAPdenovo-trans	2011	2015	Xie et al., 2014
Trans-ABYSS	2010	2016	Robertson et al., 2010
Trinity	2011	2017	Grabherr et al., 2011 Haas et al., 2013
CLC genomics workbench	2008	2014	Kumar; Blaxter, 2010
miraEST	1999	2016	Chevreur et al., 2004

Por fim, foi desenvolvida uma estratégia para combinar os dois métodos mencionados (a estratégia baseada em referência e a estratégia *de novo*), sendo especialmente vantajosa quando o genoma de referência tem baixa qualidade. Nesse caso, a montagem *de novo* pode ser feita primeiro e, depois, os *contigs* e *singlets* são alinhados ao genoma, através da abordagem baseada em referência, e as lacunas podem ser preenchidas.

### **Mapeamento**

Após a etapa de montagem, os transcritos são mapeados a um genoma de referência, através de programas como TopHat, que utiliza o Bowtie/Bowtie2 para realizar o alinhamento das sequências de forma muito rápida. O termo “alinhamento” se refere, neste contexto, ao processo para encontrar a posição de uma sequência (*read*) no genoma de referência. Já o termo “mapeamento” se refere às sequências que foram alinhadas aos transcritos. Essa etapa é realizada para quantificar os transcritos de uma amostra. Os arquivos do mapeamento são utilizados para montar os transcritos a partir das sequências de RNA-seq que foram alinhadas ao genoma, para a anotação do transcriptoma e para estimar o nível de expressão do transcriptoma (baseado em um índice denominado RPKM – *reads per kilobase of exon model per million mapped reads* / sequências por quilobase de gene por milhão). Na ausência de genoma de referência, como é o caso dos dados de metatranscriptoma, o Trinity pode ser utilizado para realizar a montagem e, também, para o mapeamento, normalização e análise de expressão diferencial. Trinity é um pacote de programas para análise de dados de RNA-seq.

### **2.4.3 NORMALIZAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL**

Após a montagem dos transcritos para cada amostra, estes podem ser mesclados, de forma parcimoniosa, através do programa Cuffmerge, que compõe o pacote Cufflinks. Genes com baixa expressão podem ter uma profundidade de sequenciamento insuficiente, o que impede a sua reconstrução em cada réplica. Porém, mesclando as montagens das réplicas pode-se recuperar o gene inteiro. Além disso, essa montagem mesclada fornece uma base uniforme

para calcular a expressão gênica em cada condição.

Antes de analisar a expressão gênica diferencial dos dados de RNA-seq é necessário normalizá-los, para minimizar os efeitos não relacionados à diferença entre as condições experimentais. A normalização pode ser realizada a partir de valores de RPKM, que leva em consideração o tamanho do gene e a quantidade de sequências. A comparação do nível de expressão gênica em diferentes condições pode ser realizada com o programa Cuffdiff, que faz parte do pacote Cufflinks. O Cufflinks é uma ferramenta de análise de expressão diferencial que compara os índices de RPKM e identifica alterações significativas no nível de expressão gênica dos transcritos entre os tratamentos, por meio de um rigoroso teste estatístico. Agrupando os transcritos em grupos com sentido biológico (assim como transcritos que compartilham o mesmo sítio de iniciação da transcrição), o Cuffdiff identifica os genes que são diferencialmente regulados no nível transcricional ou pós-transcricional. Além disso, o Cuffdiff estima a variância no número de sequências para cada gene entre as réplicas e utiliza esse valor para calcular a significância das mudanças na expressão. Os resultados do Cuffdiff podem ser visualizados utilizando o pacote do R CummeRbund, que cria uma base de dados SQLite dos resultados, descrevendo as relações apropriadas entre os genes, transcritos e regiões de CDS (*coding sequence*, ou região de codificação).

Vale ressaltar que esse tipo de análise é mais utilizado para projetos que envolvam dados de transcriptoma de organismos, tecidos ou de um material biológico que possua um genoma de referência. Para as análises de metatranscriptomas ou até transcriptomas em que não há disponibilidade de um genoma de referência, outros pacotes, como o Trinity, são mais indicados.

Além da métrica RPKM, podem ser utilizadas outras duas métricas para a normalização da profundidade do sequenciamento e do comprimento do gene, como o FPKM (*fragments per kilobase million*) e o TPM (*transcripts per kilobase million*). De forma resumida, o RPKM conta o total de sequências de uma amostra e divide esse número por 1.000.000 (este é o fator de escala “por milhão”). Em seguida, o número de contagem das sequências é dividido pelo resultado chamado de “fator de escala por milhão”, que normaliza a profundidade do sequenciamento, gerando o RPM. Por último, os valores de RPM são divididos pelo comprimento do gene, em quilobases, gerando o RPKM.

#### Fórmula do RPKM

**RPKM = (numSeqs / geneComp) X (1.000.000/ totalNumSeqs), onde:**

numSeqs – número de sequências não montadas (*raw reads*)

geneComp – comprimento da sequência gênica.

totalNumSeqs – número total de sequências mapeadas de uma amostra.

O FPKM é muito parecido com o RPKM. Porém, a métrica RPKM é mais utilizada para dados de RNA-seq *single-ends*, ou seja, cada sequência corresponde a um único fragmento sequenciado, enquanto o FPKM é mais utilizado para dados de RNA-seq *paired-end*, em que duas

sequências podem corresponder a um único fragmento, ou, se uma sequência do par não for a mapeada, uma sequência pode corresponder a um único fragmento. Basicamente, a grande diferença entre essas duas métricas é que o FPKM leva em conta que duas sequências podem mapear em um fragmento e, dessa forma, não conta esse fragmento duas vezes.

O TPM também é muito parecido com o RPKM e o FPKM, mas difere na ordem das operações. No TPM o número da contagem de sequências é dividido pelo comprimento de cada gene, em quilobases, gerando o número de sequências por quilobases (*reads per kilobase* ou RPK). Em seguida, todos os valores de RPK são contados, por amostra, e divididos por 1.000.000, resultando no “fator de escala por milhão”. Por último, os valores RPK são divididos pelo “fator de escala por milhão”, resultando no valor de TPM. Logo, quando se utiliza o TPM, a única diferença é a normalização primeiro pelo comprimento do gene.

#### 2.4.4 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS TRANSCRITOS

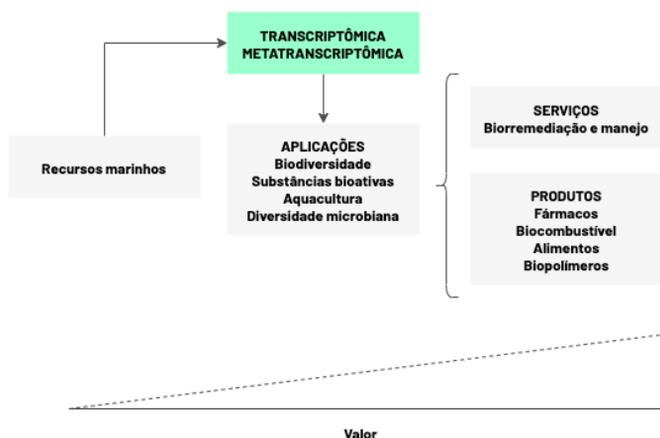
Os *contigs* obtidos após a montagem, assim como os genes diferencialmente expressos, podem ser anotados, para uma exploração da diversidade taxonômica e funcional, utilizando-se bases de dados de proteínas (como NR do GenBank, SwissProt e TrEMBL, que fazem parte do UniProt). Diversos programas podem ser utilizados para esse tipo de análise, incluindo programas como o BLAST (BlastX), Diamond (Buchfink; Xie; Huson, 2015), PAUDA, RAPSearch2 (Zhao; Tang; Ye, 2012), FOCUS (Silva et al., 2014), SUPER-FOCUS (Silva et al., 2016), entre outros.

## 3

### APLICAÇÕES DA TRANSCRIPTÔMICA E META-TRANSCRIPTÔMICA NA BIOTECNOLOGIA MARINHA

O rápido desenvolvimento das estratégias de sequenciamento tem impulsionado as pesquisas de biotecnologia e ampliado o conhecimento dos recursos genéticos marinhos (Figura 8). O mercado global para produtos e processos relacionados à biotecnologia marinha foi estimado em 2,8 bilhões de euros (2010), com taxa cumulativa de crescimento anual de 4 a 5%. Uma contribuição essencial da biotecnologia marinha está relacionada à necessidade de satisfazer a crescente demanda por alimentação saudável, baseada em frutos do mar. A transcriptômica possibilita conhecer genes associados a reprodução, crescimento, desenvolvimento e resistência a doenças em espécies marinhas cultiváveis. Esse conhecimento é necessário para estabelecer o cultivo de novas espécies, bem como para o aumento na eficiência da produção e na qualidade do produto em um sistema de aquicultura sustentável (Abdelrahman et al., 2017). Através de estudos de transcriptoma, Waiho e colaboradores realizaram uma busca por genes envolvidos no processo de maturação sexual do caranguejo *Scylla olivacea*, de grande relevância comercial, fornecendo informações necessárias para o aprimoramento das formas de cultivo (Waiho et al., 2017).

A exaustão das reservas de combustível fóssil, associada ao aumento da consciência ambiental sobre os seus efeitos poluentes (Tabela 2), tem impulsionado a busca por fontes alter-



**Figura 8.** Valoração dos recursos marinhos ao serem utilizados de maneira sustentável através da biotecnologia marinha.

nativas de energia. As microalgas marinhas acumulam grandes quantidades de triacilgliceróis (TAGs), matéria prima para a produção de biodiesel. Quando comparadas com plantas terrestres, como a soja, as microalgas possuem taxas mais elevadas de fixação de  $\text{CO}_2$  e produção de biomassa e sua exploração não compete com a produção de alimentos. Atualmente, o maior obstáculo à ampla exploração de microalgas marinhas como fonte de biocombustível consiste no alto custo de produção. As análises do transcriptoma de microalgas oleaginosas possibilitam conhecer os genes envolvidos na biossíntese de TAGs, bem como os padrões de regulação da sua expressão. Esse conhecimento, aliado a técnicas de engenharia genética, possibilitará o melhoramento genético de linhagens de microalgas oleaginosas, de forma a aumentar a eficiência e reduzir o custo de produção (Lim; Schenk, 2017).

A descoberta de novos medicamentos representa uma das aplicações mais promissoras da pesquisa em biotecnologia marinha. Cerca de 18 mil produtos naturais marinhos pertencentes a aproximadamente 4.800 espécies foram descritos até 2010, e esse número cresce a uma taxa de 4% ao ano. Os produtos naturais marinhos possuem estrutura química muito diferente dos oriundos de organismos terrestres, destacando-se o alto nível de halogenação. Nesse contexto, os metabólitos especiais (também conhecidos como metabólitos secundários) marinhos oferecem grande potencial como novas classes de medicamentos. Um estudo recente demonstrou que alcaloides derivados de esponjas marinhas atuam inibindo a formação de biofilme e suprimindo a resistência a antibióticos em bactérias patogênicas resistentes (Melander et al., 2016). Além disso, bactérias associadas a esponjas produzem substâncias com grande potencial farmacológico, devido a suas atividades antimicrobianas, anticâncer, antioxidantes e contra doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Bibi et al., 2017). Outras aplicações biotecnológicas importantes envolvem a produção de biopolímeros, tais como plásticos biodegradáveis e suplementos alimentares. Devido à constante disputa por espaço no ambiente marinho, é comum a produção de substâncias com atividade anti-incrustante, como o elatol produzido pela macroalga vermelha *Laurencia dendroidea* (Pereira et al., 2003). Tais substâncias são de interesse para a indústria naval, pois impedem a fixação de organismos a cascos de embarcações.

Apesar da enorme diversidade de metabólitos especiais marinhos, a exploração desse

recurso é limitada pela dificuldade de obtenção das substâncias em larga escala. Atualmente existem 15 produtos naturais marinhos em várias fases de desenvolvimento, principalmente na área de oncologia. Os metabólitos especiais são produzidos em baixa concentração, dificultando sua exploração através do cultivo de organismos marinhos. A complexidade e o desconhecimento das vias metabólicas envolvidas na biossíntese de metabólitos especiais marinhos dificultam a sua produção *in vitro*. Ao oferecer informações a respeito dos genes envolvidos na biossíntese de metabólitos de interesse, bem como suas formas de regulação, a transcriptômica e a meta-transcriptômica constituem o primeiro passo para a produção dessas substâncias em micro-organismos geneticamente modificados, tais como bactérias e leveduras.

A biotecnologia marinha desempenha um importante papel na proteção e manejo de ambientes marinhos. Um importante exemplo de aplicação da metatranscriptômica foi o estudo realizado no Golfo do México após um grave derramamento de óleo naquela região (Tabela 2). Os pesquisadores investigaram possíveis alterações no conjunto de genes da comunidade microbiana após o acidente, e assim foram capazes de determinar as vias de degradação de hidrocarbonetos, além de outras funções de genes ativamente expressos no momento em que foi feita a amostragem, podendo atribuir essas funções a grupos específicos de micro-organismos. Através desse estudo foi possível elucidar o papel da proteobactéria não cultivável *Oceanospirillales* sp. na dispersão do petróleo. Ao possibilitar o conhecimento dos membros da comunidade microbiana e a sua resposta ao aumento da presença de hidrocarbonetos nesse ambiente, a metatranscriptômica contribui para o desenvolvimento de estratégias de remediação em casos de derramamento de óleo em ambientes marinhos (Mason et al., 2012).

**Tabela 2.** Exemplos de estudos de transcriptoma/metatranscriptoma realizados na área de biotecnologia marinha e suas aplicações.

FILO	ESPÉCIE/ ORDEM	MÉTODO	PLATA- FORMA	N. DE LEITURAS (MILHÕES)	APLICAÇÃO	REFERÊN- CIA
Rhodophyta	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	Transcriptoma	Illumina	45	Antitumoral	Kang et al., 2016
Arthropoda	<i>Caligus rogercresseyi</i>	Transcriptoma	Illumina	78	Resistência anti- biótica	Chávez-Mar- dones; Gallardo-Es- cárate, 2015
Mollusca	<i>Chlorostoma funebrialis</i>	Transcriptoma	Illumina	49-72*	Tolerância a altas temperaturas	Gleason; Burton, 2015
Arthropoda	<i>Scylla olivacea</i>	Transcriptoma	Illumina	144	Processo de matu- ração	Waiho et al., 2017
Proteobac- teria	<i>Oceanospirillales</i>	Metatran- scriptoma	Illumina	368	Alteração ambiental	Mason et al., 2012

\*por amostra

Estima-se que, até 2010, cerca de 4.900 patentes foram estabelecidas envolvendo genes de organismos marinhos, e esse número cresce a uma taxa muito maior do que a de identificação de novas espécies. O desenvolvimento acelerado de técnicas de biologia molecular, incluindo a metatranscriptômica, permite conhecer e explorar o repertório genético de comunidades complexas antes mesmo que os organismos que a compõem sejam identificados. De fato, o número de espécies marinhas incluídas em aplicações de patentes cresce cerca de quatro vezes mais rápido do que o número de espécies marinhas domesticadas para a aquicultura. Esse cenário reforça a importância das técnicas de transcriptômica e metatranscriptômica para o rápido desenvolvimento da biotecnologia marinha, permitindo superar obstáculos como a reduzida taxa de crescimento, a dificuldade de reprodução em cativeiro e a baixa produção de metabólitos especiais por organismos marinhos (Figura 8) (Arrieta; Arnaud-Haond; Duarte, 2010).

## 4 | CONCLUSÕES

Durante a última década, os avanços das tecnologias “ômicas” têm impulsionado novas descobertas e aplicações na área da biotecnologia marinha. Com o grande volume de dados obtidos através da transcriptômica e da metatranscriptômica, novas portas estão sendo abertas para que sejam alcançados progressos no campo da biotecnologia marinha, com grande impacto no futuro de diversas áreas das ciências. No entanto, a maior parte dos estudos de transcriptomas e metatranscriptomas concentra-se na análise de RNA mensageiro. A ampliação dos estudos de RNAs não codificantes e pequenos RNAs favorecerá a compreensão dos mecanismos de regulação da expressão gênica com aplicações diretas para a aquicultura e a produção de substâncias de interesse biotecnológico, ao permitir maior controle das respostas dos organismos às condições de cultivo e produção.

O recente desenvolvimento de tecnologias para a análise do transcriptoma de uma única célula oferece maior sensibilidade ao método e permite o estudo de amostras com quantidade limitada de RNA. A redução na quantidade de RNA necessária para tais estudos possibilita um menor impacto ambiental das coletas. Além disso, com o estabelecimento das plataformas de sequenciamento de terceira geração, já é possível sequenciar moléculas inteiras de RNA, evitando a etapa de fragmentação, o que facilita os estudos de expressão diferencial e a detecção de isoformas. Esses avanços tecnológicos facilitam os estudos de transcriptomas e metatranscriptomas e proporcionam a ampliação dos bancos de dados de sequências, contribuindo para a expansão da biotecnologia marinha. A redução nos custos de sequenciamento possibilitará, ainda, maior utilização das ferramentas de transcriptômica e metatranscriptômica para o monitoramento ambiental, bem como a sua inclusão como ferramenta essencial para o aprimoramento da aquicultura e para a produção em larga escala de biocombustíveis e produtos naturais de interesse biotecnológico.

O conhecimento adquirido através de transcriptômica e metatranscriptômica oferece as bases para o desenvolvimento das tecnologias de DNA recombinante, que possibilita a

melhoria do crescimento, saúde e qualidade dos organismos marinhos cultivados. Outra estratégia promissora que se beneficia da ampliação dos estudos de transcriptomas e metatranscriptomas é o desenvolvimento de vacinas de DNA para a imunização de organismos cultivados, reduzindo a incidência de infecções em sistemas de aquicultura. Conhecer as vias metabólicas envolvidas na biossíntese de substâncias de interesse e os mecanismos de regulação desses genes em resposta a mudanças de condições ambientais permite a otimização das condições de cultivo do organismo produtor ou a inserção de tais genes em micro-organismos para a síntese heteróloga dessas substâncias em biorreatores.

Os principais desafios para a exploração dos recursos genéticos marinhos estão relacionados a aspectos éticos e legais. O crescimento da poluição e a degradação do ambiente marinho ameaça a biodiversidade e coloca em risco um reservatório genético ainda inexplorado e todo o potencial biotecnológico a ele associado. A ausência de um acordo internacional no que tange à proteção e a regulação da exploração dos recursos genéticos coloca as nações menos desenvolvidas em uma posição vulnerável em relação à pesquisa e ao estabelecimento de patentes. A ampliação do debate sobre os aspectos éticos e o estabelecimento de medidas legais para garantir o acesso seguro aos recursos marinhos, a propriedade intelectual e a produção sustentável das substâncias bioativas são essenciais para que todo o potencial oferecido pela transcriptômica e a metatranscriptômica seja investido e promova o fortalecimento da biotecnologia marinha.

## REFERÊNCIAS

Abdelrahman, H.; ElHady, M.; Alcivar-Warren, A.; Allen, S.; Al-Tobasei, R.; Bao, L.; Beck, B.; Blackburn, H.; Bosworth, B.; Buchanan, J.; Chappell, J.; Daniels, W.; Dong, S.; Dunham, R.; Durland, E.; Elasad, A.; Gomez-Chiarri, M.; Gosh, K.; Guo, X.; Hackett, P.; Hanson, T.; Hedgecock, D.; Howard, T.; Holland, L.; Jackson, M.; Jin, Y.; Kahlil, K.; Kocher, T.; Leeds, T.; Li, N.; Lindsey, L.; Liu, S.; Liu, Z.; Martin, K.; Novriadi, R.; Odín, R.; Palti, Y.; Peatman, E.; Proestou, D.; Qin, G.; Reading, B.; Rexroad, C.; Roberts, S.; Salem, M.; Severin, A.; Shi, H.; Shoemaker, C.; Stiles, S.; Tan, S.; Tang, K.F.J.; Thongda, W.; Tiersch, T.; Tomasso, J.; Prabowo, W.T.; Vallejo, R.; van der Steen, H.; Vo, K.; Waldbieser, G.; Wang, H.; Wang, X.; Xiang, J.; Yang, Y.; Yant, R.; Yuan, Z.; Zeng, Q.; Zhou, T.; Zhou, T. (2017) Aquaculture genomics, genetics and breeding in the United States: current status, challenges, and priorities for future rese- arch. **BMC Genomics**. 18:191.

Adams, M.D.; Kelley, J.M.; Gocayne, J.D.; Dubnick, M.; Polymeropoulos, M.H.; Xiao, H.; Merrill, C.R.; Wu, A.; Olde, B. (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**. 252(5013): 1651-1656. ISSN 0036-807.

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**. 215:403-410.

Andrews, S. (2010) **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**.

Arrieta, J.M.; Arnaud-Haond, S.; Duarte, C.M. (2010) What lies underneath: conserving the oceans' genetic resources. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 107:18318-24.

Au, K.F.; Jiang, H.; Lin, L.; Xing, Y.; Wong, W.H. (2010) Detection of splice junctions from paired-end RNA-seq data by SpliceMap. **Nucleic Acids Res**. 38:4570-4578.

- Bainbridge, M.N.; Warren, R.L.; Hirst, M.; Romanuik, T.; Zeng, T.; Go, A.; Delaney, A.; Griffith, M.; Hickenbotham, M.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Sadar, M.D.; Siddiqui, A.S.; Marra, M.A.; Jones, S.J.M. (2006) Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. **BMC Genomics**. 7:246.
- Bibi, F.; Faheem, M.; Azhar, I.E.; Yasir, M.; Alvi, A.S.; Kamal, A.M.; Ullah, I.; Naseer, I.M. (2017) Bacteria From Marine Sponges: A Source of New Drugs. **Curr Drug Metab**. 18:11–15.
- Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**. 30:2114–2120.
- Buchfink, B.; Xie, C.; Huson, D.H. (2015) Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nat Methods**. 12:59–60.
- Carver, T. et al. (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. **Bioinformatics**. 25.1: 119–120.
- Chávez-Mardones, J.; Gallardo-Escárate, C. (2015) Next-Generation Transcriptome Profiling of the Salmon *Louse Caligus rogercresseyi* Exposed to Deltamethrin (AlphaMax™): Discovery of Relevant Genes and Sex-Related Differences. **Mar Biotechnol**. 17:793–810.
- Chevreux, B.; Pfisterer, T.; Drescher, B.; Driesel, A.J.; Müller, W.E.G.; Wetter, T.; Suhai, S. (2004) Using the miraEST Assembler for Reliable and Automated mRNA Transcript Assembly and SNP Detection in Sequenced ESTs. **Genome Res**. 14:1147–1159.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB/ANA)(2011) **Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. p.326.
- Gleason, L.U.; Burton, R.S. (2015) RNA-seq reveals regional differences in transcriptome response to heat stress in the marine snail *Chlorostoma funebris*. **Mol Ecol**. 24:610–627.
- Grabherr, M.G.; Haas, B.J.; Yassour, M.; Levin, J.Z.; Thompson, D.A.; Amit, I.; Adiconis, X.; Fan, L.; Raychowdhury, R.; Zeng, Q.; Chen, Z.; Mauceli, E.; Hacohen, N.; Gnirke, A.; Rhind, N.; di Palma, F.; Birren, B.W.; Nusbaum, C.; Lindblad-Toh, K.; Friedman, N.; Regev, A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nat Biotechnol**. 29:644–52.
- Haas, B.J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Blood, P.D.; Bowden, J.; Couger, M.B.; Eccles, D.; Li, B.; Lieber, M.; MacManes, M.D.; Ott, M.; Orvis, J.; Pochet, N.; Strozzi, F.; Weeks, N.; NF & AR. (2013) *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nat Protoc**. 8:1494–1512.
- Kang, Y.; Li, H.; Wu, J.; Xu, X.; Sun, X.; Zhao, X.; Xu, N. (2016) Transcriptome Profiling Reveals the Antitumor Mechanism of Polysaccharide from Marine Algae *Gracilariopsis lemaneiformis*. **PLoS One**. 11:e0158279.
- Kumar, S.; Blaxter, M.L. (2010) Comparing de novo assemblers for 454 transcriptome data. **BMC Genomics**. 11:571.
- Langmead, B.; Trapnell, C.; Pop, M.; Salzberg, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biol**. 10:R25.
- Langmead, B.; Salzberg, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**. 9:357–359.
- Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. (2009) 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAM-tools. **Bioinformatics**. 25:2078–2079.
- Lim, K.Y.D.; Schenk M.P. (2017) Microalgae selection and improvement as oil crops: GM vs non-GM strain

engineering. **AIMS Bioeng.** 4:151–161.

Marine Board-European Science Foundation (2010). **Marine Biotechnology: a new vision and Strategy for Europe.**

Mason, O.U.; Hazen, T.C.; Borglin, S.; Chain, P.S.G.; Dubinsky, E.A.; Fortney, J.L.; Han, J.; Holman, H.-Y.N.; Hultman, J.; Lamendella, R.; Mackelprang, R.; Malfatti, S.; Tom, L.M.; Tringe, S.G.; Woyke, T.; Zhou, J.; Rubin, E.M.; Jansson, J.K. (2012) Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. **ISME J.** 6:1715–1727.

Melander, R.J.; Liu, H.; Stephens, M.D.; Bewley, C.A.; Melander, C. (2016) Marine sponge alkaloids as a source of anti-bacterial adjuvants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.**

Meyers, B.C.; Vu, T.H.; Tej, S.S.; Ghazal, H.; Matvienko, M.; Agrawal, V.; Ning, J.; Haudenschild, C.D. (2004) Analysis of the transcriptional complexity of *Arabidopsis thaliana* by massively parallel signature sequencing. **Nat Biotechnol.** 22:1006–1011.

Moran, M.A.; Satinsky, B.; Gifford, S.M.; Luo, H.; Rivers, A.; Chan, L.-K.; Meng, J.; Durham, B.P.; Shen, C.; Varaljay, V.A.; Smith, C.B.; Yager, P.L.; Hopkinson, B.M. (2013) Sizing up metatranscriptomics. **ISME J.** 7:237–43.

Pereira, R.C.; Da Gama, B.P.; Teixeira, V.L.; Yoneshigue-Valentin, Y. (2003) Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. **Braz J Biol.** 63:665–672.

Robertson, G.; Schein, J.; Chiu, R.; Corbett, R.; Field, M.; Jackman, S.D.; Mungall, K.; Lee, S.; Okada, H.M.; Qian, J.Q.; Griffith, M.; Raymond, A.; Thiessen, N.; Cezard, T.; Butterfield, Y.S.; Newsome, R.; Chan, S.K.; She, R.; Varhol, R.; Kamoh, B.; Prabhu, A.-L.; Tam, A.; Zhao, Y.; Moore, R.A.; Hirst, M.; Mar- ra, M.A.; Jones, S.J.M.; Hoodless, P.A.; Birol, I. (2010) *De novo* assembly and analysis of RNA-seq data. **Nat Methods** 7:909–912.

Rutherford, K.; Parkhill, J.; Crook, J.; Horsnell, T.; Rice, P.; Rajandream, M.; Barrell, B. (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics.** 16(10):944–5

Schmieder, R.; Lim, Y.W.; Rohwer, F.; Edwards, R. (2010) TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. **BMC Bioinformatics.** 11:341.

Schubert, M.; Lindgreen, S.; Orlando, L. (2016) AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. **BMC Res Notes.** 9:88.

Schulz, M.H.; Zerbino, D.R.; Vingron, M.; Birney, E. (2012) Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics.** 28:1086–92.

Silva, G.G.Z.; Cuevas, D.A.; Dutilh, B.E.; Edwards, R.A. (2014) FOCUS: an alignment-free model to identify organisms in metagenomes using non-negative least squares. **PeerJ.** 2:e425.

Silva, G.G.Z.; Green, K.T.; Dutilh, B.E.; Edwards, R.A. (2016) SUPER-FOCUS: a tool for agile functional analysis of shotgun metagenomic data. **Bioinformatics.** 32:354–361.

Sim, G.K.; Kafatos, F.C.; Jones, C.W.; Koehler, M.D.; Efstratiadis, A.; Maniatis, T. (1979). Use of a cDNA library for studies on evolution and developmental expression of the chorion multigene families. **Cell.** 18(4): 1303–1316. ISSN 0092-8674.

Trapnell, C.; Roberts, A.; Goff, L.; Pertea, G.; Kim, D.; Kelley, D.R.; Pimentel, H.; Salzberg, S.L.; Rinn, J.L.; Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat Protoc.** 7:562–578.

Waiho, K.; Fazhan, H.; Shahreza, M.S.; Moh, J.H.Z.; Noorbaiduri, S.; Wong, L.L. Sinnasamy, S.; Ikhwa- nuddin, M. (2017) Transcriptome Analysis and Differential Gene Expression on the Testis of Orange Mud Crab,

*Scylla olivacea*, during Sexual Maturation. **PLoS One**. 12:e0171095.

Wang, K.; Singh, D.; Zeng, Z.; Coleman, S.J.; Huang, Y.; Savich, G.L.; He, X.; Mieczkowski, P.; Grimm, S.A.; Perou, C.M.; MacLeod, J.N.; Chiang, D.Y.; Prins, J.F.; Liu, J. (2010) MapSplice: Accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. **Nucleic Acids Res**. 38:e178–e178.

Wu, T.D.; Reeder, J.; Lawrence, M.; Becker, G.; Brauer, M.J. (2016) GMAP and GSNAP for Genomic Sequence Alignment: Enhancements to Speed, Accuracy, and Functionality. In: **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.) p. 283–334

Xie, Y.; Wu, G.; Tang, J.; Luo, R.; Patterson, J.; Liu, S.; Huang, W.; He, G.; Gu, S.; Li, S.; Zhou, X.; Lam, T.-W.; Li, Y.; Xu, X.; Wong, G.K.-S.; Wang, J. (2014) SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads. **Bioinformatics**. 30:1660–1666.

Zerbino, D.R.; Birney, E. (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Res**. 18:821–9.

Zhao, Y.; Tang, H.; Ye, Y. (2012) RAPSearch2: a fast and memory-efficient protein similarity search tool for next-generation sequencing data. **Bioinformatics**. 28:125–6.



# PROTEÔMICA E METAPROTEÔMICA

Eidy de Oliveira Santos<sup>a,b</sup>  
Gizele Duarte Garcia<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>b</sup> Centro Universitário Estadual da Zona Oeste do Rio de Janeiro.

## RESUMO

A proteômica compreende um conjunto de estratégias de estudo para caracterização de grupos de proteínas expressas por células com o mesmo genoma (proteomas), ou até mesmo por diferentes tipos celulares que formam uma comunidade (metaproteoma). Proteomas e metaproteomas são resultado de expressões funcionais e dinâmicas dos genomas, uma vez que mudam a composição de acordo com a regulação da expressão gênica das células. Essa caracterização inclui a identificação das proteínas, assim como a determinação da localização proteica, das modificações pós-traducionais e interações entre diferentes proteínas. Estudos em proteômica incluem etapas de coleta ou cultivo da amostra, extração e fracionamento da mistura de proteínas, análise por espectrometria de massas e interpretação dos dados para identificação e caracterização de centenas de proteínas simultaneamente. A escolha do método de coleta e extração depende da origem e particularidade da amostra biológica. A mistura de proteínas recém-extraída é geralmente fracionada por metodologias baseadas em gel ou por cromatografia líquida, cujos princípios de separação baseiam-se nas propriedades físico-químicas das proteínas e polipeptídeos das misturas, como massa molecular, ponto isoeletrico, hidrofobicidade, carga iônica e outras. A identificação de estruturas primárias e secundárias das proteínas, assim como a caracterização de modificações pós-traducionais, é resultado da interpretação dos dados da análise de espectrometria de massas, uma técnica analítica que mede valores da razão massa/carga de moléculas ionizadas. Duas abordagens usadas são a estratégia *top-down*, que examina proteínas ou polipeptídeos intactos, e a *bottom-up*, que analisa peptídeos derivados da digestão das cadeias de proteínas, gerando dados sobre a sequência de aminoácidos. O sucesso de uma caracterização proteômica depende principalmente da presença de sequências de nucleotídeos ou aminoácidos depositados em bancos de dados disponíveis na *web*. A análise proteômica de organismos marinhos permite a compreensão de suas vias metabólicas, mecanismos patológicos, adaptação ao estímulo ambiental e aparelhos de interação para sinalização na comunidade microbiana.

# 1 | FUNDAMENTOS DE PROTEÔMICA E METAPROTEÔMICA

A proteômica é uma das áreas “ômicas” de estudo que inclui abordagens metodológicas para caracterização global do padrão de expressão de proteínas para entender a funcionalidade de células, tecidos, e até mesmo compartimentos intra- e extracelulares. Ao longo do tempo, os objetivos se tornaram mais amplos e incluíram também aspectos de determinação da localização e interação entre as proteínas. Mais recentemente, uma subárea da proteômica emergiu com enorme impacto na microbiologia: a metaproteômica, que visa elucidar o contexto funcional de uma comunidade microbiana através da caracterização global de todas as proteínas expressas por essa microbiota em um determinado ambiente e tempo (Santos, 2016).

As proteínas são provavelmente a classe de macromoléculas mais versátil, e compreendem, sem contar com a água, a maior fração celular. A importância da análise de proteínas é evidente, já que são os principais agentes funcionais de uma célula, podendo agir como catalisadores, elementos estruturais, receptores de sinais, fatores regulatórios, transportadores, além de diversas outras funções (Yarmush; Jayaraman, 2002). Soma-se a isso a vantagem de que a caracterização de proteínas permite uma visão da expressão gênica da célula no último nível de regulação gênica, após os eventos de regulação pós-transcricional e pós-traducional. Muitas proteínas podem ser processadas em vários estágios por clivagem proteolítica e modificações pós-traducionais, principalmente em eucariotos. Esses eventos aumentam a variabilidade de moléculas funcionais e, conseqüentemente, de mecanismos celulares. Com isso, a análise de proteínas permite o entendimento de como as células trabalham em condições específicas (Glazer; Nikaido, 2007).

O proteoma de uma célula ou organismo consiste no conjunto global de PROTEÍNAS expressas pelo genOMA dessa célula/organismo em determinada condição, tempo e/ou ambiente. Enquanto o genoma demonstra as possibilidades funcionais, o proteoma fornece informações sobre o que está sendo expresso e funcional em determinado tempo e condição. O conjunto de proteínas expressas por uma célula, ao contrário do genoma que é estático, é bastante dinâmico e dependerá das condições particulares ou do momento fisiopatológico da mesma. A caracterização de proteomas celulares permite, em adição, a determinação de funções, modificações pós-traducionais e localização das proteínas, assim como da interação entre elas. Pode incluir a caracterização de proteínas intracelulares, subcelulares, de membrana e/ou secretadas (Yarmush; Jayaraman, 2002).

Os estudos em proteômica iniciaram na chamada *era* pós-genômica, em meados de 1970, quando a comunidade científica começou a procurar entender o papel funcional das seqüências genômicas recém-descritas. O aprimoramento metodológico foi primordial para o grande impulso em projetos nessa área, que atualmente é amplamente investigada em centros de pesquisas em todo o mundo. O desenvolvimento da eletroforese bidimensional (2D-GE, item 2.3.1) possibilitou que misturas complexas de proteínas fossem separadas em polipeptídeos individualizados, permitindo a análise global da resposta celular a diversas condições ambientais

ou fisiológicas. Contudo, a identificação dos polipeptídeos ainda era um limitante, devido à falta de sensibilidade, praticidade e rapidez nas técnicas disponíveis. A partir de 1990, o aprimoramento da espectrometria de massas (MS, item 2.4), com o uso de técnicas suaves de ionização recém-desenvolvidas por Karas, Hillenkamp e Fenn, foi um grande avanço na proteômica. Tal método permite a ionização de macromoléculas, como proteínas e peptídeos, de forma altamente eficiente e com quase nenhuma degradação da amostra, e posterior análise de massas dos íons formados, o que possibilita a caracterização das proteínas de forma rápida e sensível (Karas; Hillenkamp, 1988; Fenn et al., 1989). Ao longo dos últimos 15 anos, o aperfeiçoamento dos equipamentos de MS foi acompanhado por grandes avanços nos projetos de caracterização de proteínas. Em paralelo, ocorreram progressos nas ferramentas de bioinformática, com o surgimento de programas direcionados à análise de imagens de géis 2D e de dados de espectrometria de massas, permitindo tanto a detecção de padrões de expressão diferencial nos géis, quanto a identificação de proteínas e de modificações pós-traducionais, pela busca contra bancos de dados de sequências de aminoácidos (Maron et al., 2007; Santos, 2016).

Os avanços nas técnicas de proteômica, juntamente com o crescente número de genomas completos de micro-organismos gerados e disponibilizados, criaram a possibilidade de associar filogenia e função microbianas. Nesse contexto, a caracterização do proteoma de organismos-modelo facilitou a descrição de vias metabólicas envolvidas em várias funções e interações intra e inter organismos, tais como simbioses, mecanismos de patogenicidade, resistência a antimicrobianos e adaptações a condições de estresse. Tais estudos enfatizam a relevância da análise do proteoma para a investigação de alterações globais da expressão gênica de organismos procarióticos e para o avanço do conhecimento acerca dos processos que regulam a expressão gênica. Contudo, a grande maioria dessas análises/investigações foram realizadas sob condições laboratoriais, no nível individual, sem, portanto, considerar as interações bióticas (entre micro-organismos) e abióticas (entre os micro-organismos e seus habitats naturais) que governam a ecologia das comunidades microbianas *in situ*. Portanto, novas técnicas se fizeram necessárias para tornar possível a caracterização *in situ* da expressão proteica no nível de populações, ou mais amplamente, no nível de comunidades. O principal desafio da proteômica ambiental é exatamente mapear proteínas extraídas de comunidades microbianas indígenas e identificar, de forma não direcionada, novas vias metabólicas e seus genes associados (Maron et al., 2007).

Considerando que somente cerca de 1-2% dos micro-organismos presentes em todos os ambientes conhecidos podem ser isolados e cultivados, e ainda, que indivíduos isolados/removidos de seus ambientes podem exibir características diferentes, sob condições laboratoriais de cultivo, daquelas observadas em seus nichos ecológicos originais onde as interações bióticas e abióticas se desenvolvem, as técnicas moleculares definidas como “META (depois/além de)ômicas” vêm permitindo acesso ao real *status* funcional de diversos ecossistemas (Kan et al., 2005; Armengaud et al., 2013; Hilmes et al., 2015).

Nesse contexto, a metaproteômica compreende um novo campo dentro das “METAômicas” que pode ser definido como a “caracterização, em larga escala, do conjunto total de proteínas que são expressas pela comunidade microbiana associada a um ecossistema, num dado momento”, desempenhando papel-chave na determinação da sua assinatura funcional. Ainda,

vem demonstrando grande potencial para desvendar/ revelar novos genes funcionais e suas interações com o meio-ambiente, assim como suas funções microgeoquímicas. Tem sido aplicada na análise da microbiota associada a diversos ambientes e microambientes, incluindo hospedeiros vivos (Wilmes; Bold, 2004; Morris et al., 2010; Siggins et al., 2012; Hawley et al., 2014; Wilmes et al., 2015; Garcia et al., 2016)

O desenvolvimento de técnicas e estratégias de metaproteômica tem permitido avanços no conhecimento acerca da composição da microbiota associada e do funcionamento de inúmeros consórcios microbianos naturais e artificiais, como lodo ativado, plantas de degradação anaeróbica e de produção de biogás, sistemas de tratamento de águas residuais, corpos d'água contaminados com cloreto de vinila (cloroeteno) e metais, água subterrânea contaminada com alcatrão de carvão, biofilmes associados a drenado de minas ácidas resultantes da atividade de mineração, ambientes lacustres e marinhos, solo de diferentes ambientes e microbiota associada a animais invertebrados e vertebrados, incluindo os seres humanos (Wilmes et al., 2008; Mueller et al., 2010; Sowell et al., 2011; Kleiner et al., 2012; Herbster et al., 2013; Doug et al., 2014; Hansen et al., 2014; Hawley et al., 2014; Urich et al., 2014; Hanson; Madsen, 2015; Wilmes et al., 2015; Garcia et al., 2016).

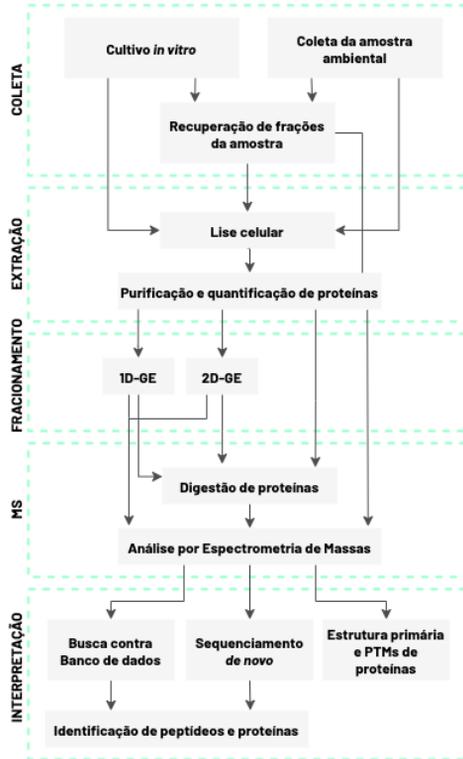
## 2 | ABORDAGENS METODOLÓGICAS

As abordagens proteômicas englobam metodologias que permitem a caracterização simultânea de misturas complexas de proteínas. Os principais objetivos são identificar e quantificar a expressão proteica, além de mensurar as mudanças nessa expressão em resposta a diferentes condições ambientais e tempo. Blackstock e Weir propuseram que o desenvolvimento da pesquisa em proteoma segue dois caminhos: a determinação da expressão proteica e a determinação de suas interações. Em uma fase inicial, a determinação de grupos de proteínas expressos em um mapa de proteoma de uma amostra particular é bastante representativa. Posteriormente, o estudo de interações proteicas pode facilitar a determinação de mecanismos celulares (Blackstock; Weir, 1999).

De forma geral, as estratégias experimentais em proteômica incluem cinco passos principais: (i) coleta ou cultivo da amostra; (ii) extração das proteínas; (iii) fracionamento da mistura de proteínas; (iv) análise por espectrometria de massas; (v) interpretação dos dados para identificação e caracterização das proteínas e/ou peptídeos (Figura 1). Cada etapa será detalhada nas seções posteriores.

### 2.1 COLETA E PRESERVAÇÃO

Na caracterização de proteomas e metaproteomas, as particularidades das amostras, tais como a dificuldade de acesso e abundância do material, e a presença de contaminantes determinam a metodologia de coleta. Essa primeira etapa inclui tanto a coleta de amostras do ambiente, como o cultivo de organismos ou micro-organismos *in vitro*, além do fracionamento,



**Figura 1.** Fluxo de trabalho em projetos de análise proteômica. Diferentes procedimentos podem ser adotados em cada uma das cinco fases, em negrito. (i) A coleta pode ocorrer após o cultivo em laboratório (*in vitro*) do modelo de estudo, ou a partir de uma amostra retirada diretamente de um hábitat natural, principalmente no caso de análise de metaproteomas. As amostras podem ser fracionadas para recuperação de uma fração subcelular, extracelular ou de tipos celulares dentro de um metaproteoma, sendo posteriormente direcionadas para extração proteica. (ii) A etapa de extração inclui métodos de lise celular, purificação e quantificação das proteínas. Há projetos em que lise celular não é necessária, devido ao fracionamento prévio da amostra, no caso de proteínas extracelulares ou de vesículas secretadas, principalmente. (iii) A mistura complexa de proteínas pode ser separada com o uso de eletroforese unidimensional (1D-GE) ou bidimensional (2D-GE), ou por cromatografia líquida (LC). (iv) A etapa de espectrometria de massas (MS) pode ser realizada tanto com proteínas previamente fracionadas, quanto com as amostra complexas purificadas na etapa de extração. A maior parte dos projetos de proteômica utilizam a abordagem bottom-up (ver seção 2.4.1), que fornece dados para identificação de proteínas ou para sequenciamento de peptídeos (sequenciamento de novo). Nesta, as proteínas são submetidas a digestão com proteases, gerando peptídeos que serão analisados nos espectrômetros de massas. Proteínas fracionadas em géis são recortadas e processadas com protocolo de digestão *in gel*. Proteínas purificadas por LC e misturas complexas são digeridas em solução. Entretanto, em alguns projetos, as proteínas individualizadas, por experimentos dependentes de gel ou não, podem ser diretamente caracterizadas por espectrometria de massas, em uma abordagem denominada top-down, em que se obtêm dados da estrutura primária e de modificações pós-traducionais (PTMs) das proteínas após a interpretação dos dados. (v) A análise por MS dos peptídeos resultantes da digestão gera dados sobre as massas e parte das sequências destes peptídeos, que são utilizados em programas de busca contra banco de dados de sequências ou contra programas de previsão da sequência exata de peptídeos (sequenciamento de novo), ambos com o objetivo final de identificar proteínas e peptídeos presentes nos proteomas e metaproteomas.

em alguns casos, e preservação da amostra (Figura 1). Na maioria dos projetos de proteômica marinha, o material recém-coletado é diretamente transferido para armazenamento em  $-80^{\circ}\text{C}$  ou nitrogênio líquido, até a etapa de extração (Sowell et al., 2009; 2011). Há trabalhos, no entanto, em que é necessário processar a amostra para a recuperação de uma fração específica, como é o caso da concentração da microbiota planctônica da água, com o uso de filtração convencional ou com fluxo tangencial, em filtros com poros seletivos, como os de 3 e  $0,22\ \mu\text{m}$ , para selecionar eucariotos e procariotos, respectivamente (Kan et al., 2005; Morris et al., 2010; Teeling et al., 2012; Morris; Nunn, 2013). Metodologia de centrifugação diferencial pode ser aplicada para o enriquecimento da amostra com micro-organismos simbióticos de holobiontes marinhos, ou para recuperação de frações de membrana ou com organelas específicas dentro da célula. Em estudos de proteínas secretadas ou presentes no meio extracelular, métodos de purificação são utilizados diretamente após a coleta, como descrito na seção posterior.

Em trabalhos em que a coleta e o processamento de metaproteomas são mais morosos, utiliza-se a adição de inibidores de tradução e de proteases na solução de armazenamento, impedindo que a diversidade de proteínas presente na amostra seja alterada. Como o objetivo da metaproteômica é capturar o perfil de expressão em um determinado momento da amostra, é imperativo o uso de procedimentos que inibam a presença de contaminantes que possam interferir ou modificar a composição natural da microbiota ou das proteínas da amostra (Sigginset al., 2012). Uma vez que as amostras de água são coletadas, por exemplo, a fração microbiana é geralmente concentrada imediatamente antes do armazenamento. Para interromper a expressão proteica, em resposta ao manuseio da amostra, estratégias como a fixação química (Kan et al., 2005) ou a fixação de micro-ondas (Mary et al., 2010) foram empregadas.

## 2.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Devido à grande diversidade de amostras biológicas, o protocolo ideal de extração e purificação das proteínas, procedimentos essenciais para caracterização dos proteomas e metaproteomas, deve ser determinado experimentalmente. Como resultado final, esses processos devem gerar misturas complexas de proteínas solubilizadas e totalmente desnaturadas. Uma vez a célula rompida, as proteínas da amostra ficam sujeitas à ação de proteases, o que é evitado com baixa temperatura, a presença de agentes desnaturantes e inibidores de proteases durante o procedimento, com o objetivo de rapidamente inativar proteases ou outras atividades enzimáticas que poderiam modificar as proteínas (Berkelman, 1998).

O acesso a proteínas intracelulares e de membrana ocorre com o uso de métodos de rompimento da membrana plasmática e destruição celular (Figura 1). Diversos métodos de ruptura celular são utilizados, podendo ser suaves ou vigorosos, o que depende da origem biológica da amostra (suspensões celulares, tecidos sólidos ou outro material biológico) (Tabela 1). Muitas vezes, essas técnicas são usadas em conjunto para obter o melhor resultado na extração – por exemplo, lise osmótica após tratamento enzimático, congelamento-descongelamento na presença de detergente (Berkelman, 1998; Morris; Nunn, 2013). Em casos em que o modelo de estudo inclui organismos com parede celular, enzimas hidrolíticas devem ser utilizadas previamente a outro método de lise. Em extrações com amostras de alta diversidade celular, como

no caso de microbiomas e holobiontes, geralmente são utilizados métodos mais vigorosos, ou combinações destes, para garantir a lise de todos os tipos celulares presentes.

**Tabela 1.** Métodos de lise celular utilizados nas abordagens proteômicas.

MÉTODOS SUAVES	DESCRIÇÃO	APLICAÇÃO
Lise osmótica	As amostras são suspensas em soluções hiperosmóticas, cujos extratos podem ser posteriormente submetidos ao fracionamento em componentes subcelulares.	Culturas de células e tecidos
Lise por congelamento e aquecimento	As células são submetidas a um ou mais ciclos de rápido congelamento (com nitrogênio líquido) e subsequente aquecimento.	Bactérias, arqueias e culturas de células
Lise com uso de detergentes	Detergentes presentes em tampões de lise solubilizam a membrana celular.	Bactérias, arqueias e culturas de células
Lise enzimática	As paredes celulares são enzimaticamente removidas com o uso de enzimas específicas, como lisozima, para células bacterianas, e lincas-es, para leveduras.	Plantas, algas, bactérias e fungos
MÉTODOS ROBUSTOS	DESCRIÇÃO	APLICAÇÃO
Sonicação	Ondas de ultrassom geradas pelo sonicator rompem as células em suspensão através de força de cisalhamento.	Suspensões celulares
Célula de pressão francesa	As células são empurradas sob alta pressão contra uma superfície, sendo forçadas a passar por um pequeno orifício, resultando na ruptura celular por força de esmagamento.	Micro-organismos com paredes celulares
Maceração	As células são normalmente congeladas com nitrogênio líquido e maceradas com o uso de uma tígela almofariz e um pilão, até formar pó.	Tecidos sólidos e micro-organismos
Homogeneização mecânica	Tecidos sólidos podem ser homogeneizados por diversos misturadores ou outros dispositivos motorizados, como os homogeneizadores Potter-Elvehjem. Os tecidos são colocados inteiros ou em pedaços na presença de um tampão refrigerado.	Tecidos sólidos ou suspensões celulares concentradas
Homogeneização com <i>beads</i> de vidro	Pequenas esferas de vidro ( <i>beads</i> ) são misturadas à amostra e vortexadas. A ação abrasiva das <i>beads</i> durante a mistura quebra as paredes e membranas celulares.	Suspensões celulares e micro-organismos

Após o rompimento da membrana, as proteínas e os demais componentes intracelulares são liberados em solução, formando o extrato bruto ou homogeneizado. A purificação proteica ocorre geralmente por centrifugação convencional do extrato bruto, resultando na separação da fase aquosa contendo proteínas, no sobrenadante, do sedimento mais denso com restos celulares que se depositam no fundo do tubo. A solução aquosa pode ser imediatamente processada nas etapas subsequentes de quantificação e separação, ou pode ser anteriormente sub-

metida a protocolos de fracionamento celular. Em trabalhos de caracterização de proteínas de frações subcelulares, como é o caso de membranas ou organelas, o extrato bruto é previamente fracionado por centrifugação diferencial ou gradiente de densidade. Ambas as estratégias de centrifugação permitem a separação das estruturas celulares em várias frações de diferentes densidades, cada uma contendo centenas de proteínas diferentes (Berg et al., 2002). O enriquecimento da amostra para proteínas ou peptídeos com modificações pós-traducionais específicas, tais como fosforilação, é alcançado através de imunoprecipitação ou utilização de colunas de cromatografia de afinidade (Sano; Nakamura, 2004; Reinders; Sickmann, 2005).

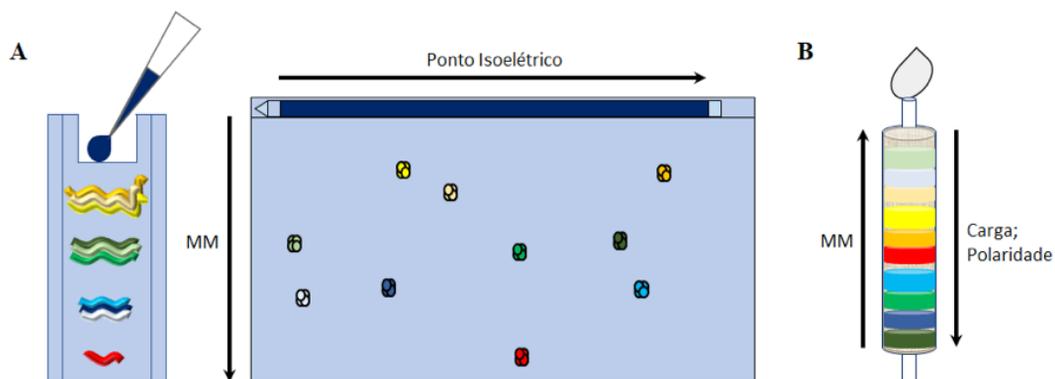
Proteínas extracelulares, no entanto, são purificadas diretamente por precipitação ou filtração em membranas porosas. A filtração permite que a solução proteica seja concentrada através de filtros que permitem a passagem de sal, solvente e moléculas menores que o limite do poro da membrana. A filtração também pode ser aplicada para limpeza e purificação de proteínas intracelulares recém-extraídas, além de métodos de precipitação. Os seguintes procedimentos de purificação também podem ser realizados, como a precipitação de proteínas com o uso de acetona, metanol, ácido tricloroacético (TCA) ou kits comerciais de limpeza (Nelson; Cox, 2012). A precipitação da fração proteica, pela adição de acetato de amônia em metanol ou isopropanol, é amplamente utilizada em protocolos de extração com fenol e trizol, respectivamente. Essa técnica é usual em análises proteômicas de organismos complexos como plantas, algas e até mesmo corais. Após maceração com nitrogênio líquido, as amostras ressuspendidas em tampões saturados com fenol ou reagentes de trizol e as proteínas são extraídas a partir das frações orgânicas, com posterior lavagem com acetona (Garcia et al., 2016).

Outro procedimento útil é a adição de um sal na quantidade certa que pode precipitar seletivamente algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução. O sulfato de amônio é frequentemente usado para esse propósito, devido a sua alta solubilidade em água. A solubilidade das proteínas geralmente é reduzida em altas concentrações de sal, um efeito chamado *salting out*. No caso de amostras de origem marinha e principalmente soluções de proteínas precipitadas por *salting out*, a dessalinização pode ser realizada por diálise em membranas porosas. Na diálise, a solução de proteínas é colocada dentro de membranas semipermeáveis que são imersas em um volume maior de solução hipotônica, permitindo a troca de sal e tampão, mas não de proteínas, que ficam retidas por serem maiores que os poros da membrana (Nelson; Cox, 2012). Após a purificação, as misturas de proteoma podem ser fracionadas com o uso de diversas estratégias abaixo descritas.

### **2.3 FRACIONAMENTO DA MISTURA DE PROTEÍNAS**

A complexidade da mistura de proteínas, os níveis de expressão e modificação, e a localização intracelular interferem na escolha da tecnologia proteômica de fracionamento e identificação proteica (Blackstock; Weir, 1999). Considerando a alta diversidade de proteínas em proteomas e metaproteomas, em alguns casos são utilizadas estratégias para separar em frações ou individualizar as proteínas. O fracionamento permite a observação de todo ou maior parte do perfil de proteínas de uma mistura complexa, permitindo a avaliação individualizada de massa e modificações de cada cadeia polipeptídica, ou pelo menos de pequenos

grupos destas. As metodologias como eletroforese em gel de poliacrilamida e cromatografia proporcionam a separação de proteínas nas classes, de acordo com suas características físico-químicas (Figura 1).



**Figura 2.** Métodos de separação de proteínas e peptídeos. (A) Métodos baseados em gel para separação de proteínas. Na figura à esquerda, a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), ou eletroforese unidimensional, na qual a mistura contendo polipeptídeos desnaturados e carregados negativamente, pela ação do SDS, são separados com base na massa molecular (MM). Polipeptídeos com MM similares (linhas com mesma tonalidade de cor) migram juntos, formando uma mesma banda heterogênea no gel. Ao centro, a eletroforese bidimensional (2D-GE), cuja resolução de separação é maior, já que separa as cadeias polipeptídicas em duas dimensões. Na primeira, as proteínas, contendo suas cargas originais, são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos (pIs), em um gel com gradiente de pH (de ácido para básico). Na segunda dimensão, as proteínas pré-fractionadas são submetidas a SDS-PAGE, para fracionamento pelas suas MMs, resultando na formação de um gel 2D com spots (esferas coloridas) que representam as cadeias polipeptídicas individualizadas. (B) Cromatografia líquida em coluna, um método de fracionamento de proteínas e peptídeos independente de gel. Os analitos são separados de acordo com suas interações com a matriz (fase estacionária) de preenchimento da coluna, e com o solvente (fase móvel) que atravessa a coluna e carrega a amostra. Diversos tipos de colunas cromatográficas são utilizados para o fracionamento de proteínas ou peptídeos (bandas coloridas ao longo da coluna), de acordo com a polaridade e a carga, de forma diretamente proporcional, e com base na massa molecular desses analitos, de forma inversamente proporcional. Em colunas preenchidas com componentes hidrofóbicos, apolares ou ionizados, moléculas com maior hidrofília, polaridade ou carga similar à da matriz terão maior afinidade pelo solvente e serão eluídas nas fases iniciais, com menor tempo de retenção. Por outro lado, analitos mais hidrofóbicos, apolares ou que tenham carga contrária à da matriz terão maior afinidade pela matriz e serão retidos pela mesma, apresentando maior tempo de retenção na cromatografia. No caso de colunas de fracionamento por tamanho, a matriz possui pequenos canais porosos por onde os proteínas e peptídeos menores entram e, conseqüentemente, percorrem um caminho maior na coluna cromatográfica. Neste último caso, portanto, moléculas maiores passam mais rapidamente pela coluna e saem nas primeiras fases de eluição, enquanto moléculas menores são atrasadas, apresentando maior tempo de retenção na cromatografia.

### 2.3.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica amplamente utilizada para separar proteínas e polipeptídeos com base nas massas moleculares. Os géis de poliacrilamida

são formados pela polimerização da acrilamida ligada com a metilenobisacrilamida, resultando em uma matriz quimicamente inerte e prontamente formada. A eletroforese ocorre em géis verticais, nos quais moléculas carregadas negativamente se movem, através dos poros, em um campo elétrico do cátodo (no topo) em direção ao ânodo (na base do gel). As moléculas percorrem uma maior distância no gel, ficando depositadas na base do gel, enquanto que as maiores migram menos e ficam na parte superior do gel, devido à dificuldade de passar por entre os poros (Berg et al., 2002). Esse procedimento é realizado sob condições nativas ou desnaturantes. No experimento desnaturante, a mistura de proteínas é previamente dissolvida em uma solução com dodecilsulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico que interrompe as interações não covalentes das proteínas nativas, sendo chamado eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS (SDS-PAGE - *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS forma micelas globulares que se complexam com proteínas e protegem a carga inerente das cadeias laterais, resultando na desnaturação de complexos proteicos e a adição de carga negativa às cadeias polipeptídicas linearizadas, condição essencial para a eletroforese. Além do SDS, são adicionados agentes redutores tais como mercaptoetanol (2-tioetanol) ou ditiotreitól (DTT) para reduzir as ligações dissulfeto presentes nas proteínas. Em condições desnaturantes, há uma relação aproximadamente linear e reversa entre o logaritmo do peso molecular e a distância relativa de migração do complexo SDS-polipeptídeo. Comparada com métodos recentes, em que as proteínas são separadas de acordo com dois ou mais caracteres, a eletroforese em gel de poli(acrilamida) também é conhecida como eletroforese unidimensional (1D-GE) (Shapiro et al., 1967; Santos, 2016).

O desenvolvimento de uma metodologia mais robusta de separação de proteínas, a eletroforese bidimensional (2D-GE), foi crucial para a ampliação dos estudos de proteômica e consolidação dessa área. Essa técnica permite a separação de misturas de centenas de proteínas, de acordo com duas propriedades independentes: o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM) da proteína (O'Farrel, 1975). Na primeira dimensão, chamada focalização isoelétrica (IEF, *isoelectric focusing*), a mistura de proteínas é submetida à focalização isoelétrica, na qual as proteínas são colocadas em um gradiente de pH e submetidas a uma eletroforese em gel não desnaturante. Dependendo do pH do meio, as proteínas alteram sua carga líquida, que é a soma de todas as cargas negativas e positivas de suas cadeias laterais de aminoácidos e terminais amino e carboxilas arredores. O ponto isoelétrico é o pH específico no qual a carga líquida da proteína é zero (Haglund, 1971). Quando o pH do meio está acima do seu pI, a proteína adquire carga líquida negativa; e quando o pH do meio é inferior ao valor do pI, a carga líquida da proteína é positiva. Com isso, durante a IEF, cada proteína irá migrar ao longo do gradiente pH, devido aos somatórios de cargas adquiridos por elas, até chegar ao pH em que a soma das cargas é nula e, portanto, não sofre a ação do campo elétrico. O resultado da IEF é a separação das proteínas em diferentes faixas de pH, mesmo que as diferenças de carga entre elas sejam pequenas. Na segunda dimensão, as proteínas previamente focalizadas são submetidas a SDS-PAGE para separação das cadeias polipeptídicas de acordo com suas massas moleculares. A combinação dessas duas etapas em sequência resulta na formação de um gel bidimensional (2-D) contendo centenas de manchas individualizadas de formato arredondado, chamadas *spots*, que correspondem idealmente a cadeias polipeptídicas individualizadas com valores de pI e MM específicos (Wittman-Liebold et al., 2006; Falk et al., 2007).

A coloração de géis permite a visualização das proteínas e fornece dados da abundância relativa das bandas coradas no gel. Em géis 2D, a visualização da intensidade dos *spots* permite que seja feita uma quantificação de cada polipeptídeo individualizado, quando se comparam diferentes condições de uma mesma amostra. Os métodos de coloração de géis devem incluir características desejáveis como alta sensibilidade, ampla faixa linear para quantificação, compatibilidade com tecnologia de identificação de proteínas e baixa toxicidade. No entanto, nenhum dos métodos atende a todos esses requisitos, devendo-se escolher a metodologia que seja mais adequada para cada amostra (Santos, 2016). A autorradiografia, na qual as proteínas são marcadas com átomos radioativos, e a coloração com zinco-imidazol, métodos historicamente usados em estudos de bioquímica de proteínas, possuem alta sensibilidade, mas são claramente desvantajosas devido à geração de resíduos poluentes e a baixa capacidade de quantificação, respectivamente (Fernandez-Patron et al., 1998).

A coloração por prata é baseada na ligação de íons de prata às proteínas, formando prata metálica (Merrill et al., 1981; Switzer et al., 1989). Esse método permite a detecção de até 1ng de proteína e também cora as proteínas até um ponto determinado empiricamente. No entanto, a coloração por prata é um processo de vários passos que utiliza inúmeros reagentes para os quais a qualidade é crítica, além de possuir uma faixa linear de quantificação menor que a do Coomassie (Quadroni; James, 1999). O método mais utilizado é a coloração de géis com Coomassie, devido à simplicidade do protocolo. Apresenta menor sensibilidade (de 50 a 100ng de proteína), comparado aos outros métodos, mas possui uma faixa linear de quantificação das proteínas de 10 a 30 vezes (Patton, 2002). Esse método se baseia na afinidade das proteínas pelo corante. O ponto final da coloração é determinado empiricamente pelo pesquisador, o que dificulta a reprodutibilidade de gel para gel. A vantagem dessa técnica é a compatibilidade com métodos de caracterização e identificação de proteínas, como a espectrometria de massa (Fazekas et al., 1963). São recomendados métodos de coloração coloidal de Coomassie, porque mostram a maior sensibilidade, até 100 ng/mancha de proteína (Neuhoff et al., 1985; 1988).

A visualização de proteínas por marcação com fluorescência oferece protocolos de coloração robustos, reprodutibilidade e uma ampla faixa dinâmica para quantificação. Esse método é altamente sensível (1ng de proteína ou menos) e compatível com espectrometria de massa (Patton, 2002). Além disso, corantes fluorescentes permitem a detecção das proteínas com apenas uma etapa de coloração, sem procedimento de descoloração, ou após serem escaneados diretamente em equipamentos que possuem fontes de excitação dos fluoróforos e detectores da energia por eles liberada. Para esse tipo de experimento, foram desenvolvidos *scanners* e programas de computador específicos para a obtenção e processamento das imagens. Nesse caso, os *spots* são detectados a partir da identificação dos pontos de emissão da fluorescência no gel. Após marcadas especificamente com diferentes fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5), as proteínas de diferentes amostras podem ser aplicadas em conjunto na focalização isoeétrica, junto com um padrão interno formado pela mistura de todas as amostras a serem analisadas. A pré-visualização de géis é realizada após a digitalização em equipamentos compatíveis com corantes. Além disso, como as amostras analisadas são fracionadas em conjunto na mesma tira de pH e no mesmo gel, não ocorrem distorções de coloração entre géis comparados. Como não é necessário manipular as imagens dos géis para a detecção e comparação

de manchas, isso garante a imparcialidade e reprodutibilidade da análise (Goldfarb, 2007; Riederer, 2008; Timms; Cramer, 2008).

Quando associado à espectrometria de massa (MS), 2D-GE permitiu o desenvolvimento de diversos projetos de identificação e caracterização de centenas de proteínas de organismos e micro-organismos marinhos (Pennington et al., 1997; Falket al., 2007). No entanto, uma das maiores limitações do uso de géis 2-D é a dificuldade de se solubilizar um grande número de proteínas, em apenas um tampão de solubilização. Proteínas de membrana são de difícil solubilização e as proteínas hidrofóbicas e de MM muito altas (>200kDa) tendem a precipitar durante a focalização isoeétrica, o que diminui a possibilidade de observar um padrão completo de proteoma da amostra (Fey; Larsen, 2001). O desenvolvimento de detergentes zwitteriônicos, como o CHAPS (3-[(3-colaminopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato), que melhoram a solubilização de proteínas hidrofóbicas, permitiu um aumento na qualidade dos géis, mas esses detergentes podem afetar a resolução das outras proteínas hidrofílicas presentes na mistura (Rabilloud; Chevallet, 2000). O desenvolvimento de tiras de géis pré-fabricados com gradientes de pH imobilizados permitiu um aumento na resolução e reprodutibilidade na focalização isoeétrica (Görg et al., 2000; Wittman-Liebold et al., 2006). Quando a metodologia baseada em gel não é útil ou vantajosa para a caracterização proteômica, estão disponíveis outros métodos tradicionais de fracionamento de proteínas, como a cromatografia líquida.

### 2.3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida (CL) é uma das técnicas mais antigas e habituais na bioquímica de proteínas. Historicamente, a cromatografia líquida em colunas vem sendo amplamente usada como estratégia para diminuir a complexidade de amostras de proteínas e peptídeos de acordo com suas características físico-químicas, tais como o peso molecular, a hidrofobicidade ou a carga. Nesse método, a amostra é aplicada no topo de uma coluna cilíndrica preenchida com uma matriz sólida permeável e fixa. A matriz atua como fase estacionária, por onde proteínas e peptídeos migram, sendo carregados por um solvente, que é a fase móvel líquida. A amostra interage com as duas fases, estacionária e móvel, e o grau de migração de cada molécula é determinado de acordo com os diferentes graus de interação com o solvente e as partículas da matriz. As moléculas com maior afinidade com a fase estacionária são desaceleradas durante a cromatografia e dificilmente transportadas pela fase móvel (Neto; Nunes, 2003). Tipicamente, é utilizada uma mistura de solventes, como água, solução salina, acetonitrila e/ou metanol. As moléculas eluídas são recuperadas em alíquotas separadas à medida que emergem no final da coluna. As moléculas de eluição inicial têm maior afinidade para a fase móvel, enquanto as últimas têm maior afinidade para a fase estacionária. As diferenças nas taxas de movimento através da matriz são calculadas para tempos de retenção da amostra (Vogel, 2002; Berg et al., 2002).

A composição da matriz, entre outros fatores, determina as propriedades de fracionamento dos analitos. Proteínas e peptídeos podem ser separados de acordo com sua carga, em colunas cromatográficas contendo matrizes carregadas positiva ou negativamente, na cromatografia de troca iônica (Snyder et al., 2009). Podem ser fracionados através de matrizes hidro-

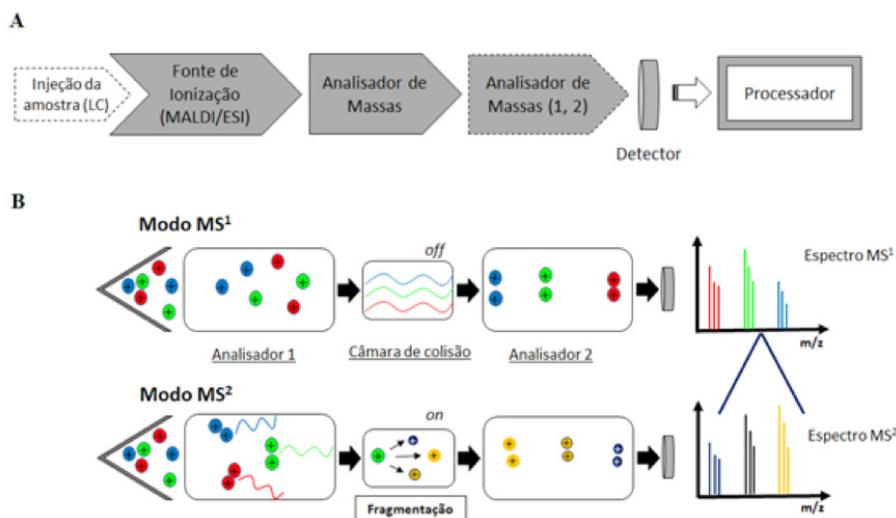
fóbicas ou apolares, de acordo com a hidrofobicidade (cromatografia hidrofóbica) ou polaridade (cromatografia de fase reversa). Também podem ser fracionados com base nos seus pesos moleculares, com o uso de matrizes porosas, na cromatografia de gel filtração ou exclusão molecular (Harris, 2005). Atualmente, há uma variedade de colunas cromatográfica pré-fabricadas que são comercialmente disponíveis, inclusive colunas preenchidas com matrizes ligadas covalentemente a ligantes específicos, determinados pelo pesquisador, como anticorpos ou substratos de enzimas. Nesse caso, na cromatografia de afinidade, proteínas e peptídeos são selecionados de acordo com sua capacidade de ligação a moléculas particulares (Berg et al., 2002; Uhlén, 2008). Tais metodologias podem ser usadas isoladamente ou em combinação, para um melhor fracionamento ou purificação de proteínas e peptídeos de interesse.

Alguns aperfeiçoamentos dessa técnica tornaram-na ainda mais usual, devido à rapidez, alta resolução e reprodutibilidade. A utilização de bombas de alta pressão para acelerar a injeção e transporte das amostras, vinculada a metodologias mais eficientes de empacotamento de matriz em colunas de alta qualidade que suportam a força do fluxo pressurizado, permitiu o surgimento da cromatografia líquida de alta pressão (CLAE ou HPLC, *high-pressure liquid chromatography*). A coluna de HPLC é uniformemente preenchida com resinas de partículas esféricas (3-10 $\mu$ m)(geralmente com base em sílica), resultando em uma fase estacionária altamente empacotada, o que eliminou o problema com os fluxos irregulares, difusão da amostra e baixa resolução cromatográfica, devido ao empacotamento não uniforme nas colunas de CL convencional. O tempo de experimento reduziu significativamente, principalmente devido ao uso de bombas de alta pressão para bombear a fase móvel e amostra. Atualmente, HPLC é o melhor método para separar proteínas, peptídeos e outras moléculas pequenas (Gerber et al., 2004). Dada a simplicidade na realização da separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar proeminente entre os métodos analíticos e pode ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras análises instrumentais (Degani et al., 1998).

## 2.4 PLATAFORMAS ANALÍTICAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massa (MS, *mass spectrometry*) é uma técnica que analisa valores de massa sobre carga de biomoléculas ionizadas em fase gasosa. Esses valores são expressos como razão massa/carga ( $m/z$ ). No espectrômetro, os analitos são convertidos em íons gasosos (moléculas eletricamente carregadas) e os valores de massa/carga são mensurados em unidades de massa atômica (uma) ou Dalton (Da) (Biemannl, 1992; Baldwin, 2004). Em abordagens proteômicas, a espectrometria de massas permite gerar dados sobre a massa de proteínas integras, de peptídeos oriundos da digestão proteica, ou até mesmo de fragmentos desses peptídeos, o que faz com que a MS seja o método universal para caracterizar e identificar proteínas e peptídeos.

Os espectrômetros de massa são formados por quatro principais componentes: fonte de ionização, analisador de massa, detector e processador de sinal (Figura 3A). A fonte é responsável pela ionização da amostra. Espectrômetros de massa desenvolvidos para proteômica podem incluir dois tipos de fontes consideradas de ionização leve: ionização a laser assistida



**Figura 3.** Visão geral do método de Espectrometria de Massas (MS). (A) Componentes comuns (figuras de contorno contínuo) e optativos (polígonos de linhas tracejadas) dos espectrômetros de massas. O sistema inicia com uma coluna cromatográfica (polígono tracejado), cuja função é separar previamente os analitos antes de serem injetados na fonte de ionização. Esta pode ser acoplada apenas a espectrômetros com fontes de ionização do tipo electrospray (ESI). Na fonte de ionização (seta de contorno contínuo), que pode ser do tipo ESI ou MALDI, as amostras são injetadas e ionizadas, adquirindo carga positiva ou negativa. Os íons recém-formados são direcionados para a entrada do analisador de massas por uma força elétrica. Nos analisadores de massas, os íons são acelerados e separados de acordo com suas características físicas quando submetidos a um campo elétrico ou magnético (tempos de voo, frequência de oscilação ou caminho de deflexão), até que chegam ao detector. Os sinais são transferidos para o processador que calcula seus valores de  $m/z$ , comparando-se os dados dos analitos com dados de amostras padronizadas, resultando em espectros de massas. Todo espectrômetro possui pelo menos um analisador de massas (polígono de contorno contínuo). Há ainda opções com mais dois ou três analisadores que podem ser funções de seletor de íons e analisador em experimentos de espectrometria de massas sequencial (MS/MS). (B) Experimentos de espectrometria de massas para caracterização de proteínas por bottom-up. Os espectrômetros de massas podem funcionar em dois modos: em experimento de MS de um único passo ( $MS^1$ ), ou em espectrometria de massa sequencial (MS/MS). O modo  $MS^1$  realiza a medida dos valores de  $m/z$  de peptídeos e proteínas (mostrados como círculos coloridos). Os íons são formados e acelerados através do analisador 1 e da célula de colisão, que está vazia sob vácuo e em desligada (off). Os íons são então separados no analisador 2 até chegar ao detector. Os círculos vermelhos indicam peptídeos com valores de  $m/z$  mais baixos, que alcançam o detector com maior velocidade, seguidos pelos verdes e azuis, como mostrado no espectro  $MS^1$  resultante, que relaciona valores de  $m/z$  e intensidade do sinal. Em espectrômetros com um analisador, não há câmara de colisão e a análise  $MS^1$  ocorre no primeiro compartimento. No modo  $MS^2$ , o analisador 1 funciona como um sistema de captura que é responsável por selecionar um íon específico (peptídeo precursor) para ser fragmentado contra um gás inerte ( $N_2$  ou Ar) na câmara de colisão, que nesse caso está ligada (on). Como resultado, são formados íons fragmentos (marcados com cores azuis, pretas e amarelas, em ordem crescente de valores  $m/z$ ) que são classificados com base nos valores de  $m/z$  no analisador 2. A análise de detecção dos íons fragmentos gera o espectro  $MS^2$ . Cada peptídeo demonstrado nos espectros  $MS^1$  e selecionados como precursor para fragmentação terá seu espectro de  $MS^2$  correspondente contendo os valores de  $m/z$  de seus íons fragmentos.

por matriz (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionization*), para amostras sólidas (Karas; Hillenkamp, 1988), ou ionização por *eletrospray* (ESI, *electrospray ionization*), para amostras líquidas (Fenn et al., 1989; Mann; Wilm, 1995). Em 2002, Karas, Hillenkamp e Fenn foram premiados com o Prêmio Nobel de Química pelo desenvolvimento das ionizações MALDI (1988) e ESI (1989), respectivamente, ferramentas capazes de ionizar analitos de forma leve, sem promover a fragmentação ou degradação. MALDI promove a vaporização e ionização de moléculas não voláteis, através da incidência de um *laser*, gerando moléculas iônicas de única carga. Os analitos são misturados previamente a uma matriz, que absorve o feixe do *laser* e auxilia a ionização da amostra (Hillenkamp et al., 1991). Essa ferramenta exige que a ionização ocorra sob vácuo, no entanto permite que se trabalhe com amostras sólidas e a formação de íons monocarregados, o que facilita a interpretação dos dados. Na fonte ESI, as amostras são aplicadas em soluções, geralmente ácidas, de compostos orgânicos voláteis (metanol, acetonitrila e ácido fosfórico), onde o processo de ionização ocorre. A solução é então injetada através de uma seringa ou capilar, onde um potencial é aplicado para criar uma mistura de gotículas carregadas que vão, simultaneamente, secando e sendo direcionadas para a formação de um aerossol com gotículas de íons carregados multiplamente (Fenn et al., 1989). A formação dos íons envolve uma extensa evaporação dos solventes (dessolvatação) da solução.

O resultado da ionização é a aquisição de carga positiva ou negativa pelas moléculas analisadas, transformando-se em íons, que serão direcionados para um analisador de massas, através de um campo elétrico. Dependendo do tipo de analisador, da maneira pela qual ele separa os íons, os espectrômetros de massa podem ser classificados em diferentes categorias. De forma geral, analisadores de massas medem os valores de  $m/z$  dos íons, acelerando-os em um campo elétrico ou magnético. Íons com os mesmos valores de  $m/z$  irão atravessar o analisador em um mesmo tempo, sob um campo elétrico, ou percorrer o mesmo caminho de deflexão em um campo magnético. A determinação dos valores absolutos de  $m/z$  ocorre após a comparação com soluções padronizadas contendo moléculas com massas conhecidas. Após atravessar o analisador, esses íons alcançarão os detectores que irão registrar o sinal, por indução de carga ou produção de corrente quando os íons passam ou colidem na superfície do detector (Lahm; Langen, 2000). O processador transforma os sinais, gerando espectros de massa/carga x intensidade do sinal (Yates, 1998; McDonald; Yates, 2000) (Figura 3B). Uma necessidade da espectrometria de massa é a utilização de um sistema de vácuo para manter uma baixa pressão dentro de partes do equipamento (Aebersold; Mann, 2003; Baldwin, 2004).

Analisadores de massa do tipo tempo-de-voo (TOF, *time-of-flight*) separam os íons de acordo com o tempo que levam para atravessar um tubo de voo. Íons de menos  $m/z$  atravessam uma distância no vácuo com velocidade maior que íons com valores altos de  $m/z$ . Esse equipamento tem a capacidade de operar no modo refletor, através de um refletor eletrostático, que age como um espelho para os íons, refletindo-os e aumentando a distância percorrida. Esse método permite um aumento na resolução da análise e geralmente é utilizado para amostras com peptídeos de massa abaixo de 10000Da (Vestal et al., 1995; Yates, 1998). Um outro tipo de analisador, o Quadrupolo (Q), consiste em quatro bastões metálicos em paralelo que permitem a orientação dos íons de uma massa/carga específica, que passam no meio dos bastões e são detectados ao final. Um campo elétrico oscilante é aplicado entre os bastões para estabilizar

seletivamente apenas a trajetória de íons com faixas de  $m/z$  características (Figura 3B). Isso permite que o operador faça um rastreamento para diferentes valores de  $m/z$  com o uso da variação contínua da voltagem aplicada. O quadrupolo pode agir com um filtro seletor de massa/carga (Mann et al., 2001). Os *ion traps* (IT), funcionam com o mesmo princípio físico, entretanto com o uso de campos elétricos e magnéticos para capturar íons dentro de um compartimento ou tubo a vácuo. Íons de valores particulares são aprisionados entre eletrodos de diferentes formatos, de acordo com as faixas de  $m/z$  selecionadas, e posteriormente ejetados para detecção (Sparkman, 2000).

Espectrômetros do tipo MALDI-TOF ou ESI-IT, com apenas um analisador de massas, promovem a ionização em apenas uma etapa de análise de valores  $m/z$ , experimento chamado espectrometria de massas  $MS^1$  (Figura 3B). Esses espectrômetros foram amplamente utilizados nos primeiros projetos de proteômica para identificação das proteínas. Além de serem usados na caracterização da massa de proteínas inteiras, são amplamente úteis em mensurar os valores de  $m/z$  de peptídeos oriundos da digestão de cadeias polipeptídicas isoladas. Tais polipeptídeos, após serem individualizados em géis ou cromatografia líquida, são digeridos por proteases que clivam a cadeia em sequências específicas. Um exemplo é a tripsina, enzima que hidrolisa a cadeia polipeptídica entre a lisina e da arginina, exceto quando o resíduo de aminoácido seguinte na sequência é uma prolina. Os peptídeos gerados pela tripsinização, chamados peptídeos trípticos, são extraídos purificados e analisados por MS para gerar um conjunto de massas que é específico de cada proteína. Esse conjunto é considerado o perfil de massas de peptídeos ou *fingerprinting* de massas peptídicas (PMF, *peptide mass fingerprinting*), que deve ser específico para cada proteína (Vestal et al., 1995).

Nas últimas décadas, o aperfeiçoamento tecnológico de espectrômetros de massas evoluiu para o uso de fontes ESI acoplada após cromatógrafos do tipo nano-UPLC (*ultraperformance liquid chromatography*) (Figura 3A). Essa fonte de ionização passou a ser amplamente usada, pois, diferente da MALDI, funciona a pressão atmosférica e pode facilmente ser acoplada a colunas de cromatografia líquida para o pré-fracionamento das amostras, antes de serem ionizadas e direcionadas ao analisador de massas. Nano-UPLCs são cromatógrafos de ultra-performance que utilizam colunas com diâmetros da ordem de  $\mu m$ , por onde são fracionadas misturas de proteínas ou peptídeos de concentrações nanométricas. Essa estratégia foi um avanço para o estudo de proteoma, já que permite a análise de grandes quantidades de amostras e é um método alternativo ao uso de géis 2-D (Ermer; Vogel, 2000; Zhu et al., 2003).

Em espectrômetros fabricados com múltiplos analisadores acoplados em sequência, como o MALDI-TOF/TOF, ESI-Q-TOF ou ESI-Triplo Q, é possível realizar duas etapas de análise de valores  $m/z$  (Figura 3). O acoplamento de múltiplos analisadores permite a seleção de íons, para posterior fragmentação e análise dos fragmentos resultantes quanto a valores  $m/z$  (Mann et al., 2001; Cotter et al., 2007). Nesse experimento, chamado espectrometria de massas sequencial ( $MS/MS$  ou  $MS^2$ ), além de obter o conjunto de massas dos peptídeos oriundos da digestão proteica (PMF), analisa-se também as massas de íons resultantes da fragmentação (íons fragmentos) de peptídeos escolhidos (íons precursores) (Figura 3B). No caso de proteínas inteiras, a fragmentação permite que alguns fragmentos e peptídeos de término de cadeia sejam liberados e analisados para gerar dados sobre modificações proteicas. Em análises de  $MS/MS$ , os espectrômetros possuem um sistema de seleção por ímãs (seletor do tipo quadrupolo) ou aprisio-

namento de alguns peptídeos ou proteínas de acordo com seus  $m/z$ , que são direcionados para uma câmara de colisão. A câmara de colisão é onde ocorre a fragmentação de íons precursores escolhidos, através da colisão com um gás inerte ( $N_2$  ou argônio). Quando a câmara de colisão está vazia, o equipamento permite a análise do PMF via  $MS^1$ . Quando a câmara de colisão é preenchida pelo gás, o precursor escolhido é direcionado para ela e colide com o gás, gerando íons fragmentos, que também terão os seus valores massa/carga mensurados (Keough et al., 2000; Cotter et al, 2007)(Figura 3B). Análises de  $MS^2$  geram informações mais robustas sobre massa e também a sequência completa ou parcial dos peptídeos analisados, o que aumenta a chance de identificação da proteína (Hoffmann; Stroobant, 2003). Os dados de PMF e de  $MS/MS$  podem ser comparados, através de programas de computador, contra massas teóricas de peptídeos oriundos de uma digestão proteica e fragmentação *in silico*. Essas proteínas são traduzidas teoricamente a partir de sequências de nucleotídeos depositadas no banco de dados (Domon; Aebersold, 2006; Falk et al., 2007).

#### 2.4.1 ESTRATÉGIAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA ANÁLISE DE PROTEÍNAS

Há duas estratégias principais para caracterizar e identificar proteínas utilizando-se espectrometria de massas: de cima para baixo (*top-down*) ou de baixo para cima (*bottom-up*). Na primeira, proteínas isoladas são analisadas de forma intacta no espectrômetro de massas, sem a digestão prévia com proteases. A fragmentação da proteína ocorre com o uso de alta energia de ionização para promover a quebra da cadeia polipeptídica intacta. Portanto, outros métodos de ionização mais forte podem ser acoplados ao espectrômetro de massas. A análise *top-down* gera informações sobre o peso molecular da proteína íntegra ou de padrões de fragmentação desta, o que permite a dedução da estrutura primária da proteína, além da maior parte das modificações na cadeia polipeptídica, como fosforilação e glicosilação. A caracterização de complexos proteicos permite a obtenção de dados sobre interações entre as subunidades (Chait, 2006). Apesar de ser uma estratégia usual para caracterização de proteínas isoladas e intactas, ainda são necessárias melhoras tecnológicas que permitam o amplo uso de *top-down* de misturas complexas de proteínas ou mesmo de um grande conjunto de proteínas isoladas (Bunger et al., 2008; Henne et al., 2011).

A estratégia *bottom-up* é comumente usada em projetos de proteômica, pois é capaz de identificar proteínas de misturas complexas pela análise de peptídeos resultantes da digestão de cadeias polipeptídicas. Tais cadeias polipeptídicas, após fracionamento e separação, são submetidas a digestão com uma protease de corte específico, gerando um conjunto de peptídeos que é característico para cada sequência proteica. A análise por  $MS^1$ , de valores  $m/z$ , desses peptídeos gera o perfil de massas peptídicas (PMF), como descrito anteriormente. Além disso, alguns ou todos os peptídeos podem ser selecionados como precursores para fragmentação, em experimentos de  $MS^2$  (ou  $MS/MS$ ), gerando íons fragmentos que também terão seus valores de  $m/z$  mensurados no segundo analisador de massas (Figura 3B). Essa fragmentação também é característica e sequência-específica, pois ocorre preferencialmente nas ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácido que formam o peptídeo. Os íons fragmentos formados são preferencialmente um conjunto de fragmentos que equivalem ao peptídeo precursor menos um ou mais resíduos de aminoácidos que foram quebrados das laterais da cadeia.

O espectro de MS<sup>2</sup> de um peptídeo precursor fornece informações sobre valores m/z de todos (ou quase todos) os fragmentos resultantes da fragmentação. Ao avaliar o espectro de MS<sup>2</sup> de cada peptídeo, a diferença de massa exata entre o precursor e os íons fragmentos que perderam o primeiro resíduo, esta equivale à massa exata do aminoácido que se fragmentou da cadeia. E o mesmo ocorre quando os íons fragmentos são comparados entre si, em ordem decrescente. Obtém-se, portanto, a sequência primária parcial dos peptídeos precursores. O experimento MS/MS é utilizado, portanto, para obtenção de uma porção significativa da sequência dos peptídeos que foram submetidos à fragmentação (Armengaud, 2013).

Estratégias variadas podem ser utilizadas nas etapas de análise proteômica (Figura 1). Usualmente, diferentes métodos de coleta, extração, separação e quantificação de proteínas podem ser combinados à análise *bottom-up* para caracterização de proteomas e metaproteomas. A eletroforese em gel permite a separação e quantificação de proteínas quando acopladas com espectrometria de massa. A estratégia de eletroforese bidimensional (2D-GE) foi amplamente utilizada desde o início da proteômica para a avaliação da expressão proteica, principalmente porque possui uma resolução de separação maior que o método 1D-GE e ainda permite uma quantificação relativa dentro de uma faixa dinâmica especificada pelo corante usado (método semiquantitativo). Após a coloração dos géis, pode-se realizar uma análise comparativa dos mapas 2D de diferentes condições, combinando os spots da mesma posição no gel, e avaliar as diferenças relativas de intensidades de coloração (Pennington et al., 1997; Falk et al., 2007). Cadeias polipeptídicas induzidas ou reprimidas irão aparecer com maior ou menor intensidades de coloração nos géis, respectivamente (Marengo et al., 2005; Berthet et al., 2007). Tais cadeias individualizadas são cortadas do gel e submetidas a protocolos de digestão por proteases, dentro do gel (digestão *in gel*). Os espectrômetros de massa com fonte de ionização MALDI são comumente usados para a identificação rápida de proteínas isoladas, como as obtidas a partir de um gel 2D ou de qualquer estratégia de subdivisão que forneça o isolamento da cadeia polipeptídica. Os dados PMF e MS/MS são usados para identificar as proteínas (Lahm; Langen, 2000). A avaliação comparativa da presença e intensidade dos spots nos géis 2D, seguida pela identificação das proteínas correspondentes a cada *spot*, permite uma melhor compreensão da variação na expressão gênica em resposta a estímulos externos, tempo ou condições fisiológicas do modelo estudado.

Em géis 1D ou em cromatografias de baixa resolução, métodos cuja capacidade de fracionamento da mistura é baixa, é impossível a determinação do PMF de cada proteína na mistura, já que as bandas coradas ou frações eluídas correspondem a pequenos grupos de proteínas com mesma massa molecular. Nesse caso, o experimento MS/MS deve ser realizado com um uso prévio de cromatografia líquida (LC) de alta performance, que pode ser acoplada a um espectrômetro de massa com uma fonte de íons ESI. A estratégia típica baseada em LC-MS inclui a digestão enzimática de um conjunto de proteínas ao mesmo tempo, resultando em uma mistura de peptídeos extremamente complexa, que será previamente fracionada por nano-HPLC antes de ser analisada por MS (análise *shotgun*). Conforme os peptídeos separados são eluídos no final da coluna cromatográfica, são ionizados por ESI e analisados por MS1, e posteriormente selecionados e fragmentados para análise de MS2 dos seus íons fragmentos. O resultado são milhares de espectros variados de MS1 e MS2 gerados por hora de análise, dados que fornecem

informações sobre a massa exata e parte da sequência dos peptídeos da amostra (Shi et al., 2004; Xie et al., 2011).

## 2.5 INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

Os dados experimentais de PMF e de MS<sup>2</sup> podem ser comparados, através de programas de computador (como MASCOT, SEQUEST e Protein Lynx), contra sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados de proteínas. Tais sequências também podem ser obtidas a partir da tradução teórica de sequências de nucleotídeos (Santos, 2016). Esses programas possuem ferramentas de busca, com algoritmos probabilísticos, que comparam os dados experimentais com valores de m/z teóricos de peptídeos e respectivos íons fragmentos oriundos da digestão e fragmentação *in silico* de todas as sequências de aminoácidos disponíveis no banco de dados. Como existe baixa probabilidade de mais de uma cadeia polipeptídica no banco de dados apresentar os mesmos padrões PMF e MS<sup>2</sup>, a identificação de proteínas é pouco exigente se a informação genética para o modelo estudado estiver descrita no banco de dados (Domon; Aebersold, 2006; Falk et al., 2007). No caso de análises do tipo *shotgun*, tanto os valores do tempo de retenção dos peptídeos eluídos na coluna cromatográfica, como os dados de MS<sup>1</sup> e MS<sup>2</sup> são submetidos a buscas contra bancos de dados, com o uso de ferramentas descritas acima, obtendo-se com isso a identificação de milhares de proteínas em passo único de separação seguido de espectrometria de massa (Armengaud, 2013).

A identificação das proteínas é apenas possível se houver alguma informação similar sobre a sequência de aminoácidos ou nucleotídeos depositada em bancos de dados. Com isso, a informação genômica é um pré-requisito para ferramentas proteômicas na interpretação dos espectros de massas, pois dependem de bases de dados de sequências de proteínas preestabelecidas (Armengaud, 2013). Atualmente, há uma avalanche de novas sequências genômicas sendo geradas e depositadas em bancos de dados públicos, e isso melhorou muito as taxas de identificações em análises proteômicas. No entanto, com o aprimoramento das técnicas de cultivo microbiológico e aumento de projetos de metaproteômica e estudos de novos organismos, há a dificuldade em se identificar proteínas cujas informações genéticas ainda não foram descritas. Teoricamente, é possível atribuir sequências peptídicas a partir de espectros MS<sup>2</sup>, sem qualquer informação genômica, em métodos de sequenciamento *de novo* (Figura 1). Alguns programas são específicos para essas análises, mas os resultados obtidos com esses métodos *de novo* podem não ser muito confiáveis. Há, portanto, ferramentas alternativas que levam em consideração a informação do genoma dos organismos mais estreitamente relacionados (Lacerda et al., 2007; Junqueira et al., 2008; Renard et al., 2012).

## 3 | APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE PROTEÍNAS E DERIVADOS PROTEICOS DE ORIGEM MARINHA

A investigação dos diversos papéis desempenhados pelas comunidades microbianas em seus ambientes naturais através da metaproteômica vem permitindo identificar o potencial biotecnológico de indivíduos e populações para uso farmacêutico, diagnóstico, na biorremediação de resíduos líquidos e sólidos e na geração de energia renovável (Lacerda; Reardon, 2009; Burgess, 2012; Hartmann et al., 2014; Armengaud, 2016).

Organismos e micro-organismos marinhos desenvolveram, ao longo da evolução, vias metabólicas únicas, sendo capazes de produzir diversos compostos orgânicos bioativos, estruturalmente diversos, como resultado de um ambiente altamente dinâmico, representando uma fonte ilimitada de novas substâncias (bio)ativas. Entre eles, aqueles de natureza proteica incluem proteínas, peptídeos lineares, peptídeos cíclicos e decapeptídeos, peptídeos derivados, aminoácidos e componentes aminoácidos-*like*.

- **Peptídeos bioativos (PBs):** definidos como frações proteicas específicas com tamanho variando de 2 a 20 aminoácidos. Alguns ocorrem livres em suas fontes originais, mas a grande maioria faz parte da estrutura de uma proteína. São liberados por reações enzimáticas, principalmente, durante o processo digestivo ou durante o processamento dos alimentos. Em adição ao seu valor nutricional, atuam modulando e otimizando funções biológicas e, conseqüentemente, produzindo efeitos fisiológicos benéficos no metabolismo dos seres humanos. Alguns têm sido produzidos por síntese química. Eles exercem atividades como hormônios ou *drug-like* e podem ser classificados com base no seu modo de ação como antimicrobianos, anticoagulantes, anti-hipertensivos, antidiabéticos, anticancerígenos, opioides, imunomoduladores e imunostimulantes, ligantes de minerais (incluindo cálcio) e antioxidantes. PBs derivados de alimentos constituem uma importante área de pesquisa na nutraceutica, devido ao seu potencial impacto na saúde humana e na prevenção de certas doenças. Recentemente, houve um aumento no número de estudos voltados/focados em PBs de origem marinha. As propriedades químicas e atividades biológicas dos PBs obtidos a partir de organismos marinhos como algas, esponjas, tunicados, ascídias, celenterados e moluscos vem sendo intensamente investigados. Evidências mais recentes de algumas de suas atividades têm estimulado o interesse sobre tais compostos como insumos chamados de alimentos funcionais, considerando que vários organismos marinhos já consumidos, como peixes, moluscos e crustáceos são, sabidamente, fontes importantes de compostos bioativos. Muitos peptídeos e decapeptídeos com potencial anticâncer têm sido extraídos de vários animais marinhos como tunicados, esponjas, corais moles, aplúsias, nudibrânquios, briozoários e outros organismos marinhos (Otero-González et al., 2010; Sperstad et al., 2011; Rocha-Martin et al., 2014; Kang et al., 2015). Algas marinhas têm alto conteúdo de proteínas (acima de 47% do seu peso seco), dependendo da espécie, o que aumenta o interesse sobre esses organismos como fontes de PBs. Estudos acerca da proteólise *in silico* e da potencial atividade biológica de PBs derivados de algas marinhas, assim como estudos *in vivo* de avaliação de novas tecnologias em PBs têm sido incrementados. Contudo, as macroalgas ainda representam fontes inexploradas de PBs que podem ser utilizadas como alimentos funcionais (Gerwick; Fenner, 2013; Rocha-Martin et al., 2014; Kang et al., 2015).

- Polipeptídeos:** estudos recentes mostraram que polipeptídeos isolados a partir do veneno de águas-vivas apresentam atividade de metaloprotease, serina protease e fosfolipase A. Tais evidências indicam suas potenciais aplicações farmacêuticas para o tratamento da dor, artrites, na amenização do cansaço, como antimicrobianos e, paradoxalmente, na medicina cardiovascular (Gerwick; Fenner, 2013; Rocha-Martin et al., 2014; Kang et al., 2015). Proteínas e peptídeos bioativos de origem marinha, especialmente peixes marinhos, têm sido alvo de interesse não somente da indústria nutracêutica e farmacêutica, mas também cosmética, devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, incluindo antioxidante e anti-idade. PBs obtidos por hidrólise química ou enzimática de proteínas oriundas de subprodutos do processamento de peixes de interesse por causa de sua atividade anti-oxidante e na regeneração de tecidos (Gerwick; Fenner, 2013; Rocha-Martin et al., 2014; Kang et al., 2015).
- Depsipeptídeos:** depsipeptídeos e depsipeptídeos cíclicos são peptídeos ativos que apresentam, na sua estrutura química, pelo menos uma ligação éster substituindo uma ligação amino. Eventualmente podem apresentar outras modificações estruturais, incluindo a presença de aminoácidos raros. São frequentemente encontrados em organismos marinhos como bactérias, tunicados, moluscos, esponjas, entre outros, e exibem diversas propriedades como anticancerígena, antiproliferativa, antimicrobiana, antiviral e antiplasmodial. (Gerwick; Fenner, 2013; Rocha-Martin et al., 2014; Kang et al., 2015).
- Inulinases:** estudos recentes têm evidenciado a produção de inulinases por fungos de origem marinha. A inulina, o segundo maior polissacarídeo de reserva depois do amido, pode ser explorada como substrato para a produção de xaropes com alta concentração de frutose (*high fructose syrup* – HFS), inulooligosacarídeos (IOS), óleos de micro-organismos unicelulares (*single cell oils* – SCOs), ácido cítrico, lipídeos, proteínas de micro-organismos unicelulares (*single cell proteins* – SCPs), 2, 3-butanodiol, ácido láctico e outras substâncias químicas importantes. A maioria dos processos industriais que usam inulina como substrato empregam inulinases microbianas. Exoinulinases liberam a frutose terminal da inulina. HFS (↑95%) gerado pela ação da inulinase pode ser utilizado como substrato fermentável. Recentemente, o foco tem sido na identificação de novas inulinases exibindo tolerância a condições extremas para atender a aplicações industriais (Hawat et al., 2017).
- Lecitinas:** lecitinas constituem um grupo de proteínas ligantes de carboidratos encontradas em uma ampla variedade de organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, vegetais e animais. Estão envolvidas em diferentes funções biológicas como mecanismos de defesa do hospedeiro, interações celulares e no dobramento de glicoproteínas. Lecitinas de origem marinha são candidatos promissores para a produção de agentes terapêuticos, pelo envolvimento de moléculas de carboidratos (proteoglicanos, glicoproteínas, glicolipídeos) em processos celulares fisiológicos e patológicos, como interação patógeno-hospedeiro e comunicação intercelular. Em particular, lecitinas de invertebrados marinhos têm mostrado atividade antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana e antiparasitária (antiplasmo-

dial)(Fenton et al., 2013; Gardères et al., 2015).

## 4 | PERSPECTIVAS: OPORTUNIDADES E DESAFIOS

Estamos vivendo um tempo em que estamos nos tornando capazes de desvendar a chamada *microbial dark matter* dentro e ao nosso redor pela utilização das meta-ômicas de alta resolução. A metaproteômica oferece a possibilidade de acessar/desvendar as principais unidades catalíticas de comunidades microbianas e, portanto, permitir o estabelecimento de ligações entre genótipos e fenótipos de amostras *in situ*. Uma década se passou desde que o termo metaproteômica foi usado pela primeira vez e que as primeiras análises correspondentes foram realizadas em comunidades microbianas complexas. Desde aquela época, a metaproteômica produziu muitos pontos de vista importantes sobre o funcionamento dos ecossistemas microbianos nos vários cenários ambientais em que tem sido aplicada.

Um dos principais desafios da metaproteômica é identificar ligações conclusivas entre a composição das comunidades microbianas, seu *status* fisiológico, funções executadas por seus “membros”, interações, ecologia e possíveis aspectos evolutivos envolvidos.

Alguns aspectos relacionados aos avanços e ao alcance e aplicação dos estudos de proteômica e metaproteômica incluem uma melhor compreensão das especificidades de diferentes amostras em relação às técnicas de lise celular e extração de proteínas (incluindo o desenvolvimento de protocolos universais, que possam ser aplicados mesmo em matrizes extremamente complexas, como solo ou holobiontes marinhos), aos protocolos de fracionamento de frações subcelulares (solúvel, membrana e extracelular), fracionamento de proteínas baseado em características bio/fisioquímicas anterior a LC-MS/MS, métodos de quantificação de peptídeos independentes de marcação *in situ*, aprimoramento nos métodos de separação por cromatografia líquida, uso de espectrômetros de massas de alta acurácia, busca por espectros baseada em bancos de dados construídos a partir de sequências de metagenomas e metatranscriptomas de alta qualidade (preferencialmente pela execução concomitante das três análises), ferramentas de detecção de modificações pós-traducionais, plataformas/programas para a integração, análise e visualização de dados de metagenômica com dados de outras “ômicas” (incluindo maior acessibilidade via redução de custos de instrumentalização), validação de alvos de proteínas como potenciais biomarcadores/bioindicadores de diferentes condições fisiológicas (holobiontes) e ambientais no futuro.

## REFERÊNCIAS

- Aebersold, R.; Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**. 422:198-207.  
 Armengaud, J. (2013) Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds! **Environmental Mi-**

**Microbiology.** 15(1):12-23.

Armengaud, J. (2016) Next-generation proteomics face new challenges in environmental biotechnology.

**Current Opinion in Biotechnology.** 38:174-182.

Aebersold, R.; Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. **Nature.** 422:198-207.

Armengaud, J. (2013) Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds! **Environmental Microbiology.** 15(1):12-23.

Armengaud, J. (2016) Next-generation proteomics face new challenges in environmental biotechnology.

**Current Opinion in Biotechnology.** 38:174-182.

Armengaud, J.; Hartmann, M.E.; Bland, C. (2013) Proteogenomics for environmental microbiology. **Proteomics.** 13, 2731-2742.

Baldwin, M.A. (2004) Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered. **Mol. Cell Proteomics.** 3(1):1-9.

Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. (2002) **Biochemistry** (5th ed.), New York: W H Freeman.

Berkelman, T. et al. (1998) **2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: Principles and Methods.** Handbooks from Amersham Biosciences.

Berth, M., et al. (2007) The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 76:1223-1243.

Blackstock, W.P.; Weir, M.P. (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnol.** 17: 121-127.

Bunger, M.K.; Cargile, B.J.; Ngunjiri, A.; Bundy, J.L.; Stephenson, J.L. (2008) Automated proteomics of *E. coli* via top-down electron-transfer dissociation mass spectrometry. **Anal Chem.** 80:1459-1467.

Burgess, J.G. (2012) New and emerging analytical techniques for marine biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology.** 23:29-33.

Chait, B.T. (2006) Mass Spectrometry: bottom-up or top-down? **Science.** 314: 65-66.

Cotter, R.; Griffith, W.; Jelinek, C. (2007) Tandem time-of-flight (TOF/TOF) mass spectrometry and the curved-field reflectron. **J. Chromatography B.** 1:157-160.

Degani, A.L.G.; Cass, Q.B.; Vieira, P.C. (1998) Cromatografia: um breve ensaio. **Atualidades em Química.** 7:21-25.

Domon, B.; Aebersold, R. (2006) Mass spectrometry and protein analysis. **Science.** 312:212-217.

Dong, H.-P., Hong, Y.-G., Lu, S., Xie, L.-Y. (2014) Metaproteomics reveals the major microbial players and their biogeochemical functions in a productive coastal system in the northern South China Sea. **Environ. Microbiol. Rep.,** 6, 683-695

Ermer, J.; Vogel, M. (2000) Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis. **Biomed. Chromatogr.** 14:373-383.

Falk, R. et al. (2007) Approaches of systematic proteome exploration. **Biomol. Eng.** 24:155-168.

Fernandez-Patron, C. et al. (1998) Understanding the mechanism of the zinc-ion stains of biomacromolecules in electrophoresis gels: generalization of the reverse-staining technique. **Electrophoresis.** 19:2398-2406.

Fazekas de St. Groth, S.; Webster, R.G.; Datyner, A. (1963) Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. **Biochem. Biophys. Acta,** 71:377-391.

Fenn, J.B.; et al. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science.** 246:64-71.

Fenton, B.; Espinosa, R.A.; Contreras, E.V.; Lozano, B.A.; Sánchez, N.S.; Hernández, E.G.; Galindo, E.Z.

(2013) Purification and characterization of structural and functional properties of two lectins from a marine sponge *Spheciospongia vesparia*. **Indian J Biochem Biophys.** 50(6):562-9.

Fey, S.J.; Larsen, P.M. (2001) 2-D or not 2-D. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 5:26-33.

Garcia, G.D.; Santos, E.O.; Sousa, G.V.; Zingali, R.B.; Thompson, C.C.; Thompson, F.L. (2016) Metaproteomics reveals metabolic transitions between healthy and diseased stony coral *Mussismilia braziliensis*. **Mol Ecol.** (18):4632-44.

Gardères, J.; Bourguet-Kondracki, M.; Hamer, B.; Batel, R.; Schröder, H.C.; Müller, W.E.G. (2015) Review Porifera Lectins: diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Mar. Drugs.** 13:5059-5101; doi:10.3390/md13085059

Glazer, A.N.; Nikaido, H. (2007) **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology** (2nd ed.). Cambridge University Press.

Gerber, F. et al. (2004) Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. **J. of Chromatography.** 1036(2):127-133.

Gerwick, W.H.; Fenner, A.M. (2013) Drug discovery from marine microbe. **Microb Ecol.** 65(4): 800-806. doi:10.1007/s00248-012-0169-9.

Goldfarb, M. (2007) Computer analysis of two-dimensional gels. **J. Biomol. Tech.** 18(3):143-146.

Görg, A. et al. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis.** 21:1037-1053.

Haglund, H. (1971) Isoelectric focusing in pH gradients: a technique for fractionation and characterization of ampholytes. **Methods Biochem. Anal.**, 19:1-104.

Hansen, S.H.; Stensballe, A.; Nielsen, P.H.; Herbst, F.-A. (2014) Metaproteomics: evaluation of protein extraction from activated sludge. **Proteomics.** 14, 2535-2539.

Hanson, B.T.; Madsen, E.L. (2015) *In situ* expression of nitrite dependent anaerobic methane oxidation proteins by *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* co-occurring with expressed anammox proteins in a contaminated aquifer. **Environ. Microbiol. Rep.** 7, 252-264.

Harris, D.C. (2005) **Análise Química Quantitativa.** (6th ed.) Rio de Janeiro: LTC.

Hartmann, E.M.; Durighello, E.; Pible, O.; Nogales B.; Beltrametti, F.; Bosch, R.; Christie-Oleza, J.A.; Armengaud, J. (2014) Proteomics meets blue biotechnology: A wealth of novelties and opportunities. **Marine Genomics.** 17: 35-42.

Hawley, A.K.; Brewer, H.M.; Norbeck, A.D.; Pasa-Tolic, L.; Hallam, S.J. (2014) Metaproteomics reveals differential modes of metabolic coupling among ubiquitous oxygen minimum zone microbes. **PNAS.** 111: 11395-11400.

Rawat, H.K.; Soni, H.; Treichel, H.; Kango, N. (2017) Biotechnological potential of microbial inulinases: Recent perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** 57: 3818-3829.

Herbst, F.-A.; Bahr, A.; Duarte, M.; Pieper, D.H. et al. (2013) Elucidation of *in situ* polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by functional metaproteomics (protein-SIP). **Proteomics.** 13, 2910-2920.

Hillenkamp, F. et al. (1991) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Anal. Chem.** 63:1193-1202.

Hoffmann, E.; Vincent, S. (2003). **Mass Spectrometry: Principles and Applications** (2nd ed.). Toronto: John Wiley and Sons.

Junqueira, M. et al. (2008) Protein identification pipeline for the homology-driven proteomics. **J Prote-**

omics. 71:346–356.

Kan, J.; Hanson, T.E.; Ginter, J.M.; Wang, K.; Chen, F. (2005) Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. **Saline Systems**. 1: 7.

Kang, H.K.; Seo, C.H.; Park, Y. (2015) Review marine peptides and their anti-infective activities **Mar. Drugs**. 13: 618–654; doi:10.3390/md13010618

Karas, M.; Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 **Da. Anal. Chem.** 60:2299–2301.

Keough, T. et al. (2000) Tandem mass spectrometry methods for definitive protein identification in proteomics research. **Electrophoresis**. 21:2252–2265.

Kleiner, M.; Wentrup, C.; Lott, C.; Teeling, H. et al. (2012) Metaproteomics of a gutless marine worm and its symbiotic microbial community reveal unusual pathways for carbon and energy use. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 109: E1173– E1182.

Lacerda, C.M.; Reardon, K.F. (2009) Environmental proteomics: applications of proteome profiling in environmental microbiology and biotechnology. **Brief Funct Genomic Proteomic**. 8: 75–87.

Lahm, H-W.; Langen, H. (2000) Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. **Electrophoresis**. 21:2105–2114.

Mann, M.; Wilm, M. (1995) Elettrospray mass spectrometry for protein characterization. **Trends Biochem. Sci.** 20(6):219–224.

Mann, M.; Hendrickson, R.H.; Pandey, A. (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annu. Rev. Biochem.** 70:437–473.

Marengo, E. et al. (2005) Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: a review of commercial software and home-made systems. **Proteomics**. 5:654–666.

Maron, P-A. et al. (2007) Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. **Microbiol Ecology**. 5:486–493.

Mary, I.; Oliver, A.; Skipp, P. et al. (2010) Metaproteomics and metagenomic analyses of defined oceanic microbial populations using microwave cell fixation and flow cytometric sorting. **Microbiol Ecol.** 74: 10–18.

McDonald, W.H.; Yates, J.R. III. (2000) Proteomic tools for cell biology. **Traffic**. 1:747–754.

Merril, C. et al. (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. **Science**. 211:1437.

Morris, R.M.; Nunn, B.L. (2013) Sample preparation and processing for planktonic microbial community proteomics. **Methods in Enzymology**. 531(14): 271–287.

Morris, R.M.; Nunn, B.L.; Frazar, C.; Goodlett, D.R.; Ting, Y.S.; Rocap, G. (2010) Comparative metaproteomics reveals ocean-scale shifts in microbial nutrient utilization and energy transduction. **ISME Journal**. 4, 673–685.

Mueller, R.S.; Deneff, V.J.; Kalnejais, L.H.; Suttle, K.B. et al. (2010) Ecological distribution and population physiology defined by proteomics in a natural microbial community. **Mol. Syst. Biol.** 6, 1–12.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2012) **Lehninger Principles of Biochemistry** (Sixth Edition)

Nesatyy, V.J.; Suter, M.J.F. (2007) Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. **Environ. Sci. Technol.** 41: 6891–6900.

Neto, F.R.A.; Nunes, D.S.S. (2003) **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro.

Neuhoff, V. et al. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. **Electrophoresis**. 6:427–448.

Neuhoff, V. et al. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.

**Electrophoresis**. 9:255-262.

O'Farrel, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** 250:4007-4021.

Patton, W.F. (2002) Detection technologies in proteome analysis. **J. Chromat. B**. 771:3-31.

Pennington, S.R., et al. (1997) Proteome analysis: from protein characterization to biological function. **Cell Biol.** 7:168-173.

Quadroni, M.; James, P. (1999) Proteomics and automation. **Electrophoresis**. 20:664.

Rabilloud, T.; Chevillet, M. (2000) Solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis. In: Rabilloud, T. (1st ed.) **Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods**. New York, Springer.

Reinders, J.; Sickmann, A. (2005) State-of-the-art in phosphoproteomics. **Proteomics**. 5(16):4052-4061.

Renard, B.Y. et al. (2012) Overcoming species boundaries in peptide identification with BICEPS. **Mol Cell Proteomics**. 14:167.

Riederer, B.M. (2008) Non-covalent and covalent protein labeling in two-dimensional gel electrophoresis. **J. Proteomics**. 71(2):231-244.

Rocha-Martin, J.; Harrington, C.; Dobson, A.D.W.; O'Gara, F. (2014) Review emerging strategies and integrated systems microbiology technologies for biodiscovery of marine bioactive compounds. **Mar. Drugs**. 12, 3516-3559; doi:10.3390/md12063516

Sano, A.; Nakamura, H. (2004) Chemo-affinity of titania for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides. **Anal. Sci.** 20(3): 565-566.

Santos, E.O. (2016) Proteomics: principles and application in microbiology of prokaryotes. In: Rodrigues, T.B.; Silva, A.E.T. **Molecular diversity of environmental prokaryotes**. New York, CRC-Press.

Shi, Y. et al. (2004) The role of liquid chromatography in proteomics. **J Chromatogr A**. 1053(1-2):27-36.

Shapiro, A.L.; Viñuela, E.; Maizel, J.V.Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochem Biophys Res Commun**. 28(5): 815-820.

Siggins, A.; Gunnigle, E.; Abram, F. (2012) Exploring mixed microbial community functioning: recent advances in metaproteomics. **FEMS Microbiol Ecol** .80: 265-280.

Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W. (2009) **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, John Wiley & Sons, New York.

Sowell, S.M.; Abraham, P.E.; Shah, M.; Verberkmoes, N.C. et al. (2011) Environmental proteomics of microbial plankton in a highly productive coastal upwelling system. **ISME J**. 5, 856-865.

Sowell, S.M.; Wilhelm, L.J.; Norbeck, A.D.; Lipton, M.S.; Nicora, C.D.; Barofsky, D.F., et al. (2009). Transport functions dominate the SAR11 metaproteome at low-nutrient extremes in the Sargasso Sea. **ISME Journal**. 3, 93-105.

Sparkman, O.D. (2000) **Mass Spectrometry Desk Reference**. Pittsburgh, PA: Global View Publishing.

Sperstad, S.V.; Haug, T.; Blenck, H.-M.; Styrvold, O.B.; Li, C.; Stensvåg, K. (2011) Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. **Biotechnology Advances**. 29(5):519-530.

Switzer, R.; Merrill, C.; Shifrin, S. (1989) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem**. 98:231.

Teeling, H.; Fuchs, B.M.; Becher, D.; Klockow, C.; Gardebrecht, A.; Bennke, C.M. et al. (2012) Substrate-

controlled succession of marine bacteria and archaea populations induced by a phytoplankton bloom. **Science**. 336:608-611. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1218344>.

Timms, J. F.; Cramer, R. (2008) Difference gel electrophoresis. **Proteomics**. 8(23-24):4886-4897.

Uhlén, M. (2008). Affinity as a tool in life science. **Biotechniques**. 44(5):649-654.

Urich, T.; Lanzén, A.; Stokke, R.; Pedersen, R.B. et al. (2014) Microbial community structure and functioning in marine sediments associated with diffuse hydrothermal venting assessed by integrated meta-omics. **Environ. Microbiol.** 16:2699-2710.

Vestal, M.L.; Juhasz, P.; Martin, S.A. (1995) Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Comm. Mass. Spectrom.** 1:1044.

Vogel, A. (2002) **Análise Química Quantitativa**. (6th ed.) Rio de Janeiro: LTC.

Wilmes, P.; Bond, P.L. (2004) The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. **Environ. Microbiol.** 6:911-920.

Wilmes, P.; Heintz-Buschart, A.; Bond, P.L. (2015) A decade of metaproteomics: Where we stand and what the future holds. **Proteomics**. 15:3409-3417.

Wilmes, P., Wexler, M., Bond, P.L. (2008) Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment. **PLoS ONE**. 3: e1778.

Wittmann-Liebold, B.; Graack, H.; Pohl, T. (2006) Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**. 6:4688-4703.

Xie, F. et al. (2011) Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics. **JBC**. 286:25443-25449.

Yarmush, M.L.; Jayaraman, A. (2002) Advances in proteomic technologies. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** 4: 349-373.

Yates, J. R. III. (1998) Mass spectrometry and the age of the proteome. **J. Mass Spectrom.** 33:1-19.

Zhu, H.; Bilgin, M.; Snyder, M. (2003) Proteomics. **Annu. Rev. Biochem.** 72:783-812.



# METABOLÔMICA DE SISTEMAS MARINHOS

Marcelo Maraschin<sup>a</sup>  
Debora Queiroz Cabral<sup>a</sup>  
Eva Regina de Oliveira<sup>a</sup>  
Fernanda Ramlov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Santa Catarina.

## RESUMO

A investigação de respostas metabólicas de organismos marinhos induzidas geneticamente, epigeneticamente ou por fatores ambientais encontra na metabolômica uma abordagem multifatorial que possibilita melhor compreensão das respostas bioquímicas e fisiológicas observadas. O desenvolvimento de plataformas analíticas mais sensíveis, de alto desempenho e robustas, associadas a ferramentas computacionais mais potentes, tem produzido um grande número de dados metabolômicos e a extração de informações relevantes quanto à integração e a regulação de processos bioquímicos celulares. Assim, metabólitos-alvo, ou perfis metabólicos são investigados de forma associada às redes metabólicas e aos efeitos reguladores de fatores intrínsecos e/ou extrínsecos ao organismo, identificando assinaturas químicas que definem, em última instância e em caráter dinâmico, o fenótipo resultante nos contextos fisiológico e de performance ecológica em dado ambiente marinho. Sob a ótica do desenvolvimento de tecnologias, a determinação do metaboloma constitui uma estratégia interessante para o desenvolvimento de novos produtos com aplicação na agricultura como os bioestimulantes, por exemplo, a partir de insumos de origem marinha. Assumindo-se como virtualmente nula a probabilidade de um dado metabólito, peculiar ao ambiente marinho, interagir com espécies vegetais e animais em ecossistemas agrícolas, a exposição destas àquela molécula, orientada racionalmente, poderá resultar em fenótipos otimizados de produção de biomassa alimentar, eventualmente com menor impacto ambiental. Nesse cenário, a metabolômica contribui de forma importante à elucidação dos mecanismos moleculares associados aos incrementos de biomassas em sistemas agrícolas de produção de alimentos. De forma mais ampla, considera-se que a metabolômica confere às ciências marinhas um conjunto de possibilidades para a construção de uma visão integrada dos processos bioquímicos nos ecossistemas marinhos, subsidiando o desenvolvimento de biotecnologias racionalmente desenhadas nas áreas da saúde humana e animal, ambiente e agricultura.

# 1 | O QUE É METABOLÔMICA

## 1.1 CONCEITO, HISTÓRICO E APLICAÇÕES

Novas formas de percepção e de investigação de sistemas biológicos foram avançadas nas últimas décadas a partir de inovações tecnológicas relacionadas especialmente às técnicas analíticas de alta performance (i.e., *high-throughput analytical techniques*) e ao desenvolvimento de *hardwares* e *softwares* com maior capacidade computacional. Nesse cenário, a era genômica, caracterizada pelo desenvolvimento, padronização e otimização das técnicas de engenharia genética (Sumner et al., 2003) é considerada um referencial importante devido à expressiva quantidade de dados (*omics*) gerados nos ensaios genômicos. De forma similar, grandes volumes de dados de perfis espaciais e temporais de transcritos (transcriptoma), proteínas (proteoma) e de metabólitos (metaboloma) têm sido produzidos, tipicamente caracterizando a biologia como uma *data-driven science* e conferindo a esta fase da evolução dos estudos biológicos a denominação de era da genômica funcional.

Ao final do século XX, Oliver et al. (1998) propuseram o uso do termo metaboloma, referindo-se a uma estratégia de análise de matrizes quimicamente complexas que objetiva determinar qualitativa e quantitativamente os metabólitos de um organismo (metaboloma total), ou de um componente deste, e.g., tecidos ou células (metaboloma parcial) (Oliver et al., 1998; Bino et al., 2004; Goodcare et al., 2004; Fukusaki; Kobayashi, 2005). Para tal, as análises metabolômicas focam em constituintes celulares com massa molecular  $\leq 1000\text{Da}$  e utilizam técnicas analíticas clássicas em investigações bioquímicas, tais como as cromatografias líquida (CL) e gasosa (CG), acopladas ou não à espectrometria de massas (EM), e as espectroscopias de ressonância magnética nuclear (RMN), de Raman e de infravermelho próximo (IVP) e médio (IVM), por exemplo. Parece consensual o fato de não haver uma técnica analítica que, isoladamente, permita elucidar o metaboloma total de uma amostra biológica de interesse, devido à diversidade de constituintes celulares e suas peculiaridades físico-químicas e estruturais. Assim, a adoção de plataformas analíticas compostas por técnicas complementares parece ser uma abordagem adequada à completa elucidação do metaboloma, sendo a RMN unidimensional e bidimensional e a EM as mais frequentemente utilizadas. As características, vantagens e limitações dessas técnicas analíticas fogem ao escopo deste texto e, portanto, não serão abordadas.

A análise metabolômica caracteriza-se pelo uso de plataformas analíticas que complementam as demais áreas "ômicas" (Sumner et al., 2003), sendo o metaboloma o produto final de uma série de eventos genômicos, de transcrição e proteômicos, em dada condição ambiental e fisiológica. De fato, numa abordagem genérica dos eventos metabólicos, o genoma determina o que pode acontecer no metabolismo celular, o transcriptoma o que parece acontecer, o proteoma o que faz acontecer, enquanto o metaboloma é o que realmente acontece. Desse modo, perturbações induzidas geneticamente, epigeneticamente, ou por influência do ambiente são manifestadas em última instância através de alterações na composição e concentração de me-

tabólitos, tipicamente definindo um fenótipo no contexto bioquímico, i.e., o metaboloma.

A metabolômica proporciona um panorama fiel do estado celular de um dado sistema biológico no exato instante da amostragem, evidenciando um momento específico do contínuo fluxo metabólico, no qual diversos compostos são quimicamente produzidos e/ou transformados de forma dinâmica (Gupta et al., 2013; Patti et al., 2012). Exemplos desses metabólitos são os pigmentos fotossintetizantes como clorofilas e carotenoides, compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos, ou ainda ATP, glucose e colesterol, entre outros produtos finais do metabolismo celular (Gomase et al., 2008). A relação dinâmica entre a concentração desses metabólitos e o estado fisiológico do organismo amostrado permite inferências, por exemplo, sobre o estado energético (e.g. ATP, glicogênio), o estado redox celular (e.g. glutathiona, ascorbato) ou o estado reprodutivo (e.g. oestradiol, cetotestosterona) deste organismo (Viant, 2007). A velocidade de *turnover* (reciclagem) de alguns desses metabólitos, principalmente daqueles relacionados a processos energéticos, pode ocorrer em questão de milissegundos a segundos (Barros et al., 2013), de forma que, em pouquíssimo tempo após a amostragem, o metaboloma do organismo amostrado pode apresentar alterações significativas em relação ao momento amostral. Assim, a coleta em si dos organismos ou de partes destes pode ser um fator estressante e promotor de alterações metabólicas relevantes. Portanto, recomenda-se atenção no procedimento adotado ao *quenching* metabólico, bem como ao uso de padrões internos (bioquímicos e analíticos, e.g.) que permitam monitorar a qualidade dos dados obtidos, evitando o aparecimento de artefatos e a inserção de informações espúrias ao conjunto de dados. Salienta-se ainda a importância de considerar também o ciclo natural de cada organismos amostrado em função das variações metabólicas diárias (e.g. açúcares e ácido málico em plantas) ou do período de desenvolvimento (e.g. ciclo reprodutivo) para a determinação do exato momento em que as coletas serão realizadas (Mushtaq et al., 2014).

Análises metabolômicas têm aplicações em diversas áreas biotecnológicas relevantes, como a saúde humana, a ecotoxicologia e a farmacogenômica, entre outras. Recentemente têm sido também utilizadas na área ambiental, para entender a natureza dos compostos que regulam as interações químicas nos organismos e entre eles (Kuhlisch; Pohnert, 2015). Observa-se que atualmente, no domínio de interesse das ciências e da biotecnologia marinha, tanto essa investigação ao nível molecular das interações entre organismos e ambiente, quanto o estudo da dinâmica de metabólitos e das respostas a agentes estressores parecem ser contextos cada vez mais frequentes de aplicação da metabolômica (Lankadurai et al., 2013), eventualmente em decorrência da progressiva degradação dos ambientes marinhos por ações antrópicas (Marante, 2016).

Como na maioria das vezes a concentração intracelular de metabólitos relaciona-se diretamente com os fatores ambientais, a produção de um dado metabólito secundário, por exemplo, constitui uma resposta aos diferentes estímulos do meio (Maschek; Baker, 2008), definindo um fenótipo bioquímico característico das condições fisiológicas da célula no momento amostral. Nesse sentido, o ambiente marinho proporciona um amplo leque de condições físico-químicas que podem estimular ou suprimir a produção de metabólitos secundários.

Além das diferenças de temperatura, irradiância ou regimes pluviais que podem aumentar ou diminuir latitudinalmente, os oceanos apresentam ainda diversos fatores físico

-químicos que variam com a profundidade, e.g., movimentação da água, densidade da água e pressão. Outros fatores como o posicionamento da costa, aportes fluviais, predominância da velocidade e direção de ventos e ondulações, amplitude das marés, presença ou ausência da termoclina, correntes profundas e tipos de substratos são fontes importantes de variações ambientais naturais. Esses fatores e suas combinações podem explicar a variada natureza física dos metabólitos encontrados na água do mar, tanto em relação à polaridade quanto ao peso molecular dos compostos, como apontado por Kuhlisch e Pohnert (2015). Hay (1996) destacou em sua revisão a diversidade de metabólitos encontrados em um único gênero de macroalga marinha, i.e., *Laurencia*, que produz mais de 500 terpenos. As espécies do referido gênero apresentam compostos de pelo menos 26 classes estruturais, e destas, ao menos 16 são consideradas exclusivas do gênero.

Os metabólitos secundários de origem marinha têm recebido destaque crescente. Desde 1984 é publicada uma revisão anual intitulada *Marine Natural Products* que compila informações sobre metabólitos descobertos no ano anterior, suas atividades biológicas relevantes, organismos prospectados e país de origem. Além disso, artigos de revisão enfocando estudos de biossíntese e síntese, análises de modificações estruturais e da estereoquímica de metabólitos também podem ser encontrados naquele periódico (Blunt et al., 2016). Apesar da grande variedade de compostos identificados no meio marinho ser promissora, o volume de compostos ativos que podem ser extraídos de organismos marinhos é normalmente baixo, o que representa uma limitação importante a sua utilização à produção de novos medicamentos, principalmente se considerados organismos com baixa viabilidade de cultivo (Zhang; Chen, 2012).

Além disso, mesmo com o crescente destaque à metabolômica ambiental e aos metabólitos de origem marinha, o acesso organizado a dados metabolômicos gerados por pesquisas nesses ambientes e que contextualizem essas informações a metadados ambientais ainda pode ser considerado uma limitação. Felizmente, ainda que em pequeno número, esforços concentrados para a construção e manutenção de bibliotecas metabólicas vêm sendo feitos nos últimos anos, a exemplo do repositório *MetaboLights* (Haug et al., 2013; Steinbeck et al., 2012) que atualiza e disponibiliza informações experimentais e o(s) efeito(s) biológico(s) de compostos catalogados. De forma similar, o grupo de pesquisa da *Woods Hole Oceanographic Institution* também se dedica à compilação e armazenamento de informações sobre metabólitos ecologicamente relevantes nos ecossistemas marinhos, relacionando-os a metadados ambientais (Longnecker et al., 2015). Por fim, o *Seaweed Metabolite Database* contém informações sobre metabólitos secundários e metadados específicos de macroalgas marinhas (Davis; Vasanthi, 2011).

## 1.2 ABORDAGENS AO ESTUDO DO METABOLOMA

Em consonância aos objetivos do estudo pretendido e independente das áreas e aplicações de interesse, a determinação do metaboloma pode ser realizada de forma seletiva ou não seletiva, no que tange aos analitos investigados. No primeiro caso, busca-se a caracterização de um composto, ou de um conjunto destes pertencentes a uma classe específica de metabólitos (*target compounds*) em dada matriz complexa, podendo avaliar seu perfil

em diferentes situações e/ou grupos de amostras (Amorim-Carrilho et al., 2014). Técnicas analíticas como a CL, CG e a qRMN (RMN quantitativa) são geralmente adotadas nessa abordagem, conferindo maior sensibilidade à detecção dos metabólitos e possibilitando a quantificação destes. De outra forma, as análises metabolômicas em modo não seletivo buscam identificar concomitantemente o maior número de compostos nas amostras, gerando perfis metabólicos (*metabolic profiles*) ou padrões metabólicos (*metabolic fingerprints*) que mudam em resposta a situações específicas e estão associados a uma dada condição fisiológica e de ambiente, eventualmente caracterizando um fenótipo em nível molecular. Técnicas como a RMN unidimensional e bidimensional e a EM são comumente utilizadas no enfoque não seletivo (Fernie; Schauer, 2008; Kuhnen et al., 2012). Apesar de plataformas analíticas baseadas em RMN serem frequentemente adotadas em estudos concernentes à metabolômica ambiental, o número de investigações baseadas em EM neste contexto tem aumentado rapidamente nos últimos anos (Lankadurai et al., 2013). A praticidade da preparação das amostras para as análises de RMN e sua robustez tornam a técnica bastante atrativa, enquanto a EM oferece maior sensibilidade à detecção de compostos em baixas concentrações. No entanto, esta última requer um maior preparo amostral, dependendo do composto de interesse.

Uma vez finalizada a obtenção dos dados metabolômicos, são realizadas análises quimiométricas através da aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas ao conjunto de dados brutos ou pré-processados, visando à extração de informações bioquimicamente relevantes. Técnicas de análise estatística univariada e multivariada são aplicadas aos dados metabolômicos para identificar os metabólitos e determinar suas concentrações no material amostral. Além disso, através da construção de modelos descritivos e de classificação, por exemplo, agrupamentos de amostras em função de similaridades metabólicas resultantes de fatores genéticos e/ou ambientais podem ser identificados. Diversos métodos de análise multivariada têm sido utilizados na quimiometria, sendo provavelmente a análise dos componentes principais (PCA) e a análise de agrupamentos hierárquicos (AH) os mais frequentes. As características e os detalhes dos métodos quimiométricos fogem aos objetivos deste capítulo e não serão abordados.

### 1.3 PREPARO DA AMOSTRA E QUENCHING METABÓLICO

Amostragens destinadas a estudos metabolômicos devem considerar que, ainda que tenha sido extraída apenas uma fração de um tecido ou material celular, a dinâmica dos processos metabólicos se mantém até que seja feita a paralisação ou redução do metabolismo celular. Esse processo, conhecido como *quenching*, é um passo fundamental para a preservação da integridade metabólica quando do momento amostral. Mesmo em momentos que antecedem a extração, em havendo alterações da condição experimental (temperatura, irradiância, movimentação da água, ou dessecação, por exemplo) alguns organismos, ou suas frações, podem sofrer mudanças significativas em seus perfis quali/quantitativos de metabólitos secundários em pouco tempo. Para algas, por exemplo, alterações metabólicas como respostas de defesa podem ser observadas em escalas que variam de poucos segundos a semanas (Pelletreau; Targett, 2008). Como exemplo, a macroalga verde *Halimeda* sp., quando submetida a injúrias

que simulem a herbivoria, converte rapidamente halimedatetra-acetato em halimedatrial para inibir a continuidade do processo de herbivoria (Paul; Van Alstyne, 1992).

A interrupção dos processos metabólicos das amostras deverá levar em conta que determinados processos enzimáticos continuam ativos mesmo após a etapa de extração. Na maioria dos casos, a paralisação desses processos pode ser feita alterando-se drasticamente a temperatura pela adição de nitrogênio líquido ou metanol gelado ( $< -40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ou quente ( $> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ou ainda pela redução do pH do meio de extração (e.g. ácido perclórico) (Deborde et al. 2019; Villas-Bôas; Gombert, 2006). Padronizar de forma rigorosa o desenho experimental considerando a forma de amostragem (manipulação e intervalo de tempo até o *quenching* metabólico), o tamanho da amostra, o estágio de desenvolvimento do organismo, o horário de coleta e o número de réplicas, por exemplo, contribui para a redução das chances de detecção de respostas metabólicas do organismo derivadas de erros na amostragem (Dunn et al., 2005).

Além dos cuidados com a manipulação e preservação da amostra, a extração também deverá ser conduzida de forma rigorosa quanto ao tempo de extração, proporção biomassa/solvente e temperatura, garantindo assim resultados replicáveis. Dificilmente um único solvente, ou técnica de extração, permitirá a extração da totalidade dos metabólitos de uma dada amostra biológica. Amostras complexas caracterizam-se, usualmente, por seus conteúdos em metabólitos com propriedades físico-químicas (polaridade e potencial de oxirredução, por exemplo) distintas. Nas análises metabolômicas, quando não se conhece a natureza química dos compostos da amostra, em geral opta-se pela determinação do perfil metabólico (i.e., modo não seletivo), onde o interesse é a extração e recuperação da totalidade de metabólitos da amostra. Para tal, diversas estratégias metodológicas podem ser utilizadas, tais como o uso de solventes polares e apolares, isoladamente ou em combinação, termostatização, acidificação e/ou pressurização do meio de extração, além da combinação de técnicas analíticas que permitam a identificação do maior número de metabólitos e, portanto, a obtenção de um perfil metabólico mais completo.

Uma vez finalizada a extração, devem ser tomados cuidados quanto à preservação dos extratos. A variedade da estrutura química e a baixa estabilidade de determinados compostos podem dificultar o processo analítico (Amorim-Carrilho et al., 2014), como é observado para ácidos fenólicos e carotenoides, são sensíveis à luz e a altas temperaturas. Outros, como a vitamina C, são fotoestáveis desde que na ausência de água, sendo que o contato com a umidade desencadeia o processo de oxidação de forma relativamente rápida. Assim, quando não se tem um grupo específico de metabólitos alvo, recomendam-se precauções que garantam o máximo de estabilidade aos extratos, como, por exemplo, a manutenção ao abrigo de luz, sob baixas temperaturas ( $-80^{\circ}\text{C}$  ou  $-196^{\circ}\text{C}$ ), em atmosfera modificada ( $\text{N}_2$  gasoso), ou liofilizadas. Idealmente, a aquisição dos dados deve ocorrer garantindo a aleatoriedade das amostras e em curto período de tempo (máximo de duas semanas) após a extração para evitar conclusões tendenciosas resultantes de possíveis alterações na concentração de compostos menos estáveis (Deborde et al. 2019). O planejamento de cada etapa experimental torna-se então fundamental para a celeridade e otimização dos processos de amostragem, "*quenching* metabólico", extração e análise, de forma a garantir a mínima perda de metabólitos.

Em revisão, Wu e Li (2016) compilam de forma detalhada as principais etapas envolvi-

das em uma análise metabólica visando um perfil quantitativo. São apresentadas três principais etapas: (i) a pré-análise conforme discutida acima, que engloba a coleta da amostra com seleção adequada de tipo e tamanho amostral, o pré-processamento da amostra (e.g. quenching metabólico, centrifugação e/ou filtração), e o armazenamento da amostra (e.g. congelamento imediato, preferencialmente em pequenas alíquotas pra evitar ciclos de congelamentos e descongelamentos sucessivos); (ii) a etapa analítica que envolve o processamento da amostra (e.g. extração dos metabólitos, derivatização química, ajuste de PH, concentração ou diluição, inserção de padrões de referência ou controle de amostras), pré-aquisição/normalização dos resultados (e.g. UV absorbance) e aquisição dos dados (e.g. RMN, CG-EM, CL-EM); e por fim, (iii) o processamento de dados que engloba o pré-processamento de acordo com a técnica analítica utilizada (e.g. normalização da linha de base, alinhamento de pico, alinhamento de fase), análises estatísticas (univariadas e/ou multivariadas), identificação de metabólitos (busca em bancos de dados pré-existentes ou comparação com padrões analíticos dos compostos de interesse), e por fim, a quantificação dos metabólitos (absoluto ou relativo). Cada etapa resguarda detalhes importantes de serem observados e, caso não sejam bem executadas, podem inserir erros ou ruídos que produzirão resultados equivocados ou tendenciosos, reforçando assim a importância do correto planejamento amostral e analítico em análises metabolômicas.

## 2 | APLICAÇÕES DA METABOLÔMICA À BIOTECNOLÓGICA MARINHA

### 2.1 MACROALGAS COMO FONTES DE COMPOSTOS BIOESTIMULANTES EM ESPÉCIES DE INTERESSE AGRÍCOLA

O desenvolvimento de produtos e processos a partir de organismos de origem marinha considera diversas áreas da biotecnologia (Vidotti; Rollemberg, 2004). Nesse contexto, a aplicação da metabolômica como ferramenta em processos de desenvolvimento de produtos considerará, a título de exemplo, o uso de espécies de macroalgas marinhas como fontes de compostos bioestimulantes de espécies de interesse agrícola.

Nas últimas décadas tem sido crescente a percepção de que para a área agrícola são grandes as possibilidades biotecnológicas contidas nos ambientes marinhos. De modo relevante, destaca-se a atenção dada ao uso de biomassas de macroalgas, as quais têm sido utilizadas há centenas de anos como fertilizantes por algumas etnias (Andrade et al., 2010). De fato, há um contínuo interesse na determinação do potencial desses organismos como matérias-primas em formulações para produção de bioestimulantes e promotores de crescimento de plantas. Nesse contexto, a agricultura moderna tem buscado técnicas de manejo e de produção de baixo impacto ambiental e à saúde humana, por exemplo através da substituição ou da redução do uso de fertilizantes sintéticos, sem comprometimento da produtividade e da qualidade do produto final (Spinelli et al., 2009). Com esse fim, estudos metabolômicos têm revelado um conjunto importante de estruturas e compostos em macroalgas marinhas, com atividades biológicas

relevantes em todos os estádios fisiológicos das plantas (Geiselman; McConnell, 1981; Martins et al., 2013). Assim, extratos formulados a partir de macroalgas verdes, vermelhas e pardas constituem insumos de fertilizantes que têm sido utilizados em aplicações foliares ou em fertirrigação com efeitos bioestimulantes. Espécies de interesse à produção de alimentos e bebidas como a uva, cevada, trigo, feijão, espinafre, tomate e pepino evidenciam ganhos agrônômicos nas fases de germinação e crescimento vegetativo, por exemplo (Kok et al., 2010; Kumar et al., 2011; Shah et al., 2013), ou ainda têm seus mecanismos de defesa estimulados, via síntese de fitoalexinas, em decorrência da presença de compostos elicitores nos extratos provenientes de macroalgas (Fang et al., 2008; Craigie et al., 2011; Holdt; Kraan, 2011).

Dentre as espécies de macroalgas mais utilizadas na agricultura como fonte de compostos bioestimulantes, biorreguladores e bioativadores está *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, uma alga parda oriunda de regiões de clima temperado (Fernandes; Silva, 2011; Fornes, 2002). Ganhos de rendimento de espécies anuais e perenes têm sido observados, associados a maior absorção de nutrientes, melhoria na germinação e maior resistência a fatores (ab)bióticos de estresse. Como exemplo, videiras (*Vitis vinifera* L.) tratadas com extrato de *A. nodosum* apresentaram aumentos no peso de frutos e na produção de compostos do metabolismo secundário, como fenólicos e taninos (Kok et al., 2010), com eventual reflexo sobre a qualidade dos frutos e do vinho.

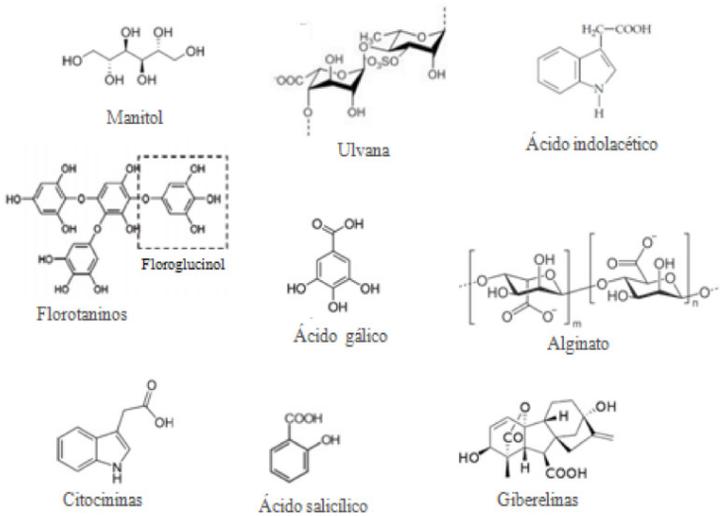
De forma similar ao observado para *A. nodosum*, extratos de biomassas de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva, *Gracilaria edulis* (G.S. Gmelin) P.C. Silva, *Gelidium pectinatum* Schousboe ex Montagne, *Sargassum wightii* Greville ex J. Agardh, *Ulva intestinalis* Linnaeus e *Ulva* sp. têm demonstrado efeitos positivos sobre o crescimento e rendimento de espécies de interesse alimentar em sistemas de cultivo em larga escala. Incrementos no crescimento vegetativo e na produção de grãos de trigo e milho após aplicações foliares de extratos de *K. alvarezii* e *G. edulis* foram observados por Shah et al. (2013) e Singh et al. (2016), respectivamente.

O uso de extratos macroalgais em determinadas espécies na fase de germinação de sementes pode contribuir para o aumento da população viável de indivíduos a campo, bem como para a redução do ciclo de cultivo, quando aquele processo é estimulado por fatores exógenos, conforme observado quando do tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (feijão-de-corda) com extrato da macroalga vermelha *G. edulis* (Lingakumar et al., 2002).

Análises metabolômicas de extratos de macroalgas com atividades relevantes para espécies agrícolas têm demonstrado a presença de vitaminas, aminoácidos, manitol, metabólitos secundários, como os polifenóis, e hormônios auxínicos (e.g., ácido 3-indol-acético), giberelínicos e citocínicos (Figura 1). Além disso, os efeitos bioestimulantes têm sido atribuídos à presença de polissacarídeos bioativos (laminarina, ulvana e alginatos, por exemplo) e a micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Co, Mo, Mn e Ni), sugerindo que os efeitos positivos sobre a *performance* agrônômica dos cultivos resulta do efeito combinado dos constituintes daquela matriz complexa.

Considerando a complexidade química dos extratos de macroalgas marinhas, estudos têm buscado elucidar os mecanismos determinantes dos efeitos biostimulantes em plantas, uma vez que a presença dos metabólitos identificados até o presente momento não poderia explicar, isoladamente, as respostas sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal observadas.

De fato, a hipótese mais aceita considera que os efeitos biológicos conhecidos sobre as diversas espécies vegetais resultam da interação de mais de um grupo de metabólitos, em função da vasta gama de respostas morfogênicas induzidas pela aplicação dos extratos de macroalgas (Vidotti; Rollemberg, 2004). Nesse cenário, as contribuições de estudos metabolômicos deverão ser crescentes na elucidação das relações de composição química dos extratos e das respostas biológicas observadas. Para tal, deverão ser adotados protocolos validados e padronizados, baseados em plataformas analíticas de referência, aspecto que se configura bastante carente no atual momento de desenvolvimento de biotecnologias nos setores afins.



**Figura 1.** Detalhes das estruturas químicas de metabólitos encontrados em macroalgas marinhas com atividades bioestimulantes, biorreguladoras e bioativadoras em espécies vegetais de interesse agrícola.

O estudo do metaboloma mostra-se como uma estratégia relevante para a análise das variáveis envolvidas nos efeitos observados em plantas tratadas com extratos de macroalgas, permitindo um entendimento mais amplo e completo das respostas metabólicas em dado sistema agrícola. As ferramentas de bioinformática típicas de plataformas metabolômicas possibilitam a coleta e sistematização dos dados, seu pré-processamento e análise por meio de métodos estatísticos multivariados, os quais levam em conta a correlação e análise simultânea das variáveis envolvidas nas respostas metabólicas, identificando o grau de variação e a significância destas. Como resultado, metabólitos podem ser identificados, permitindo uma reanálise de seus efeitos bioestimulantes, por exemplo, em uma segunda etapa experimental. Se de interesse, tais compostos poderão ser fracionados e isolados a partir do extrato, de forma orientada pelas respostas biológicas em estudo. Assim, a análise metabolômica de matrizes complexas como os extratos de macroalgas constitui um racional importante para o desenvolvimento de produtos com efeitos desejáveis ao incremento da produção e da qualidade de alimentos de origem vegetal. Consoante à fase de desenvolvimento de bioestimulantes derivados de biomassas de macroalgas, a determinação do metaboloma poderá ser realizada de modo seletivo ou não seletivo quanto à investigação dos analitos bioativos, permitindo identificar aquele(s) de maior relevância biológica e, eventualmente, a ocorrência de respostas biológicas

da espécie agrônômica em estudo, resultantes de efeitos interativos de metabólitos presentes no extrato.

## 3 | CONCLUSÕES

A metabolômica tem ocupado um espaço importante na investigação de respostas metabólicas de organismos marinhos à ação de fatores (a)bióticos, propiciando a geração de conhecimentos mais robustos em relação às abordagens clássicas de estudos da fisiologia, bioquímica e ecologia de ecossistemas marinhos, dado o seu caráter multifatorial. Em futuro próximo, é provável que esse cenário seja ampliado rapidamente, em consequência da padronização e validação de métodos de coleta, processamento amostral e análise. De forma similar, são esperados progressos resultantes do contínuo desenvolvimento de *hardwares* e de ferramentas de bioinformática para o tratamento e a extração de informações relevantes aos eventos metabólicos. Assim, considera-se que as ciências marinhas de caráter básico e aplicado valer-se-ão de um conjunto de possibilidades concretas de construção de uma visão integrada dos processos bioquímicos nos ecossistemas marinhos, contribuindo para a geração de tecnologias nos campos da saúde humana e animal, ambiente e agricultura, por exemplo, racionalmente desenhadas com base na metabolômica.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – Campinas, SP), à CAPES e ao CNPq pelos suportes logístico e financeiro. O primeiro autor agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (processo 307099-2015-6).

## REFERÊNCIAS

- Amorim-Carrilho, K. T. et al. (2014) Review of methods for analysis of carotenoids. **Trends in Analytical Chemistry**, 56: 49-73.
- Andrade, L.R. et al. (2010) Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine Pollution Bulletin**. 60: 1482-1488.
- Barros, L.F. et al. (2013) Small is fast: astrocytic glucose and lactate metabolism at cellular resolution. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. 7: 27-32.
- Bino, R.J. et al. (2004) Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**. 9: 418-425.

- Blunt, J.W. et al. (2016) Marine natural products. **Natural Product Reports**. 33: 382-431.
- Craigie, J.S. et al. (2011) Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**. 23: 371-393.
- Davis, G.D.; Vasanthi, A.H. (2011) Seaweed metabolite database (SWMD): A database of natural compounds from marine algae. **Bioinformatics**. 5: 361-364.
- Deborde, C. et al. (2019) Optimizing 1D 1H-NMR profiling of plant samples for high throughput analysis: extract preparation, standardization, automation and spectra processing. **Metabolomics**, 15:28.
- Dunn, W.B. et al. (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. **The Royal Society of Chemistry**. 130: 606-625.
- Fang, Y. et al. (2008) Effect of foliar application of zinc, selenium, and iron fertilizers on nutrients concentration and yield of rice grain in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 2079-2084.
- Fernandes, A.L.; Silva, R.O. (2011) Avaliação do extrato de algas (*Ascophyllum nodosum*) no desenvolvimento vegetativo e produtivo do cafeeiro irrigado por gotejamento e cultivado em condições de Cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer-Goiânia.
- Fernie, A.R.; Schauer, N. (2008) Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? **Trends in Genetics**. 25: 39-48.
- Fornes, F. et al. (2002) Effect of a seaweed extract on the productivity of 'de Nules' clementine mandarin and navelina orange. **Botanica Marina**. 45: 486-489.
- Fukusaki, E.; Kobayashi, A. (2005) Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 100: 347-354.
- Geiselman, J.A.; McConnell, S.R. (1981) OJ. Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. **Journal of Chemical Ecology**. 7: 1115-1133.
- Gomase, V. et al. (2008) Metabolomics. **Current Drug Metabolism**. 9: 89-98.
- Goodcare, R. et al. (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**. 22: 245-252.
- Gupta, V. et al. (2013) Central metabolic processes of marine macrophytic algae revealed from NMR based metabolome analysis. **The Royal Society of Chemistry**. 3: 7037-7047.
- Haug, K. et al. (2013) MetaboLights - an open-access general-purpose repository for metabolomic studies and associated meta-data. **Nucleic Acids Research**. 41: 781-786.
- Hay, M.E. (1996) Marine chemical ecology: what's known and what's next? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 200: 103-134.
- Holdt, S.L.; Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**. 23: 543-597.
- Kok, D. et al. (2010) The influences of different seaweed doses on table quality characteristics of cv. *Trakya Ilkeren* (*Vitis vinifera* L.). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**. 16: 429-435.
- Kuhlisch, C.; Pohnert, G. (2015) Metabolomics in chemical ecology. **Natural Products Review**. 32: 937-955.
- Kuhnen, S. et al. (2012) Metabolomics and chemometrics as tools for chemo(bio)diversity analysis - maize landraces and propolis. In: **Chemometrics in practical applications**. Rijeka, InTech.
- Kumar, G.; Dinabandhu, S. (2011) Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. **Journal of Applied Phycology**. 23: 251-255.

Lankadural, B.P. et al. (2013) Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. **Environmental Reviews**. 21: 180-205.

Lingakumar, K. et al. (2002) *Gracilaria edulis* and effective alternative source as a growth regulator for legume crops. **Seaweed Research Utiln**. 24: 117-123.

Longnecker, K. et al. (2015) Environmental metabolomics: Databases and tools for data analysis. **Marine Chemistry**. 177: 366-373.

Marante, F.J.T. (2016) Marine environmental metabolomics. In: **Metabolomics – Fundamentals and applications**, Rijeka, InTech.

Martins, C. et al. (2013) Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. **Journal of Applied Phycology**. 25: 1179-1187.

Maschek, J.A.; Baker, B.J. (2008) The chemistry of algal secondary metabolites. In: **Algal Chemical Ecology**, Springer, Berlin Heidelberg.

Mushtaq, M. Y. et al. (2014) Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome. **Phytochemical Analysis**, 25(4):291-306.

Oliver, S.G. et al. (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**. 16: 373-378.

Patti, G.J. et al. (2012) Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 13: 263-269.

Paul, V.J.; Van Alstyne, K.L. (1992) Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda* spp. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 160: 191-203.

Pelletreau, K.N.; Targett, N.M. (2008) New Perspectives for Addressing Patterns of Secondary Metabolites in Marine Macroalgae. In: **Algal Chemical Ecology**, Springer, Berlin Heidelberg.

Shah, M.T. et al. (2013) Seaweed sap as an alternative liquid fertilizer for yield and quality improvement of wheat. **Journal of Plant Nutrition**. 36: 192-200.

Singh, S. et al. (2016) Sustainable enhancement in yield and quality of rain-fed maize through *Gracilaria edulis* and *Kappaphycus alvarezii* seaweed sap. **Journal of Applied Phycology**. 28: 2099-2112.

Spinelli, F. et al. (2009) Perspectives on the use of a seaweed extract to moderate the negative effects of alternate bearing in apple trees. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. 84: 131-137.

Steinbeck, C. et al. (2012) MetaboLights: towards a new COSMOS of metabolomics data management. **Metabolomics**. 8: 757-760.

Sumner, L.W. et al. (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**. 62: 817-836.

Viant, M. (2007) Metabolomics of aquatic organisms: the new 'omics' on the block. **Marine Ecology Progress Series**, 332:301-306.

Vidotti, E.C.; Rollemberg, M.E. (2004) Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**. 27: 139-145.

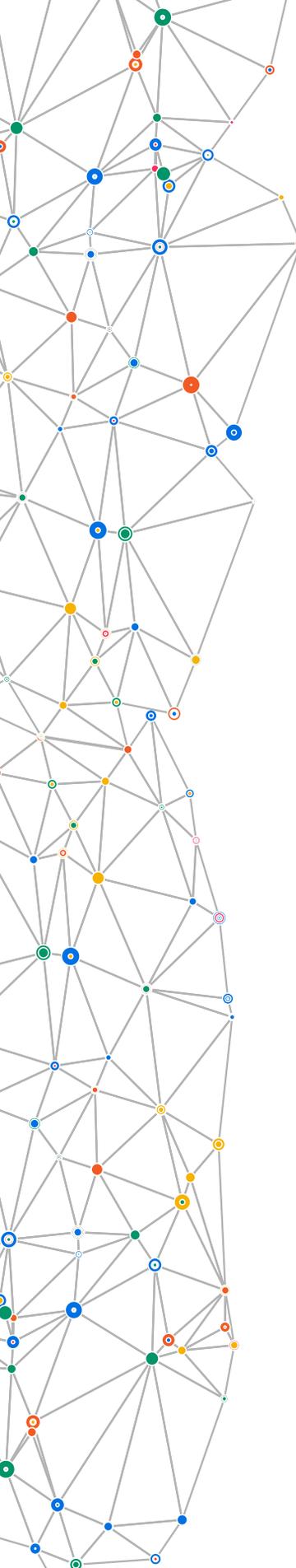
Villas-Boas, S.G; Gombert, A.K. (2006) Análise do metaboloma – uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 36: 58-69.

Wu, Y.; Li, L. (2016) Sample normalization methods in quantitative metabolomics. **Journal of Chromatography A**, 1430:80-95.

Zhang, X.; Chen, H. (2012) Metabolomics: Concept, methods and potential prospect in marine biology. **Chinese Science Bulletin**, 57(25):3253-3261.







# GESTÃO DE DADOS DE BIOTECNOLOGIA MARINHA

Luiz Gadelha<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório Nacional de Computação Científica

## RESUMO

Um banco de dados pode ser definido como uma coleção organizada de dados. Na pesquisa científica, o uso de bancos de dados é crescente, como pode ser observado em projetos de diversas áreas, como por exemplo, na biologia. Os bancos de dados também estão cada vez mais presentes na rotina dos pesquisadores, em particular nas ômicas. Este capítulo descreve alguns dos principais bancos de dados de biodiversidade, por ex. o *Brazilian Marine Biodiversity Database* (BaMBa), desenvolvido para manter grandes conjuntos de dados do ambiente marinho. Os conjuntos de dados curados obtidos a partir de estudos holísticos integrados, que compreendem parâmetros físico-químicos, -ômicas, microbiologia, pesquisas bentônicas e de peixes, podem ser publicados no banco de dados, possibilitando acesso *online* rápido pela academia, agências regulatórias e a indústria.

# 1 | INTRODUÇÃO

O tamanho sem precedentes da população humana, associado às suas atividades econômicas, tem um impacto cada vez maior nos ambientes globais (Newbold et al., 2015). Em muitos países, isso despertou a preocupação de governos sobre o desequilíbrio entre o consumo de recursos por essas atividades e a capacidade dos ecossistemas de prover recursos. Esse desequilíbrio resultou, por exemplo, em perda de cobertura florestal em muitos lugares, na extinção de espécies e na diminuição da disponibilidade de água potável. Os seres humanos dependem de *serviços ecossistêmicos* em várias atividades. Esses serviços, como alimentos e água, resultam de processos que ocorrem dentro desses ecossistemas. Vários estudos mostram que há uma forte relação entre as atividades humanas, as mudanças globais, a biodiversidade e os processos e serviços ecossistêmicos. Chapin et al. (2000) observaram que as variáveis da biodiversidade, como o número de espécies presentes, o número de indivíduos de cada espécie e quais espécies estão presentes, bem como os tipos de interações (por exemplo, tróficas, competitivas, mutualistas) que ocorrem entre essas espécies, determinam as características intrínsecas de espécies, que são expressas por genes ou afetadas pelo ambiente, que influenciam os processos ecossistêmicos. Os autores também observam que mudanças globais, muitas vezes desencadeadas por seres humanos, como as espécies invasoras, o aumento do dióxido de carbono atmosférico e a mudança no uso da terra, podem alterar significativamente essas variáveis da biodiversidade e, conseqüentemente, a expressão de características intrínsecas de espécies. Isso, por sua vez, afeta os processos ecossistêmicos e seus serviços resultantes, que podem ter impactos negativos no desenvolvimento humano. As mudanças nesses serviços ecossistêmicos que são devidas a mudanças na biodiversidade podem às vezes ser não-lineares e abruptas, o que pode representar um risco significativo para os seres humanos. Conclusões semelhantes foram alcançadas em outros levantamentos sobre a relação entre a biodiversidade, o funcionamento de ecossistemas e os serviços ecossistêmicos (Cardinale et al., 2012; Hooper et al., 2012). Cardinale et al. (2012) observam que após a extinção de uma espécie, as mudanças resultantes nos processos ecológicos dependem fortemente de quais características intrínsecas dessa espécie foram eliminadas. Hooper et al. (2012) observam que a perda de biodiversidade é tão significativa para mudanças nos ecossistemas quanto os efeitos diretos de mudanças globais, como o aumento no dióxido de carbono na atmosfera e a diminuição da camada de ozônio. Na Bacia Amazônica, que possui uma parcela considerável da biodiversidade do planeta, estudos demonstram que os incêndios e mudanças no uso da terra podem afetar o armazenamento de carbono, a precipitação e os padrões de descarga dos rios. Isso, por sua vez, afeta os serviços ecossistêmicos cruciais para a população local, como a produção de alimentos, a qualidade do ar e a água potável.

Um grande esforço para resolver o problema foi iniciado em 1992, durante a Cúpula da Terra no Rio de Janeiro, com a assinatura da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CBD)<sup>1</sup>, um

<sup>1</sup> <http://www.cbd.int>

tratado internacional juridicamente vinculante. Seus principais objetivos são a conservação da biodiversidade, incluindo ecossistemas, espécies e recursos genéticos, e seu uso sustentável e justo. Os países signatários são instados a elaborar e executar uma estratégia para a conservação da biodiversidade, conhecida como *Estratégia e Plano de Ação Nacional de Biodiversidade* (NBSAP), e a implementar mecanismos para monitorar e avaliar a implementação dessa estratégia. Devem comunicar periodicamente os progressos na implementação de seus NBSAPs. O *Plano Estratégico para a Biodiversidade 2011-2020* define as ações a serem tomadas pelos países para alcançar um conjunto de vinte metas até 2020, conhecidas como *Metas de Biodiversidade de Aichi*. Deve-se observar que a Assembleia Geral das Nações Unidas declarou 2011-2020 a Década das Nações Unidas para a Biodiversidade. Em 2012, foi criada a Plataforma Intergovernamental sobre Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos (IPBES) para permitir uma cooperação mais estreita entre cientistas e tomadores de decisão governamentais na avaliação do estado da biodiversidade e dos serviços ecossistêmicos e as suas relações.

Balmford et al. (2005) observam que, para cumprir as metas de conservação da biodiversidade, é essencial tornar os indicadores e o conhecimento abertamente disponíveis para os tomadores de decisão, de forma que eles possam efetivamente utilizá-los. A Rede de Observação da Biodiversidade do Grupo de Observação da Terra (GEO BON) propôs um conjunto de 22 Variáveis Essenciais da Biodiversidade (EBVs) (Pereira et al., 2013) que permitiriam monitorar e avaliar mudanças na biodiversidade. O desenvolvimento e a implantação de mecanismos para produzir esses indicadores dependem do acesso a dados confiáveis de pesquisas de campo, sensores automatizados, coleções biológicas, dados moleculares e literatura acadêmica histórica. A transformação desses dados brutos em dados sintetizados que sejam adequados ao uso requer diversas etapas de refinamento. Deve-se avaliar sua qualidade (Chapman, 2005), observando sua precisão taxonômica, geográfica e temporal. Em muitos casos, a cobertura geográfica dos dados é limitada, exigindo, por exemplo, o uso de modelagem de distribuição de espécies (MDE) (Phillips; Anderson; Schapire, 2006) para estimar a probabilidade de uma determinada espécie ocorrer em alguma região geográfica. As metodologias e técnicas utilizadas para gerenciar e analisar esses dados compreendem uma área muitas vezes chamada *Informática na Biodiversidade* (Hardisty et al., 2013; Hobern et al., 2013; La Salle et al., 2016). Guralnick e Hill (2009), por exemplo, propõem o conceito de um mapa mundial que registraria os padrões globais de biodiversidade e como eles mudam ao longo do tempo, derivado de várias fontes, como sensoriamento remoto, literatura sobre biodiversidade, coleções biológicas e bases de dados de sequências de DNA. A partir desse mapa, várias análises, tais como riqueza de espécies e distribuição, podem ser atualizadas periodicamente usando dados mais recentes.

Neste capítulo, apresenta-se uma visão geral desta área de pesquisa, cobrindo seus principais conceitos, práticas e alguns dos desafios existentes.

## 2 | O QUE SÃO BANCOS DE DADOS

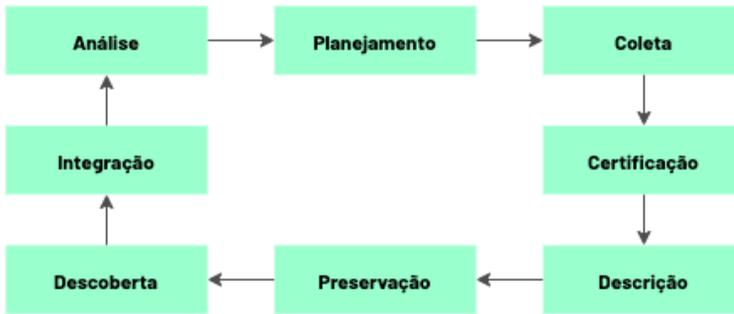
Um banco de dados (Garcia-Molina; Ullman; Widom, 2009) pode ser definido como uma

coleção organizada de dados. Bancos de dados são utilizados em diversas áreas, desde sítios na *web*, como Google e Amazon, a grandes empresas, para manter informações sobre seus negócios. Em Ciência da Computação, a área de pesquisa de Bancos de Dados torna-se mais intensa nos anos 1960, a partir da proposição de bancos de dados onde os dados eram organizados em forma de rede (grafos) ou em forma de árvore (hierárquico). O modelo de dados CODASYL (*Conference/Committee on Data Systems Languages*), baseado em redes, foi bastante utilizado na época, assim como o sistema de banco de dados hierárquico IMS, da IBM. Um dos trabalhos mais influentes e com maior impacto na área de bancos de dados, por Edgar Codd, foi o que apresentou o modelo relacional de bancos de dados (Codd, 1971). Tal modelo permitiu que bancos de dados fossem manipulados com alto grau de abstração, evitando que seus administradores tivessem que se preocupar com detalhes de baixo nível, como estratégias de armazenamento de dados em arquivos. Atualmente é o modelo de dados mais utilizado em sistemas de gerenciamento de bancos de dados comerciais e de *software* livre, a exemplo do Oracle Database, Microsoft SQL Server, PostgreSQL e MySQL.

Na pesquisa científica, o uso de bancos de dados é crescente, como pode ser observado em projetos de diversas áreas. Na Astronomia, por exemplo, diversos levantamentos de objetos celestes foram conduzidos, resultando em bancos de dados dos projetos *Sloan Digital Sky Survey* (SDSS), *Dark Energy Survey* (DES), *Large Synoptic Survey Telescope* (LSST). Na Biologia, também estão cada vez mais presentes na rotina dos pesquisadores, em particular na genômica, com o *GenBank*, *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ), e o banco de dados do *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), e na biodiversidade, com o *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF). Atualmente, bancos de dados são ferramentas essenciais, por permitir que dados científicos sejam armazenados de forma consolidada e persistente e disponibilizados para comunidades de cientistas. Neste capítulo, descreveremos alguns dos principais bancos de dados de biodiversidade, como o GBIF e seu nó brasileiro, o Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Tais bancos de dados, também chamados de repositórios, permitem que sejam consultados dados sobre biodiversidade e que cientistas neles *publiquem* seus próprios conjuntos de dados. Na área de gerenciamento de dados científicos, “publicar” tem o sentido de carregar ou contribuir com um conjunto de dados para algum banco de dados. Na próxima seção, descrevemos as principais etapas do ciclo de vida de dados sobre a biodiversidade.

## 2.1 CICLO DE VIDA DE DADOS DE BIODIVERSIDADE

De acordo com a abordagem de Michener e Jones (2012), dados sobre a biodiversidade seguem um ciclo de vida composto pelas etapas de planejamento, coleta, certificação, descrição, preservação, descoberta, integração, análise. Vale observar que após a atividade de análise, novos ciclos de gestão de dados de biodiversidade podem ser desencadeados conforme o seu resultado. Tais etapas são ilustradas na Figura 1 e geralmente compõem um *Plano de Gestão de Dados* (PGD) de atividades de pesquisa em biodiversidade. Algumas agências de financiamento de pesquisa em países como os Estados Unidos exigem a apresentação de um PGD em submissões a editais de financiamento.



**Figura 1.** Etapas do ciclo de vida de dados de biodiversidade (Michener; Jones, 2012).

Pesquisadores, sejam produtores ou consumidores de dados de biodiversidade, provavelmente executarão atividades relacionadas a pelo menos uma dessas etapas. O restante deste capítulo aborda cada uma das etapas do ciclo de vida de dados de biodiversidade, descrevendo as metodologias, ferramentas, recomendações e desafios nelas existentes.

## 2.2 PLANEJAMENTO

O plano deve conter o que será coletado, quando, por quem e como. Elaborar previamente modelos de planilhas tanto para os metadados como para os dados. É recomendado que haja vocabulários controlados ou ontologias para os termos utilizados durante a coleta de dados.

## 2.3 TIPOS DE DADOS DE BIODIVERSIDADE

A biodiversidade está relacionada com a variedade de organismos vivos, que pode ser medida de muitas formas e em diferentes escalas, a partir de um registro de um organismo observado em uma localização geográfica em uma determinada data, uma *ocorrência de espécie* (Yesson et al., 2007), à abundância relativa de espécies em uma amostra de água coletada em um sítio de pesquisa ecológica de longa duração (Michener et al., 2011). As ômicas também apresentam muitas oportunidades para explorar a biodiversidade. Por exemplo, dados moleculares de amostras ambientais podem ser analisados em estudos de metagenômica para identificar características funcionais e a classificação taxonômica de organismos presentes. Nesta seção, listamos tipos comuns de dados que são usados para descrever e analisar a biodiversidade.

## 2.4 OCORRÊNCIAS DE ESPÉCIES

As ocorrências de espécies são um dos tipos de dados mais frequentemente disponíveis sobre biodiversidade. Os atributos principais de uma ocorrência de espécie são dados por: um *táxon*, que é definido como um grupo de uma ou mais populações de organismos que formam uma unidade; uma localização, e uma data de registro da ocorrência. Os registros de ocorrências de espécies são originários de diferentes fontes. As coleções biológicas presentes, por exemplo,

em museus de história natural são uma fonte valiosa para analisar a biodiversidade. Hardisty et al. (2013) observaram que apenas cerca de 10% das coleções de história natural são digitalizadas e que são necessárias ferramentas de informática para acelerar o processo. Kemp (2015) observa que atualmente a maioria das descobertas de novas espécies são baseadas em espécimes armazenados nessas coleções. Esses espécimes geralmente contêm informações detalhadas sobre o local e a data em que foram coletados, as quais podem ser usadas para derivar registros de ocorrência de espécies. Além dos espécimes de coleções biológicas, observações humanas são outra fonte de registros de ocorrências de espécies. Essas observações ocorrem, por exemplo, durante expedições de campo ou até mesmo através de iniciativas de ciência cidadã, como eBird (<http://www.ebird.org>) e iNaturalist (<http://www.inaturalist.org>).

## 2.5 LISTAS DE ESPÉCIES

Frequentemente são realizados levantamentos em uma região geográfica, como um país ou um parque nacional, para determinar quais espécies estão presentes. Essas pesquisas normalmente resultam em uma lista de táxons, comumente chamada de lista de espécies. Também podem ser restritos a um determinado reino ou bioma. Forzza et al. (2012), por exemplo, descrevem como a *Lista da Flora Brasileira* foi elaborada e publicada em 2010. O esforço envolveu a agregação de informações sobre *vouchers* registrados em sistemas de informação de herbários e contou com taxonomistas para revisá-los. O *Catálogo da Vida* (<http://www.catalogueoflife.org>) agrega mais de 100 listas oficiais de espécies e contém informação sobre cerca de 1,6 milhões de espécies. O *Taxonomy Database* do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>), por exemplo, contém a classificação e nomenclatura dos organismos que estão armazenados em bancos de dados públicos de sequências, como o *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e o ENA (<http://www.ebi.ac.uk/ena>).

## 2.6 DADOS DE AMOSTRAGENS E OBSERVACIONAIS

Os dados baseados em amostras são coletados em eventos, que podem ocorrer apenas uma vez ou periodicamente repetidos. Envolvem tipicamente dados ecológicos e possuem grande amplitude e heterogeneidade de temas. Podem envolver, por exemplo, levantamentos populacionais e medições abióticas em diversas escalas temporais e espaciais em transectos, grades e parcelas (Magnusson et al., 2013). Um caso típico em que são coletados esses tipos de dados são os *Projetos Ecológicos de Longa Duração* (PELDs) (Michener et al., 2011). Em função da heterogeneidade dos dados ecológicos, ainda não há um vocabulário controlado que seja amplamente utilizado. Algumas iniciativas nessa direção incluem ontologias como a ENVO (*Environment Ontology*), a OBOE (*Extensible Observation Ontology*) e a BCO (*Biological Collections Ontology*) (Walls et al., 2014). As ferramentas mais comuns para publicação de dados ecológicos recorrem a metadados para descrever os conjuntos de dados tabulares que os compõem. Tais metadados permitem que informações gerais como a identificação do proprietário de um conjunto de dados e suas coberturas geográficas, temporais e taxonômicas sejam registradas, facilitando a interpretação pelos usuários. Os metadados permitem também descrever textualmente

o significado de cada coluna de um conjunto de dados tabular. Mais adiante, neste capítulo, descreve-se a *Ecological Metadata Language* (EML), um padrão de metadados para conjuntos de dados ecológicos.

## 2.7 ÔMICAS

A análise de sequências de DNA, RNA e de proteínas tem diversas aplicações no estudo da biodiversidade. As sequências genéticas obtidas de amostras ambientais contendo comunidades de organismos, i.e. metagenomas (Robbins et al., 2012), por exemplo, fornecem informações importantes para analisar as características taxonômicas e funcionais dos seus membros. As atividades de taxonomia podem ser auxiliadas pela análise de sequências de DNA (Tautz et al., 2003). O projeto *Barcoding of Life* (Ratnasingham; Hebert, 2007), por exemplo, analisa regiões pequenas e padronizadas dos genes para auxiliar a identificação de espécies. Alguns sistemas, como o VoSeq (Peña; Malm, 2012), permitem ligar *vouchers* presentes em coleções biológicas a sequências de DNA presentes em bancos de dados genômicos. Guralnick e Hill (2009) observam que a biodiversidade pode ser mais precisamente quantificada, quando comparada à simples contagem do número de espécies, pelo grau de relacionamento filogenético entre as espécies. Como exemplos, eles avaliam a prioridade de conservação de aves norte-americanas usando sua distinção filogenética e risco de extinção e analisam a dispersão do vírus influenza A, também usando a análise filogenética.

## 2.8 LITERATURA CIENTÍFICA

Uma vasta quantidade de informações a respeito da biodiversidade está contida na literatura acadêmica. Sínteses de expedições de campo frequentemente estão disponíveis somente em artigos científicos, cujos dados relacionados às amostragens, coletas e as respectivas análises estão propagados para bancos de dados sobre a biodiversidade. Algumas iniciativas, como a *Biodiversity Heritage Library* (BHL) (Gwinn; Rinaldo, 2009), visam utilizar tecnologias, como o reconhecimento ótico de caracteres, para extrair essas informações de artigos científicos e disponibilizá-las em bancos de dados públicos.

## 2.9 IMAGENS E VÍDEOS

Expedições de campo para realização de amostragens frequentemente envolvem a produção de imagens e vídeos que auxiliam a análise dos sítios estudados. Nas seções seguintes, descrevemos o *Audubon Core*<sup>2</sup>, um vocabulário controlado para a descrição de recursos multimídia associados a dados de amostragens e de ocorrências de espécies.

## 2.10 COLETA

<sup>2</sup> [https://terms.tdwg.org/wiki/Audubon\\_Core](https://terms.tdwg.org/wiki/Audubon_Core)

Dados de biodiversidade podem ser coletados de diversas formas: redes de biossensores, expedições de campo, observações feitas por cientistas cidadãos, entre outras. No processo de coleta, é importante que sejam utilizados identificadores únicos para projeto, evento de amostragem, área de amostragem e protocolo utilizado (Stocks; Stout; Shank, 2016). Esses identificadores permitirão adiante que os dados coletados sejam armazenados em bancos de dados de forma consistente. Sempre que possível, os termos devem seguir algum vocabulário controlado ou ontologia, como a BCO-DMO (<http://www.bco-dmo.org>).

## 2.11 CERTIFICAÇÃO

Soberón e Peterson (2004) listam problemas comuns em relação a dados de biodiversidade. Espécimes de coleções biológicas, de onde é extraída parte considerável dos dados de ocorrências de espécies, podem possuir identificações incorretas ou com taxonomia desatualizada. A taxonomia biológica está em constante mudança para acomodar novos conhecimentos sobre espécies. É possível também que haja georreferenciamento incorreto, decorrente de erros de anotação ou imprecisão de instrumentos. Em registros antigos, pela indisponibilidade de mecanismos para avaliação precisa de localização, é comum encontrar somente descrições textuais do local onde um espécime foi coletado.

Diversas ferramentas podem ser utilizadas para reduzir ou eliminar erros de identificação de espécies. Vários catálogos oficiais de espécies oferecem serviços acessíveis pela web para consulta de táxons, como o *Catalogue of Life*<sup>3</sup>, *World Register of Marine Species*<sup>4</sup> e a *Lista de Espécies da Flora do Brasil*<sup>5</sup>. É recomendado que as identificações realizadas em dados coletados relativos a observações de espécies sejam validadas em algum desses catálogos oficiais. Boa parte desses catálogos é também acessível por meio de interfaces de programação (APIs) disponíveis na web, permitindo a automação desse tipo de verificação com scripts ou aplicações.

Com relação a problemas de georreferenciamento, Guralnick (2009) menciona a importância de determinar a incerteza do georreferenciamento dos registros de ocorrências e seu impacto na escala na qual estudos podem ser realizados. Ferramentas como o BioGeomancer (Guralnick, 2006) e Geolocate<sup>6</sup> tentam inferir quais são as coordenadas geográficas de uma ocorrência de espécie a partir de uma descrição textual da sua localização. Otegui e Guralnick (2016) propõem uma API acessível pela web<sup>7</sup> que realiza verificações simples de consistência nos registros, como coordenadas com valor zero, campo país discordante das coordenadas, coordenadas invertidas.

## 2.12 DESCRIÇÃO

Na etapa de descrição, um conjunto de metadados é elaborado para descrever um con-

<sup>3</sup> <http://www.catalogueoflife.org/>

<sup>4</sup> <http://www.marinespecies.org/>

<sup>5</sup> <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>

<sup>6</sup> <http://www.museum.tulane.edu/geolocate/>

<sup>7</sup> <http://api-geospatial.vertnet-portal.appspot.com/geospatial>

junto de dados sobre biodiversidade. Esses metadados são essenciais para que um usuário que obtenha um conjunto de dados consiga interpretá-lo. Nesta seção, descrevemos os padrões, práticas e recomendações para documentação de dados sobre a biodiversidade.

### 2.13 ECOLOGICAL METADATA LANGUAGE (EML)

A *Ecological Metadata Language* (EML) (Fegraus, 2005) é um padrão de metadados desenvolvido originalmente para a descrição de dados ecológicos. Atualmente é também usada para documentar conjuntos de dados relativos a observações de espécies. O padrão possui diversos perfis com seus respectivos campos que podem ser utilizados para definir os atributos de um conjunto de dados. Um perfil de *descrição científica* contém campos como o criador do conjunto de dados (*creator*), sua cobertura geográfica (*geographicCoverage*), temporal (*temporalCoverage*) e taxonômica (*taxonomicCoverage*), e protocolo de amostragem (*sampling*). Esse perfil é utilizado para definir atributos do conjunto de dados como um todo.

O perfil de *representação de dados*, através da entidade *data Table*, permite descrever os atributos de um conjunto de dados tabular. Podem ser definidos os tipos de dados de tais atributos, como datas e valores numéricos, assim como suas restrições, como valores mínimos e máximos. Utilizados em conjunto, os perfis de descrição científica e de representação de dados podem fornecer uma documentação de boa qualidade para um conjunto de dados, facilitando consideravelmente sua interpretação pelos usuários.

Em termos de implementação, um conjunto de metadados em EML é elaborado com a linguagem XML, ilustrada na Figura 2.

```
<eml:eml xmlns:eml="eml://ecoinformatics.org/eml-2.1.1"
  xmlns:dc="http://purl.org/dc/terms/"
  xmlns:xsi="http://www.w3.org/2001/XMLSchema-instance"
  xsi:schemaLocation="eml://ecoinformatics.org/eml-2.1.1 http://rs.gbif.org/schema/eml-gbif-profile/1.1/eml.xsd"
  packageId="1edcfe6d-da55-4d59-b30e-468cd21f8b0b/v2.6" system="http://gbif.org" scope="system"
  xml:lang="eng">
  <dataset>
  <alternateIdentifier>1edcfe6d-da55-4d59-b30e-468cd21f8b0b</alternateIdentifier>
  <alternateIdentifier>http://ipt.sibbr.gov.br/sibbr/resource?r=bamba_fish_seamount</alternateIdentifier>
  <title xml:lang="eng">Fish biodiversity of the Vitória-Trindade Seamount Chain, Southwestern Atlantic: an updated database</title>
  <creator>
  <individualName>
  <givenName>Hudson</givenName>
  <surName>Pinheiro</surName>
  </individualName>
  <organizationName>University of California Santa Cruz</organizationName>
  <positionName>Researcher</positionName>
  </creator>
  <pubDate>
  2016-12-08
  </pubDate>
  <language>eng</language>
  <abstract>
  <para>Primary data was acquired during three scientific diving expeditions to the VTC seamounts and islands, in 2009 (12-26 March)
  and 2011 (3-26 February and 1-18 April). These expeditions covered the photic and upper mesophotic zones (17-120 m depth) of the two
  islands and eight seamounts: Almirante Saldanha, Vitória, Éclairer, Jaseur, (Columbia Bank in [35]), Davis, Dogaressa and Columbia seamo
  unt. Sampling included visual, video and photo records, as well as collection of voucher specimens by divers (hand nets and spear-guns i
  n April 2011) using technical open-circuit SCUBA or closed-circuit rebreathers (Megalodon®) with mixed-gases (TRIMIX and EAN). Primary
  data from fishery surveys (surface longline, bottom longline, midwater trawling and angling activities; see [31*34,69,105]) were incorporate
  d in the database. Fishery sampling was performed over eight volcanic mounts (Vitória, Éclairer, Besnard, Montague, Jaseur, Davis, Dogare
  ssa, Columbia and Trindade) by the REVIZEE and to a much lesser extent TAMAR/ICMBio monitoring assessments.</para>
  </abstract>
  <keywordSet>
  <keyword>Occurrence</keyword>
  <keywordThesaurus>GBIF Dataset Type Vocabulary: http://rs.gbif.org/vocabulary/gbif/dataset_type.xml</keywordThesaurus>
  </keywordSet>
  <keywordSet>
  <keyword>Observation</keyword>
  <keywordThesaurus>GBIF Dataset Subtype Vocabulary: http://rs.gbif.org/vocabulary/gbif/dataset_subtype.xml</keywordThesaurus>
  </keywordSet>
```

**Figura 2.** Metadados especificados conforme o padrão EML.

Normalmente, os bancos de dados de biodiversidade disponibilizam ferramentas para edição e elaboração de metadados no padrão EML de forma mais amigável, através de uma interface gráfica. O repositório de dados observacionais DataONE<sup>8</sup> (Michener et al., 2012), por exemplo, permite que usuários forneçam metadados através de uma ferramenta gráfica chamada Morpho (Higgins; Berkley; Jones, 2002), ilustrada na Figura 3. O mesmo repositório possui também uma *interface web* chamada Metacat (Berkley et al., 2001), que permite a carga de dados ecológicos tabulares em formato livre documentados com o padrão EML. O padrão EML é utilizado também para descrição de conjuntos de dados formatados sobre ocorrências de espécies e amostragens, como será descrito na seção seguinte.



Figura 3. Interface de usuário da ferramenta Morpho para inserção de metadados.

## 2.14 PRESERVAÇÃO

Na etapa de preservação, os conjuntos de dados sobre biodiversidade são publicados em algum banco de dados, como o DataONE e o GBIF, onde estarão disponíveis para a comunidade científica. Tais bancos de dados adotam práticas de curadoria e gestão dos dados, visando sua preservação e disponibilidade em longo prazo. Existem diversos procedimentos possíveis para a publicação. Neste capítulo, serão descritos padrões e procedimentos para carga de um conjunto de dados em um banco de dados de biodiversidade. Será descrito também o fluxo de publicação dos principais repositórios atuais.

## 2.15 DARWIN CORE

*Darwin Core* (Wieczorek et al., 2012) é um padrão para representação de dados de bio-

<sup>8</sup> <https://www.dataone.org/>

diversidade que visa facilitar o compartilhamento dos mesmos. O padrão é composto por uma lista de termos relativos à biodiversidade e suas respectivas definições. As discussões, evolução e manutenção do *Darwin Core* (DwC) são realizadas pelo TDWG (*Biodiversity Information Standards*) (<http://www.tdwg.org>), uma associação para o desenvolvimento e promoção de padrões para o registro e intercâmbio de dados sobre a biodiversidade. O DwC surgiu como um perfil de termos no sistema *Species Analyst*, em 1998, desenvolvido pela Universidade do Kansas para gerenciamento de coleções biológicas. Em 2002 foi adotado para o intercâmbio de informações no *Mammal Networked Information System* (MaNIS), um sistema distribuído composto por várias instituições mantenedoras de coleções biológicas de mamíferos. Em 2009, foi iniciado o processo de padronização do DwC, que foi ratificado em outubro do mesmo ano na reunião anual do TDWG. O DwC se baseia no padrão *Dublin Core* (<http://dublincore.org/>), aproveitando seus termos para a descrição de recursos, como tipo (*type*), modificado por (*modified*) e licença (*license*), e complementando-os com termos específicos de biodiversidade, como número de catálogo (*catalogNumber*) e nome científico (*scientificName*).

Os termos do vocabulário do DwC são organizados da seguinte forma: as classes indicam as categorias ou entidades definidas no padrão. São exemplos de classes: evento (*Event*), localidade (*Location*) e táxon (*Taxon*). Cada classe possui um conjunto de propriedades, que são seus atributos. Por exemplo, a classe *Location* tem atributos como *country* e *decimalLatitude*. Finalmente, valores podem ser atribuídos às propriedades, como "Chile", -33.61 para as propriedades *country* e *decimalLatitude*, respectivamente. Vale observar que é recomendado que, sempre que possível, os valores sejam provenientes de algum vocabulário controlado, no caso de valores textuais, ou de algum padrão de formatação, no caso de valores numéricos ou temporais. Por exemplo, nomes de espécies provenientes de alguma lista reconhecida de espécies, como o *Catalogue of Life* (<http://www.catalogueoflife.org>). A Tabela 1 ilustra a representação de dados de ocorrências de espécies com o DwC. Esses registros são provenientes de um conjunto de dados publicado através do *Brazilian Marine Biodiversity Database* (BaMBa) no GBIF (<http://www.gbif.org/dataset/1edcfe6d-da55-4d59-b30e-468cd21f8b0b>).

**Tabela 1.** Ocorrências de espécies representadas com o DwC.

id	eventDate	decimalLatitude	decimalLongitude	scientificName
6	2002-08-01	-20.805828	-37.761231	<i>Alectis ciliaris</i> (Bloch, 1787)
118	2002-08-01	-22.382222	-37.587500	<i>Balistes vetula</i> (Linnaeus, 1758)
141	2002-08-01	-19.848744	-38.134635	<i>Caranx crysos</i> (Mitchill, 1815)
507	2002-08-01	-20.525417	-29.310350	<i>Thunnus obesus</i> (Lowe, 1839)

Normalmente, um conjunto de dados no formato DwC vem acompanhado por metadados, que são definidos no padrão EML (*Ecological Metadata Language*) (Fegraus et al., 2005). No EML, são encontrados campos como o título, autores, cobertura geográfica e temporal do conjunto de dados, que auxiliam usuários a interpretar conjuntos de dados formatados no padrão DwC.

A exemplo de bancos de dados relacionais, conjuntos de dados que seguem o formato

DwC podem conter múltiplas tabelas que se relacionam através de propriedades que são comuns a todas elas. Tal organização permite, por exemplo, que dados de amostragens sejam expressos também nesse padrão. As Tabelas 2 e 3 ilustram esse tipo de organização de dados para representar amostragens de espécies. A Tabela 2 contém os eventos de amostragem, quatro no total. A coluna *eventId* contém um identificador para cada evento. As demais colunas descrevem a data do evento, a latitude e a longitude, respectivamente. A Tabela 3 contém contagens de organismos para cada evento. A coluna *eventId* descreve a que evento da Tabela 1 as contagens se referem. Por exemplo, as primeiras duas linhas da tabela se referem ao evento que possui identificador 1, que está associado a uma amostragem realizada em 18 de março de 2009.

**Tabela 2.** Eventos de amostragem representados com o DwC.

<i>eventId</i>	<i>eventDate</i>	<i>decimalLatitude</i>	<i>decimalLongitude</i>
1	2009-03-18	-20.51	-38.07
2	2009-03-18	-20.57	-34.80
3	2011-02-11	-20.50	-25.35
4	2011-02-11	-20.47	-34.80

**Tabela 3.** Ocorrências de espécies relacionadas aos eventos da Tabela 1.

<i>eventId</i>	<i>organismQuantity</i>	<i>scientificName</i>
1	2	<i>Alectis ciliaris</i> (Bloch, 1787)
1	5	<i>Balistes vetula</i> (Linnaeus, 1758)
2	1	<i>Caranx crysos</i> (Mitchill, 1815)
...	...	...

**Tabela 4.** Referências sobre o DwC.

Página oficial do padrão DwC:	<a href="http://rs.tdwg.org/dwc">http://rs.tdwg.org/dwc</a>
Guia de referência rápida do DwC:	<a href="http://rs.tdwg.org/dwc/terms">http://rs.tdwg.org/dwc/terms</a>
Termos DwC (Português)	<a href="http://www.sibbr.gov.br/areas/index.php?area=publicar&amp;subarea=termos-dwc">http://www.sibbr.gov.br/areas/index.php?area=publicar&amp;subarea=termos-dwc</a>

A seguir, são descritos os procedimentos para publicação de conjuntos de dados de biodiversidade nos principais repositórios e sistemas de informação da área. É através desses sistemas que os dados são disseminados e preservados.

## 3 SISTEMAS DE INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE

### 3.1 SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA (SiBBr)

O Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira<sup>9</sup> (SiBBr) (Gadelha et al., 2014) é uma iniciativa do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações que disponibiliza uma infraestrutura para o gerenciamento de dados de biodiversidade do Brasil. Todos os dados publicados no SiBBr são propagados para a rede global, GBIF. Assim, o SiBBr atua como o nó brasileiro dessa rede. A descrição arquitetural vigente do SiBBr, aqui apresentada, lista componentes já implementados e disponíveis na página web do sistema. O SiBBr é organizado de forma modular, onde boa parte da funcionalidade está disponível através de serviços web. Dessa forma, novas funcionalidades podem ser agregadas gradualmente e os componentes existentes podem ser modificados e adaptados de forma flexível. Os dois principais componentes para gerenciamento de dados são providos pelo *Portal de Espécies e Ocorrências* e pelo *Portal de Dados Ecológicos*. O primeiro é responsável pela coleta, indexação e disseminação de conjuntos de dados, registros de ocorrência e listas de espécies disponibilizadas por diversos publicadores de dados. Atualmente estão publicados mais de 10 milhões de registros.

Esses conjuntos de dados são publicados utilizando o padrão *Darwin Core* (Wieczorek et al., 2012) com metadados no padrão EML (Fegraus et al., 2005). A funcionalidade de publicação de dados é provida pela ferramenta *Integrated Publishing Toolkit* (IPT) (Robertson et al., 2014), mostrada na Figura 4, que permite que dados disponíveis localmente nas instituições participantes, como, por exemplo, em planilhas ou bancos de dados relacionais, sejam mapeados para o padrão *Darwin Core* e coletados pelo *Portal de Ocorrências e Listas de Espécies*.

As instituições que desejam publicar dados sobre ocorrências e listas de espécies no SiBBr recebem um registro globalmente único que as identifica tanto no escopo do SiBBr quanto do GBIF. Cada instituição pode instalar e cadastrar instâncias do IPT para publicar os dados disponíveis na sua instituição. Dados disponíveis em diversos formatos são mapeados para o padrão *Darwin Core* e os metadados correspondentes são criados no padrão EML. A partir daí, ambos os arquivos são empacotados pelo IPT e transformados em um arquivo único no formato *Darwin Core Archive* (DwC-A). Em seguida, o processo de coleta e indexação é feito pelo *Portal de Ocorrências e Listas de Espécies*. Esta é uma ferramenta web que acessa os endereços dos IPTs cadastrados no GBIF, realizando o *download* dos DwC-A dos conjuntos de dados, e faz a extração dos dados, indexando-os à base de dados do SiBBr. Tal processo é ilustrado na Figura 5.

O *Portal de Dados Ecológicos*, baseado no Metacat (Berkley et al., 2001), é responsável pelo recebimento, armazenamento e disseminação de conjuntos de dados de, por exemplo, Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD) (Michener et al., 2011). Diferentes abordagens em ecologia, aliadas às tradições de pesquisa distintas, tanto em suas subdisciplinas como em

<sup>9</sup> <http://www.sibbr.gov.br>

Home **Manage Resources** About

**Overview: [Fish biodiversity of the Vitória-Trindade Seamount Chain, Southwestern Atlantic: an updated database](#)**

This is the overview page for the *Fish biodiversity of the Vitória-Trindade Seamount Chain, Southwestern Atlantic: an updated database* resource.

**Source Data**

Your source data files and SQL sources for generating a Darwin Core Archive.

No file selected.

Not modified since last publication

<b>bambafish4 [file]</b>	288.9 KB, 531 rows, 34 columns. Oct 20, 2016	<input type="button" value="Edit"/>
--------------------------	--	-------------------------------------

**Darwin Core Mappings**

Your mapping between the source data and Darwin Core terms.

Darwin Core Occurrence

Not modified since last publication

Core		
<b>Darwin Core Occurrence</b>	22 terms mapped to bambafish4. Oct 20, 2016	<input type="button" value="Edit"/>

**Metadata**

Your resource metadata.

Not modified since last publication

**Published Versions**

A preview of your pending published version compared with the current version if existing.

	Current version	Pending version
<b>Version</b>	2.6 <input type="button" value="View"/> ✓	2.7 <input type="button" value="Preview"/>
<b>Published on</b>	Dec 8, 2016	-
<b>Publication log</b>	<input type="button" value="Download"/>	-

**Figura 4.** Interface do IPT para publicação de conjuntos de dados de biodiversidade.

áreas afins, levam à produção de dados altamente heterogêneos. Tais dados podem ser, entre outros, contagens de indivíduos, medidas de variáveis ambientais ou representações de processos ecológicos. As terminologias utilizadas também variam de acordo com a linha de pesquisa, bem como a forma de estruturar os dados digitalmente (Jones et al., 2006). Também foi adotado o padrão de metadados EML para a descrição dos conjuntos de dados ecológicos. Os conjuntos de dados em si, em função da heterogeneidade, são publicados no formato original, através de planilhas ou arquivos textuais com valores separados por vírgula.

**3.2 BRAZILIAN MARINE BIODIVERSITY DATABASE (BaMBa)**

A *Brazilian Marine Biodiversity Database*<sup>10</sup> (BaMBa) (Meirelles et al., 2015) foi desenvolvido para manter grandes conjuntos de dados do ambiente marinho brasileiro. Essencialmente, qualquer informação ambiental pode ser adicionada ao BaMBa. Os conjuntos de dados certificados obtidos a partir de estudos holísticos integrados, que compreendem parâmetros físico-quí-

<sup>10</sup> <https://marinebiodiversity.lncc.br>



**Figura 5.** Processo de publicação de dados com o IPT no SiBBR(Gadelha et al., 2014).

micos, -ômicas, microbiologia, pesquisas bentônicas e de peixes, podem ser publicados no banco de dados, possibilitando políticas e ações científicas, industriais e governamentais a serem realizadas em recursos marinhos. Há um número significativo de bases de dados, no entanto o BaMBA é o único recurso de banco de dados integrado que é ao mesmo tempo apoiado por uma iniciativa governamental e exclusivo para dados marítimos. O BaMBA está ligado ao SiBBR e oferece oportunidades para melhorar a governança dos recursos marinhos e a integração dos cientistas.

O processo de publicação de dados com metadados em EML e dados estruturados em DwC no BaMBA segue o procedimento descrito na seção anterior, utilizando a ferramenta IPT. Os dados do BaMBA são propagados para o SiBBR e o GBIF. Os conjuntos já publicados no BaMBA por esse procedimento compreendem tanto ocorrências de espécies quanto dados de amostragens de sítios ecológicos.

Para os casos em que os usuários queiram fornecer somente os metadados e os dados no seu formato tabular original, como planilhas e arquivos de texto separados por vírgula (CSV), é possível utilizar a ferramenta Metacat (Berkley et al., 2001). Ela permite preencher os principais campos do EML referentes ao conjunto de dados que se deseja publicar através de um formulário *web*. Em seguida, o conjunto de dados pode ser carregado para o repositório no seu formato original. As Figuras 6 e 7 ilustram o processo. Opcionalmente, a entidade *dataTable* do EML pode ser utilizada para fornecer a descrição dos atributos (colunas) dos dados que sejam tabulares. Esse processo de publicação de dados é mais simples, quando comparado ao IPT, uma vez que os dados não precisam ser reestruturados para o formato DwC. Por outro lado, os conjuntos de dados publicados nesse processo requerem maior esforço de interpretação de usuários que os baixem.

A publicação de dados e sua decorrente preservação contribuem para a comunidade científica como um todo. Os dados podem ser reutilizados por outros cientistas que podem explorá-los por outros pontos de vista. Para o publicador dos dados, também podem ser observados benefícios. Um estudo recente (Piwowar; Vision, 2013) mostra que artigos que disponibilizam os dados utilizados em suas análises em repositórios públicos tendem a ter um maior número de citações.

### Upload your data

Use this form to submit a new data package to the repository.

Please have a look at the [Guide for Completing the Data Repository Form](#) before you start filling in this form.

If you have any questions, comments or problems regarding this form, please contact the repository administrator at [help@nceas.ucsb.edu](mailto:help@nceas.ucsb.edu)

\*Denotes a required field.

**Submitter**

\*First Name

\*Last Name

**Basic Information**

\*Data Set Title

\*Organization

**Data Set Owner**

\*First Name

\*Last Name

Organization Name

Figura 6. Publicação de dados ecológicos no BaMBa com o Metacat, descrição do conjunto de dados.

**Temporal Coverage**

Start Date  End Date (leave blank if your data set is open-ended)

\*Year (yyyy)  Year (yyyy)

Month  Month

Day  Day

**Spatial Coverage**

\*Geographic Description

General description of the geographic area in which the data were collected. It can be a simple place name (e.g., Santa Barbara) or a fuller description.

**Coordinates**

Degrees Minutes Seconds

\*Latitude     North  South

\*Longitude     West  East

If only this first lat/long pair is entered, this indicates a point location. If both lat/long pairs are entered, then this first pair represents the northwest corner of a bounding box.

Latitude     North  South

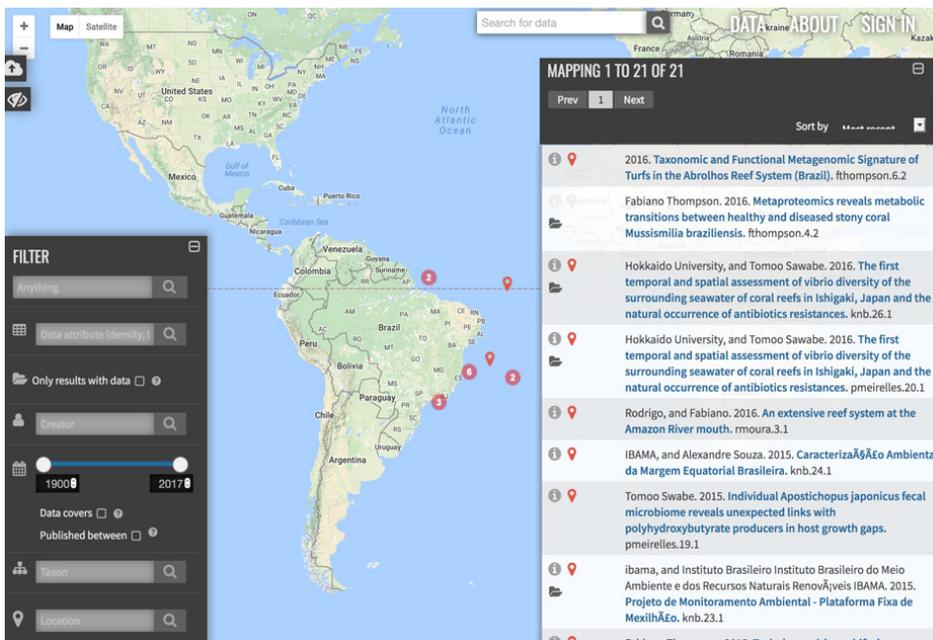
Longitude     West  East

If entered, this lat/long pair represents the southeast corner of a bounding box.

Figura 7. Publicação de dados ecológicos no BaMBa com o Metacat, coberturas temporal e geográfica.

### 3.3 DESCOBERTA

A busca por dados para a realização de pesquisas de análise e síntese em biodiversidade ainda se apresenta como um desafio. Os avanços mais recentes ocorreram com o surgimento de bancos de dados que agregam conjuntos de dados em escalas globais e nacionais, como o GBIF, DataONE, SiBBE e BaMBa. O uso de padrões de metadados e de publicação de dados permite que instituições mapeiem as representações internas dessas informações para um formato que é claramente especificado e que pode ser consumido e processado de forma automática por máquina. Os bancos de dados agregadores de informações de biodiversidade permitem que os conjuntos de dados sejam buscados de forma geográfica (como na Figura 8), taxonômica e temporal.



**Figura 8.** Interface baseada no Metacat do BaMBa para busca de dados ecológicos.

Linguagens e ambientes para análise de dados como o R e o Python já possuem pacotes e bibliotecas que estão integrados aos repositórios e agregadores de dados de biodiversidade. O *rgbif*<sup>11</sup>, por exemplo, é um pacote para o R que permite fazer buscas e recuperar registros diretamente do GBIF, sendo o *pygbif*<sup>12</sup> seu análogo para Python.

### 3.4 INTEGRAÇÃO

Freqüentemente cientistas precisam combinar dados provenientes de diferentes fon-

<sup>11</sup> <https://cran.r-project.org/web/packages/rgbif/>

<sup>12</sup> <https://recology.info/2016/11/pygbif/>

tes em pesquisas integrativas. Por exemplo, dados físico-químicos podem ser combinados com dados de metagenômica para tentar estabelecer correlações que expliquem algum fenômeno. A atividade de combinar dados provenientes de diferentes fontes é chamada de *integração de dados* e é uma das áreas mais ativas de pesquisa sobre a gerência de dados científicos (Ailamaki; Kantere; Dash, 2010). Os bancos de dados de biodiversidade atuais avançaram ao conseguir estabelecer padrões para os metadados, como o EML, e para os dados, como o DwC. No entanto, estes se limitam a definir vocabulários controlados, consistindo de termos padronizados em cada um dos temas. Uma abordagem mais sofisticada, que envolva não somente a definição de termos, mas também relacionamentos entre estes e regras de inferência, que são chamadas de *ontologias*, são assunto da área de pesquisa de *Web Semântica*. Algumas iniciativas nessa direção na área de biodiversidade e ecologia incluem ontologias como a ENVO, a OBOE e a BCO (Walls et al., 2014). As ontologias permitem cruzar diferentes domínios (*Linked Data*) e realizar consultas semânticas, propiciando uma ferramenta de integração de dados consideravelmente mais poderosa que as atuais.

### 3.5 ANÁLISE

Os dados científicos estão sendo produzidos a uma taxa de crescimento exponencial por sensores científicos cada vez mais disponíveis. Isso, aliado a sofisticados modelos computacionais que consomem esses dados, exige novas técnicas para gerenciar experimentos computacionais de forma escalável. Esses experimentos são frequentemente compostos por muitas tarefas computacionais que trocam dados através de relações de produção e consumo dos mesmos, e são normalmente especificadas como *workflows científicos* (Ferreira da Silva et al., 2017). Os *sistemas de gerenciamento de workflows científicos* fornecem recursos como tolerância a falhas, execução escalável, gerenciamento escalável de dados, rastreamento de dependências de dados e registro de informações de proveniência, que reduzem consideravelmente a complexidade do gerenciamento do ciclo de vida desses experimentos. Informações de proveniência (Carata et al., 2014), em particular, podem apoiar a análise do resultado de um experimento científico computacional, uma vez que registram o histórico de sua execução. A biodiversidade segue a mesma tendência de rápido aumento na produção de dados. Atualmente, os dados sobre biodiversidade estão sendo integrados em uma escala global, por meio de iniciativas como o GBIF. Aplicações para MDE usam esses conjuntos de dados de biodiversidade, em conjunto com dados ambientais (como climatologia) para prever a distribuição geográfica de uma espécie particular, ou de múltiplas espécies. No SiBBR, por exemplo, rotinas frequentes de análise e síntese são apoiadas por sistemas de gerenciamento de *workflows científicos* (Deelman et al., 2009). Técnicas de computação paralela e distribuída serão utilizadas na execução dessas análises, a exemplo da modelagem de distribuição de espécies (Townsend; Peterson, 2011), através de recursos computacionais de alto desempenho do Sistema Nacional de Processamento de Alto Desempenho<sup>13</sup>(SINAPAD). No SiBBR<sup>14</sup>, diferentes estratégias de implementação

<sup>13</sup> <http://www.Incc.br/sinapad>

<sup>14</sup> <https://github.com/sibbr/sdm-workflows>

foram realizadas para execução escalável de *workflows* científicos de MDE usando o Swift (Wilde et al., 2011), um sistema de gerenciamento de *workflows* científicos que se concentra na execução paralela e distribuída de tarefas computacionais. Também foi mostrado como o registro de informações de proveniência, conforme suportado pelo Swift com o MTCProv (Gadelha et al., 2012), permite a análise de execução de *workflows* científicos.

## 4 | CONCLUSÃO

Dados de biodiversidade e ecologia são produzidos atualmente a uma taxa exponencial. O GBIF, por exemplo, disponibiliza (em 2017) cerca de 800 milhões de registros de ocorrências de espécies. Estudos integrativos em biodiversidade e ecologia, que necessitam recuperar dados provenientes de diferentes fontes, se beneficiam dessa tendência. Um cientista que adote as práticas, recomendações e ferramentas para gerenciamento de dados de biodiversidade e ecologia beneficiará não apenas à comunidade como um todo, mas também a si próprio. Suas análises tenderão a ter mais impacto em função da melhor transparência e reprodutibilidade da sua pesquisa. Neste capítulo, descrevemos o ciclo de vida pelo qual passam os dados de biodiversidade. Em cada uma das etapas deste ciclo de vida, descrevemos as práticas, ferramentas e recomendações que permitem sua execução. Em particular, na etapa de publicação e preservação dos dados, mostramos o fluxo de publicação dos principais sistemas disponíveis. Diversos desafios ainda existem nessa área, que podem servir de inspiração aos leitores. Pesquisas sobre resolução de entidades, i.e., o mapeamento automático de atributos usados em dados tabulares para termos de vocabulários controlados ou ontologias, podem facilitar consideravelmente o processo de publicação de dados. A migração de vocabulários controlados para ontologias pode desencadear consultas semânticas e inferências automatizadas a respeito de dados de biodiversidade. Finalmente, metodologias para o registro e documentação dos passos executados, em atividades de análise e síntese da biodiversidade, i.e. sua proveniência (Carata et al., 2014), poderiam facilitar a reprodutibilidade e confiabilidade das mesmas.

## REFERÊNCIAS

- Ailamaki, A.; Kantere, V.; Dash, D. (2010) Managing scientific data. **Communications of the ACM**. 53(6): 68. <http://doi.org/10.1145/1743546.1743568>
- Balmford, A.; Bennun, L.; Brink, B. T.; Cooper, D.; Côte, I.M.; Crane, P.; ...Walther, B.A. (2005) Ecology: The Convention on Biological Diversity's 2010 target. **Science** (New York, N.Y.). 307(5707): 212-3. <http://doi.org/10.1126/science.1106281>
- Berkley, C.; Jones, M.; Bojilova, J.; Higgins, D. (2001) Metacat: a schema-independent XML database system. In: **Proceedings Thirteenth International Conference on Scientific and Statistical Database Mana-**

- gement. SSDBM 2001 (pp. 171-179). **IEEE Comput. Soc.** <http://doi.org/10.1109/SSDM.2001.938549>
- Carata, L.; Akoush, S.; Balakrishnan, N.; Bytheway, T.; Sohan, R.; Selter, M.; Hopper, A. (2014) A primer on provenance. **Communications of the ACM.** 57(5): 52-60. <http://doi.org/10.1145/2596628>
- Cardinale, B.J.; Duffy, J.E.; Gonzalez, A.; Hooper, D.U.; Perrings, C.; Venail, P.; ...Naeem, S. (2012) Biodiversity loss and its impact on humanity. **Nature.** 486(7401): 59-67. <http://doi.org/10.1038/nature11148>
- Chapin, F.S.; Zavaleta, E.S.; Eviner, V.T.; Naylor, R.L.; Vitousek, P.M.; Reynolds, H.L.; ... Diaz, S. (2000) Consequences of changing biodiversity. **Nature.** 405(6783): 234-42. <http://doi.org/10.1038/35012241>
- Chapman, A.D. (2005) **Princípios de Qualidade de Dados.** GBIF. [http://www.gbif.org/orc/?doc\\_id=5990](http://www.gbif.org/orc/?doc_id=5990).
- Codd, E.F. (1971) A relational model for large shared data banks. **Communications of the ACM.** 13(6): 377-387.
- Deelman, E.; Gannon, D.; Shields, M.; Taylor, I. (2009). Workflows and e-Science: An overview of workflow system features and capabilities. **Future Generation Computer Systems.** 25(5): 528-540. <https://doi.org/10.1016/j.future.2008.06.012>
- Droege, G.; Barker, K.; Astrin, J.J.; Bartels, P.; Butler, C.; Cantrill, D.; ...Seberg, O. (2014) The Global Genome Biodiversity Network (GGBN) Data Portal. **Nucleic Acids Research.** 42(Database issue): D607-12. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt928>
- Fegraus, E.H.; Andelman, S.; Jones, M.B.; Schildhauer, M. (2005) Maximizing the Value of Ecological Data with Structured Metadata: An Introduction to Ecological Metadata Language (EML) and Principles for Metadata Creation. **Bulletin of the Ecological Society of America.** 86(3): 158-168. [http://doi.org/10.1890/0012-9623\(2005\)86\[158:MTVOED\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1890/0012-9623(2005)86[158:MTVOED]2.0.CO;2)
- Ferreira da Silva, R.; Filgueira, R.; Pietri, I.; Jiang, M.; Sakellariou, R.; Deelman, E. (2017) A characterization of workflow management systems for extreme-scale applications. **Future Generation Computer Systems.** <http://doi.org/10.1016/j.future.2017.02.026>
- Forzza, R. C., Baumgratz, J. F. A., Bicudo, C. E. M., Canhos, D. A. L., Carvalho, A. A., Coelho, M. A. N., ... Zappi, D. C. (2012). New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **BioScience**, 62(1), 39-45. <http://doi.org/10.1525/bio.2012.62.1.8>
- Gadelha, L.M.R.; Wilde, M.; Mattoso, M.; Foster, I. (2012) MTCProv: a practical provenance query framework for many-task scientific computing. **Distributed and Parallel Databases.** 30(5-6): 351-370. <http://doi.org/10.1007/s10619-012-7104-4>
- Gadelha, L.; Guimarães, P.; Moura, A.M.; Drucker, D.P.; Dalcin, E.; Gall, G.; ...Leo, W.V. (2014) SiBBBr: Uma Infraestrutura para Coleta, Integração e Análise de Dados sobre a Biodiversidade Brasileira. In: **VIII Brazilian e-Science Workshop (BRESCI 2014)**. Proc. XXXIV Congress of the Brazilian Computer Society.
- Garcia-Molina, H.; Ullman, J.D.; Widom, J. (2009) **Database Systems: The Complete Book** (Second). Pearson Prentice Hall.
- Guralnick, R.P.; Wiecek, J.; Beaman, R.; Hijmans, R.J. (2006) BioGeomancer: automated georeferencing to map the world's biodiversity data. **PLoS Biology.** 4(11): e381. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040381>
- Guralnick, R.; Hill, A. (2009) Biodiversity informatics: automated approaches for documenting global biodiversity patterns and processes. **Bioinformatics** (Oxford, England). 25(4): 421-428. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn659>
- Gwinn, N.E., Rinaldo, C. (2009) The Biodiversity Heritage Library: sharing biodiversity literature with the world. **IFLA Journal.** 35(1): 25-34. <http://doi.org/10.1177/0340035208102032>

- Hardisty, A.; Roberts, D.; Addink, W.; Aelterman, B.; Agosti, D.; Amaral-Zettler, L.; ...Young, F. (2013) A decadal view of biodiversity informatics: challenges and priorities. **BMC Ecology**. 13(1): 16. <http://doi.org/10.1186/1472-6785-13-16>
- Higgins, D.; Berkley, C.; Jones, M.B. (2002) Managing heterogeneous ecological data using Morpho.In: Proceedings 14th International Conference on Scientific and Statistical Database Management (pp. 69–76). **IEEE Comput. Soc.** <http://doi.org/10.1109/SSDM.2002.1029707>
- Hobern, D.; Apostolico, A.; Arnaud, E.; Bello, J.C.; Canhos, D.; Dubois, G.; ... Willoughby, S. (2013) **Global Biodiversity Information Outlook – Delivering Biodiversity Knowledge in the Information Age**. Retrieved from <http://www.biodiversityinformatics.org/download-gbio-report/>
- Hooper, D.U.; Adair, E.C.; Cardinale, B.J.; Byrnes, J.E.K.; Hungate, B.A.; Matulich, K.L.; ... O'Connor, M.I. (2012) A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. **Nature**. 486(7401): 105–8. <http://doi.org/10.1038/nature11118>
- Kemp, C. (2015) Museums: The endangered dead. **Nature**. 518(7539): 292–294. <http://doi.org/10.1038/518292a>
- La Salle, J.; Williams, K.J.; Moritz, C.; Essl, F.; Dullinger, S.; Rabitsch, W.; ... Moylan, E. (2016) Biodiversity analysis in the digital era. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 371(1702): 534–547. <http://doi.org/10.1098/rstb.2015.0337>
- Magnusson, W.; Braga-Neto, R.; Pezzini, F.; Baccaro, F.; Bergallo, H.; Penha, J.; ... Pontes, A.R.M. (2013). **Biodiversity and Integrated Environmental Monitoring**. *Áttema Editorial*. Retrieved from <http://ppbio.inpa.gov.br/sites/default/files/Biodiversidade e monitoramento ambiental integrado.pdf>
- Meirelles, P.M.; Gadelha Jr., L.M.R.; Francini-Filho, R.B.; Leão, R.M.; Amado-Filho, G.M.; Bastos, A.C.; ... Thompson, F.L. (2015) BaMBa: towards the integrated management of Brazilian marine environmental data. **Database**. <http://doi.org/10.1093/database/bav088>
- Michener, W.K.; Allard, S.; Budden, A.; Cook, R.B.; Douglass, K.; Frame, M.; ... Vieglais, D.A. (2012) Participatory design of DataONE—Enabling cyberinfrastructure for the biological and environmental sciences. **Ecological Informatics**. 11: 5–15. <http://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2011.08.007>
- Michener, W.K.; Jones, M.B. (2012) Ecoinformatics: supporting ecology as a data-intensive science. **Trends in Ecology & Evolution**. 27(2): 85–93. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2011.11.016>
- Michener, W.K.; Porter, J.; Servilla, M.; Vanderbilt, K. (2011) Long term ecological research and information management. **Ecological Informatics**. 6(1): 13–24. <http://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2010.11.005>
- Newbold, T.; Hudson, L.N.; Hill, S.L.L.; Contu, S.; Lysenko, I.; Senior, R.A.; ... Purvis, A. (2015) Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. **Nature**. 520(7545): 45–50. <http://doi.org/10.1038/nature14324>
- Otegui, J.; Guralnick, R.P. (2016) The Geospatial Data Quality REST API for Primary Biodiversity Data. **Bioinformatics**(Oxford, England). btw057-. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw057>
- Parr, C.S.; Guralnick, R.; Cellinese, N.; Page, R.D.M. (2012) Evolutionary informatics: unifying knowledge about the diversity of life. **Trends in Ecology & Evolution**. 27(2): 94–103. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2011.11.001>
- Peña, C.; Malm, T. (2012) VoSeq: A voucher and DNA sequence web application. **PLoS ONE**. 7(6): 1–4. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0039071>
- Pereira, H.M.; Ferrier, S.; Walters, M.; Geller, G.N.; Jongman, R.H.G.; Scholes, R.J.; ... Wegmann, M. (2013) Ecology. Essential biodiversity variables. **Science**. (New York, N.Y.), 339(6117): 277–8. <http://doi.org/>

10.1126/science.1229931

Phillips, S.J.; Anderson, R.P.; Schapire, R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, 190(3–4): 231–259. <http://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026>

Piwovar, H.A.; Vision, T.J. (2013) Data reuse and the open data citation advantage. **PeerJ**. 1:e175. <http://doi.org/10.7717/peerj.175>

Ratnasingham, S.; Hebert, P.D.N. (2007) bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**. 7(3): 355–364. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>

Reichman, O.J.; Jones, M.B.; Schildhauer, M.P. (2011) Challenges and opportunities of open data in ecology. **Science** (New York, N.Y.). 331(6018): 703–5. <http://doi.org/10.1126/science.1197962>

Robbins, R.J.; Amaral-Zettler, L.; Bik, H.; Blum, S.; Edwards, J.; Field, D.; ...Wooley, J. (2012) RCN4GSC Workshop Report: Managing Data at the Interface of Biodiversity and (Meta)Genomics, March 2011. **Standards in Genomic Sciences**. 7(1): 159–65. <http://doi.org/10.4056/sigs.3156511>

Robertson, T.; Döring, M.; Guralnick, R.; Bloom, D.; Wieczorek, J.; Braak, K.; ...Desmet, P. (2014) The GBIF Integrated Publishing Toolkit: Facilitating the Efficient Publishing of Biodiversity Data on the Internet. **PLoS ONE**. 9(8): e102623. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0102623>

Soberón, J.; Peterson, A.T. (2004) Biodiversity informatics: managing and applying primary biodiversity data. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 359(1444): 689–98. <http://doi.org/10.1098/rstb.2003.1439>

Stocks, K.I.; Stout, N.J.; Shank, T.M. (2016) Information Management Strategies for Deep-Sea Biology. In: Clark, M.R.; Consalvey, M.; Rowden, A.A. (Eds.) **Biological Sampling in the Deep Sea** (pp. 368–385). Wiley Blackwell.

Tautz, D.; Arctander, P.; Minelli, A.; Thomas, R.H.; Vogler, A.P. (2003) A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution**. 18(2): 70–74. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00041-1](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00041-1)

Peterson, A.T.; Soberón, J.; Pearson, R.G.; Anderson, R.P.; Martínez-Meyer, E.; Nakamura, M.; Araújo, M.B. (2011) **Ecological Niches and Geographic Distributions**. Princeton University Press.

Tuama, E.Ó.; Deck, J.; Dröge, G.; Döring, M.; Field, D.; Kottmann, R.; ...Yilmaz, P. (2012) Meeting Report: Hackathon-Workshop on Darwin Core and Mlx Standards Alignment (February 2012). **Standards in Genomic Sciences**. 7(1): 166–70. <http://doi.org/10.4056/sigs.3166513>

Walls, R.L.; Guralnick, R.; Deck, J.; Buntzman, A.; Buttigieg, P.L.; Davies, N.; ...Zheng, J. (2014) Meeting report: advancing practical applications of biodiversity ontologies. **Standards in Genomic Sciences**. 9(1): 17. <http://doi.org/10.1186/1944-3277-9-17>

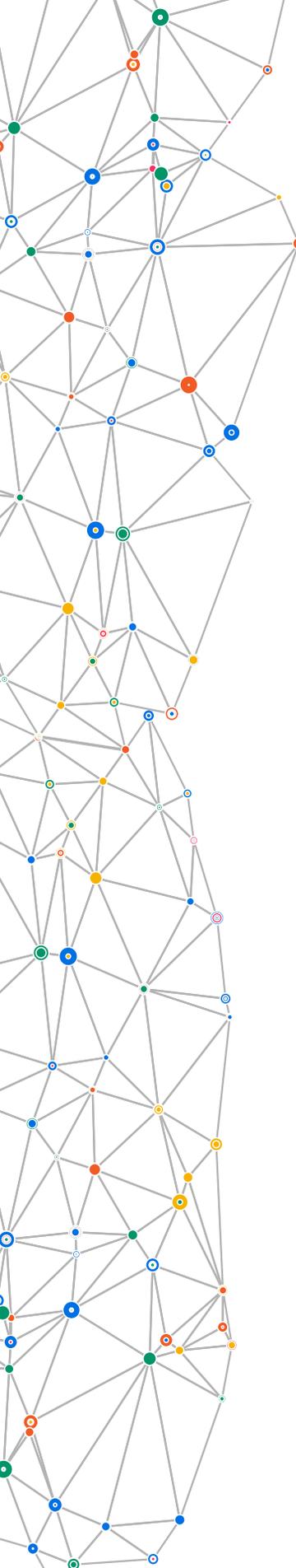
Wieczorek, J.; Bloom, D.; Guralnick, R.; Blum, S.; Döring, M.; Giovanni, R.; ...Vieglais, D. (2012) Darwin Core: an evolving community-developed biodiversity data standard. **PLoS One**. 7(1): e29715. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0029715>

Wilde, M.; Hategan, M.; Wozniak, J.M.; Clifford, B.; Katz, D.S.; Foster, I. (2011) Swift: A language for distributed parallel scripting. **Parallel Computing**. 37(9): 633–652. <http://doi.org/10.1016/j.parco.2011.05.005>

Yesson, C.; Brewer, P. W.; Sutton, T.; Caithness, N.; Pahwa, J.S.; Burgess, M.; ...Culham, A. (2007) How global is the global biodiversity information facility? **PLoS One**. 2(11): e1124. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0001124>







# FERRAMENTAS PARA ANÁLISE DE DADOS EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

Laura Bahiense<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

## RESUMO

As pesquisas em biotecnologia marinha envolvem a análise e o tratamento de uma quantidade gigantesca de dados, e demandam a utilização de ferramentas estatísticas poderosas para examinar esses dados e interpretar os resultados dos estudos. Neste capítulo veremos algumas das ferramentas estatísticas mais importantes usadas atualmente para os estudos em biotecnologia marinha.

# 1 | INTRODUÇÃO

Os progressos significativos que vêm se sucedendo no campo da pesquisa em biotecnologia marinha têm sido impulsionados, em grande parte, pelo aumento da capacidade computacional para a análise e o tratamento da grande quantidade de dados que os estudos envolvem. Com esses avanços, cresceu a demanda por ferramentas estatísticas poderosas para examinar esses dados e interpretar os resultados dos estudos.

# 2 | COLETA DE DADOS

Na grande maioria dos estudos ecológicos, uma vez que a questão ou as questões de interesse tenham sido identificadas, os dados necessários devem ser coletados de forma que resultem em conclusões significativas.

Tipicamente, as pesquisas marinhas envolvem certo número de coletas, em cada sítio de interesse, e, em seguida, um volume fixo de cada coleta é enviado para o laboratório biológico para análise. Quanto mais coletas forem feitas em cada sítio, e quanto mais diferenciados forem esses sítios, maior a probabilidade de identificação e caracterização das espécies coletadas.

O processo de coleta ou amostragem de dados implica as decisões de *onde*, *quando* e *com que frequência* os dados devem ser coletados. Além disso, vários aspectos importantes das coletas de dados influem na posterior análise estatística desses dados, tais como:

- Escolher *locais de coleta adequados*, i.e., capazes de responder a nossas questões biológico-ecológicas;
- Estabelecer um *esquema robusto de amostragem*, que leve em consideração: (i) a distribuição espacial dos dados; (ii) a distribuição temporal dos dados; (iii) um levantamento criterioso das principais fontes de variação/incerteza sobre esses dados;
- Realizar *amostras aleatórias*, para garantir a obtenção de amostras sem vieses (biases): diferentes amostras aleatórias produzem estatísticas diferentes. Além disso, amostras aleatórias maiores fornecem melhores informações sobre a população-alvo;
- Efetuar *replicações* para minimizar o efeito da *variabilidade*: o valor de uma estatística varia em amostragens aleatórias repetidas; quanto mais replicações aleatórias fizermos, maior a chance de a estatística obter um valor mais próximo do nosso parâmetro desconhecido.

O processo de coleta é uma das etapas mais importantes em todo o processo da modelagem de análise estatística dos dados, uma vez que:

- Uma coleta de dados bem feita é essencial para garantir inferências estatísticas precisas e ricas em detalhes;
- Se coletarmos os dados de forma equivocada, pode ser que não consigamos desenvolver um modelo estatístico que nos permita responder corretamente à questão ecológico-biológica.

## 3 | TIPOS DE DADOS

Os dados coletados nas amostras marinhas podem ser de origem biológica, tais como genes, proteínas, metabólitos, pigmentos; ou de origem ambiental, tais como profundidade, temperatura, luminosidade, sedimentação.

Em termos estatísticos, esses dados costumam ser classificados em duas grandes classes: *dados numéricos* e *dados categóricos*.

### 3.1 DADOS CATEGÓRICOS

Os dados *categóricos* assumem valores nominais determinados por rótulos.

Os dados categóricos podem ser *ordinais*, quando existe uma ordem natural entre as categorias, como, por exemplo, em “alto”, “médio” e “baixo”; ou *não ordinais*, quando não existe uma ordem entre as categorias, como, por exemplo, locais de coleta ou tipos de pigmentos: “amarelo”, “vermelho”, “verde”.

### 3.2 DADOS NUMÉRICOS

Os dados *numéricos* assumem valores numéricos, e podem ser subdivididos em *contínuos* ou *discretos*.

#### 3.2.1 DADOS CONTÍNUOS

Os dados *contínuos* podem, em princípio, assumir qualquer valor em uma escala contínua, e podem ser subdivididos em intervalos bem pequenos, dependendo da precisão do sistema de medição.

Dentre os tipos mais comuns de dados contínuos, podemos citar: temperatura, profundidade, luminosidade, sedimentação, massa, distância.

Os dados contínuos são intrinsecamente ordinais, já que podem ser ordenados.

Dependendo da aplicação, pode ser interessante representar um dado tipicamente or-

dinal (contínuo), como, por exemplo, “profundidade”, de forma categórica ou nominal, através de categorias de classificação, como, por exemplo, “topo” e “fundo”.

### 3.2.1 DADOS DISCRETOS

Os dados *discretos* assumem valores inteiros não negativos e podem ser subdivididos em *inteiros* e *binários*.

#### **Dados inteiros**

Os dados *inteiros* são dados discretos, ou seja, podem receber valores no conjunto  $Z = \{0, 1, 2, \dots\}$ .

#### **Dados binários**

Os dados *binários* são um caso particular de dados discretos que podem receber apenas dois valores inteiros não negativos: 0 ou 1. Como exemplo, pode-se citar a presença ou a ausência de certa substância, espécie ou característica na amostra em questão.

## 4 | TIPOS DE VARIÁVEIS

Na grande maioria dos estudos em biotecnologia marinha, nossas questões ecológico-biológicas nos farão coletar dados envolvendo variáveis chamadas *de entrada*, *explicativas*, *preditoras*, ou *“independentes”*, que serão estudadas para que sejam determinadas suas relações com os fenômenos observados, que queremos modelar e compreender melhor, e que são representados pelas variáveis chamadas *de saída*, *resultado*, *resposta* ou *“dependentes”*.

Essa distinção entre as variáveis *de entrada* ou *“independentes”* e as variáveis *de saída* ou *“dependentes”* é muito importante para a grande maioria dos modelos estatísticos, e é mais detalhada a seguir:

- **Variáveis “independentes”:** são as variáveis *de entrada*, ou seja, aquelas selecionadas/controladas pelo pesquisador para determinar suas relações com os fenômenos observados, que desejamos modelar e compreender melhor. São também chamadas de: *x*, *explicativas*, *preditoras*, *controladas*;
- **Variáveis “dependentes”:** são as variáveis *de saída*, ou seja, são os resultados das variáveis independentes ou de entrada que estão sendo manipulados no estudo. As variáveis de saída geralmente não podem ser controladas. Biologicamente, as variáveis *“dependentes”* representam os fenômenos cujos comportamentos estamos interessados em modelar/compreender melhor. São também chamadas de: *y*, *resposta*, *resultado*, *não controladas*.

Em alguns casos, estamos interessados em um único conjunto de *variáveis interdependentes*, sem distinção entre independência e dependência.

## 5 | MEDIDAS DE CENTRALIDADE, DISPERSÃO E NÃO NORMALIDADE

A análise exploratória de dados é muito importante no estudo estatístico dos dados, pois é capaz de revelar aspectos e nuances dos dados que podem nos ajudar a construir um modelo ambiental mais apropriado para responder a nossas questões ecológico-biológicas.

### 5.1 MEDIDAS DE CENTRALIDADE

As *medidas de centralidade* ou *medidas de tendência central* de um conjunto de dados são utilizadas para descrever as características da amostra. As mais usadas são:

- **Média (X ou  $\mu$ ):** determina o “valor médio” de um conjunto de dados. Em geral utiliza-se a média aritmética (determinada pelo resultado da divisão do somatório dos dados pela quantidade de dados), mas algumas circunstâncias justificam o uso das médias geométrica ou harmônica;
- **Mediana ( $M_g$ ):** determina o “valor central” de um conjunto de dados, quando eles são organizados em ordem crescente ou decrescente. Se a quantidade de valores do conjunto for ímpar, a mediana é o valor central; se a quantidade de valores do conjunto for par, tira-se a média aritmética dos dois valores centrais;
- **Moda ( $M_o$ ):** determina o “valor que aparece com mais frequência” em um conjunto de dados.

### 5.2 MEDIDAS DE DISPERSÃO

As *medidas de dispersão* nos dão uma ideia de quão espalhados são os dados da amostra. São muito utilizadas para descrever as características da amostra, e como base para a inferência estatística.

Há muitas medidas de dispersão, mas as mais utilizadas se baseiam em desvios sobre a média ou em dispersões em torno da média, e são as seguintes:

- **Variância ( $\sigma^2$ ):** média dos quadrados das diferenças entre os valores do conjunto de dados e sua própria média  $\left(\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}\right)$

O denominador da variância é n-1, em vez de n, porque os n graus de liberdade, originalmente disponíveis no conjunto, sofreram a redução de uma unidade, uma vez que uma estatística

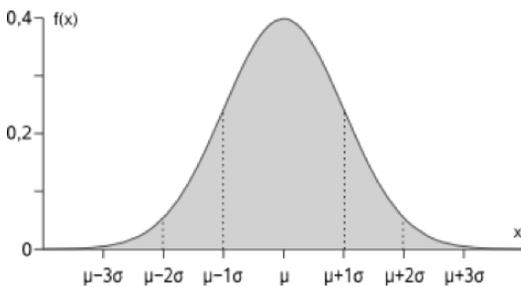
tica, a média, já foi calculada a partir dos dados do conjunto e aplicada na determinação da variância.

- **Desvio-padrão ( $\sigma$ ):** é a raiz quadrada da variância. O desvio-padrão tem a mesma unidade dos dados, ao contrário da variância, que possui o quadrado dessa unidade. Além disso, o desvio-padrão possui um significado especial para dados normalmente distribuídos: sua média  $\pm 1$  desvio-padrão captura aproximadamente 68% dos valores da amostra; sua média  $\pm 2$  desvios-padrão capturam aproximadamente 95% dos valores da amostra; e sua média  $\pm 3$  desvios-padrão capturam mais do que 99% dos valores da amostra (Figura 1).
- **Coefficiente de variação ( $\widehat{CV}$ ):** quociente entre o desvio-padrão e a média dos dados ( $\sigma/\mu$ ). É uma medida normalizada de dispersão, e costuma ser multiplicada por 100 e expressa como porcentagem. O coeficiente de variação é importante, pois nos permite comparar a dispersão para variáveis mensuradas em escalas diferentes.

**5.3 MEDIDAS DE NÃO NORMALIDADE**

As medidas de não normalidade ou medidas de forma medem o desvio da forma da distribuição dos dados em relação a uma distribuição normal.

A distribuição normal é usualmente utilizada como distribuição-padrão ou de referência, e é a base da estatística clássica. A distribuição normal descreve um conjunto de dados que exibe uma distribuição simétrica de frequências “em forma de sino”, ou seja, seus valores se concentram em torno do valor médio e se dispersam igualmente para os lados esquerdo e direito (Figura 1). A distribuição normal padrão possui média ( $\mu$ ) nula e desvio-padrão ( $\sigma$ ) unitário.

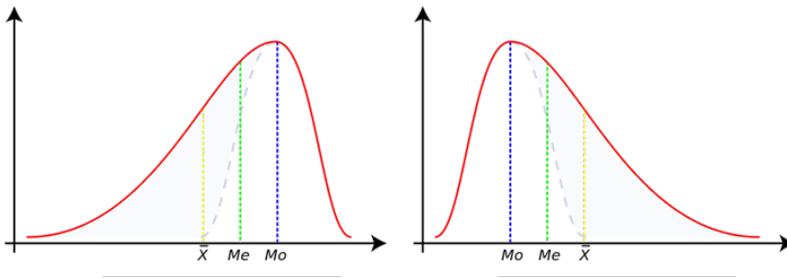


**Figura 1.** Distribuição normal.

**5.3.1 ASSIMETRIA**

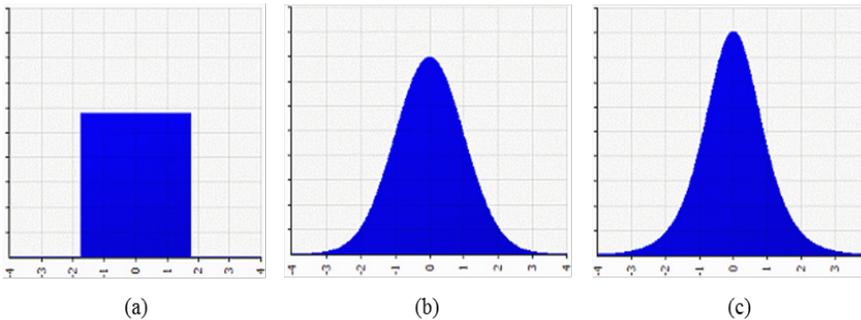
A *assimetria (skewness)* mede a assimetria em relação à média. Quando a maior parte dos dados (o pico dos dados) está à esquerda da média e a cauda direita é mais longa, dizemos que os dados são assimétricos para a direita ou positivamente assimétricos (ver Figura 2b). Esse tipo de assimetria costuma ser mais comum em dados biológicos. Quando a maior parte dos dados (o pico dos dados) está à direita da média e a cauda esquerda é mais longa, dizemos que os dados são assimétricos para a esquerda ou negativamente assimétricos (ver Figura 2a).

### 5.3.2 CURTOSE



**Figura 2.** Assimetria (skewness) negativa (a) e assimetria (skewness) positiva (b).

A *curtose* (*kurtosis*) mede quão bicudo ou quão plano é o pico de uma distribuição de dados. A Figura 3 mostra a curtose das distribuições uniforme, normal e logística.



**Figura 3.** Curtose (*kurtosis*) das distribuições uniforme (a), normal (b) e logística (c).

## 6 GRÁFICOS PARA UMA VARIÁVEL

As medidas estatísticas vistas anteriormente são bastante úteis para descrever as variáveis e suas distribuições, mas, para a maioria das pessoas, os gráficos são mais informativos, devido a seu apelo visual.

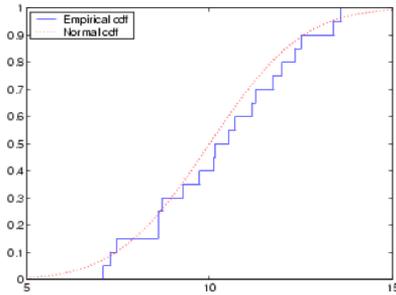
Há muitos tipos de gráficos para uma variável, e não faz sentido mostrar todos aqui, por isso mostraremos os mais comumente utilizados.

### 6.1 GRÁFICO DA FUNÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO ACUMULADA

A partir de uma amostra aleatória de dados, podemos sempre calcular a função de distribuição amostral ou empírica acumulada para saber qual a percentagem de valores da amostra inferiores ou superiores a um determinado valor.

A função de distribuição acumulada de uma variável aleatória  $X$  é uma função que a cada número real  $x$  associa o valor  $F(x)=P(X \leq x)$ ,  $x \in R$ .

A Figura 4 mostra a comparação entre os gráficos da função de distribuição acumulada para uma distribuição empírica qualquer (em azul) e para a distribuição normal (em vermelho).

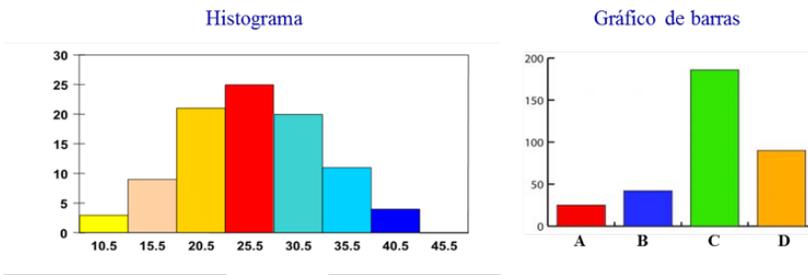


**Figura 4.** Gráficos da função de distribuição acumulada: empírica (azul) e normal (vermelho).

### 6.2 HISTOGRAMA E GRÁFICO DE BARRAS

Para analisar a forma da distribuição de dados contínuos, gera-se um histograma para cada dado. O *histograma* divide o espectro de variação dos dados em intervalos no eixo das abscissas, conta quantas observações há em cada intervalo, e desenha essas frequências de acordo com seus valores no eixo das ordenadas (ver Figura 5).

Para analisar a forma da distribuição de dados categóricos ou discretos (inteiros e binários), gera-se um *gráfico de barras* para cada dado. O gráfico de barras exhibe as categorias no eixo das abscissas, conta quantas observações há em cada categoria, e desenha essas frequências de acordo com seus valores no eixo das ordenadas (ver Figura 5).



**Figura 5.** Histograma e gráfico de barras.

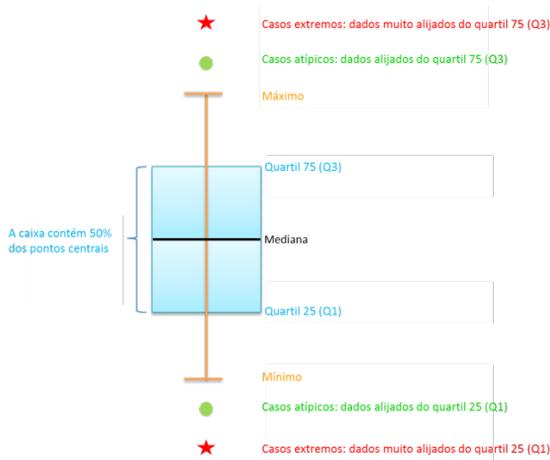
### 6.3 GRÁFICO DE CAIXA

Uma maneira alternativa de examinar a distribuição de uma variável é com o gráfico *box-and-whisker*, mais conhecido como *box-plot* ou *gráfico de caixa*. Esse tipo de gráfico fornece informação sobre as seguintes características do conjunto de dados: centro, amplitude, simetria ou assimetria, e a presença de dados atípicos ou extremos (*outliers*).

Em particular, seu grande valor está na informação que fornece sobre a cauda da distribuição, pois nos ajuda a identificar a existência de possíveis *outliers* no conjunto de dados, que podem afetar as decisões a serem tomadas a partir da análise dos dados se não forem devida-

mente considerados.

Em um gráfico de caixa são apresentadas cinco estatísticas: o mínimo, o primeiro quartil (Q1), a mediana, o terceiro quartil (Q3) e o máximo; além dos discrepantes, se houver (ver Figura 6).

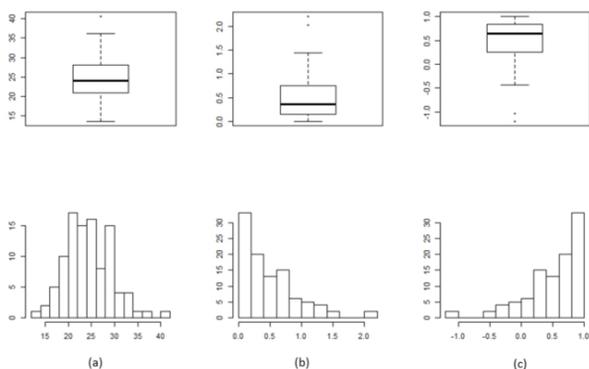


**Figura 6.** Gráfico de caixa e suas estatísticas.

O centro da distribuição é indicado pela linha da mediana, no centro do quadrado. A dispersão é representada pela amplitude do gráfico, que pode ser calculada pela diferença máximo-mínimo. Quanto maior a amplitude, maior a variação nos dados.

A caixa contém 50% dos valores do conjunto de dados. A posição da linha mediana no retângulo informa sobre a assimetria da distribuição:

- Uma distribuição simétrica tem a mediana no centro do retângulo (ver Figura 7a);
- Quando a mediana é próxima do primeiro quartil (Q1), os dados são positivamente assimétricos (ver Figura 7b);
- Quando a mediana é próxima do terceiro quartil (Q3), os dados são negativamente assimétricos (ver Figura 7c).



**Figura 7.** Gráfico de caixa, simetria e assimetria dos dados.

## 7 MEDIDAS DE ASSOCIAÇÃO ENTRE DUAS OU MAIS VARIÁVEIS

Antes de considerar uma análise estatística formal envolvendo múltiplas variáveis, é sempre bom examinar a natureza das relações entre pares de variáveis, tanto as relações dependentes quanto as interdependentes.

É possível medir direção e intensidade da relação estatística entre um par de variáveis aleatórias através de duas grandezas correlacionadas, covariância e coeficiente de correlação, que serão vistas a seguir.

### 7.1 COVARIÂNCIA

Quando duas variáveis aleatórias  $x$  e  $y$  não são independentes, geralmente é interessante avaliar quão fortemente elas estão relacionadas uma com a outra, e uma das maneiras de avaliar isso é através do cálculo da covariância.

A covariância entre duas variáveis aleatórias  $x$  e  $y$  é definida pelo quociente:

$$\text{Cov}(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n - 1} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu_x)(y_i - \mu_y)}{n - 1}$$

A covariância entre  $x$  e  $y$  mede, portanto, a variabilidade conjunta dessas variáveis:

- Quando as variáveis têm *covariância positiva*, significa que as duas variáveis tendem a variar no mesmo sentido, ou seja, valores de  $x$  acima de sua média estão associados a valores de  $y$  acima de sua média, e valores de  $x$  abaixo de sua média estão associados a valores de  $y$  abaixo de sua média;
- Quando as variáveis têm *covariância negativa*, significa que as duas variáveis tendem a variar em sentidos opostos, ou seja, valores de  $x$  acima de sua média estão associados a valores de  $y$  abaixo de sua média, e valores de  $x$  abaixo de sua média estão associados a valores de  $y$  acima de sua média.

Dito de outra forma, o sinal da covariância mostra a tendência na relação linear entre as variáveis. Portanto, quando  $x$  e  $y$  são variáveis aleatórias independentes, sua covariância é nula ( $\text{Cov}(x, y) = 0$ ).

### 7.2 COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE KARL PEARSON

Uma das grandes deficiências da covariância entre duas variáveis aleatórias reside no fato de seu valor depender das unidades de medida adotadas para medir essas variáveis, e por isso ela acaba não fornecendo uma medida da intensidade da relação entre essas variáveis.

O conceito de correlação (linear) entre as variáveis aleatórias  $x$  e  $y$  surgiu exatamente

para contornar essa deficiência, através da padronização dos dados, subtraindo de cada  $x_i$  e  $y_i$ , para  $i=1, \dots, n$ , sua respectiva média, e dividindo pelo desvio-padrão amostral correspondente.

O coeficiente de correlação (linear) entre as variáveis aleatórias  $x$  e  $y$  é, então, definido por:

$$\text{Corr}(x, y) = r_{x,y} = \frac{\text{Cov}(x,y)}{\sigma_x \sigma_y}$$

Dessa forma, para quaisquer variáveis aleatórias  $x$  e  $y$  tem-se que:

$$-1 \leq r_{x,y} \leq +1$$

Essa característica é muito utilizada para reconhecer a existência de uma relação linear forte entre variáveis aleatórias  $x$  e  $y$ : a relação positiva mais forte é evidenciada por  $r = +1$ , enquanto a relação negativa mais forte é evidenciada por  $r = -1$ .

Propriedades do coeficiente de correlação:

- $r_{x,y}$  é adimensional;
- $r$  é uma medida do grau da relação linear entre  $x$  e  $y$  (intensidade);
- O sinal de  $r_{x,y}$  indica se a relação linear entre  $x$  e  $y$  é positiva ou negativa (direção);
- Quando  $x$  e  $y$  são variáveis aleatórias independentes, sua correlação é nula ( $r_{x,y} = 0$ ); entretanto  $r_{x,y} = 0$  não implica necessariamente independência, mas apenas que há ausência de relação linear entre elas;
- $r_{x,y} = 0$  significa que  $x$  e  $y$  são não correlacionadas de forma linear, mas elas podem ser dependentes, pois pode existir uma relação não-linear entre elas;
- $r_{x,y} = 1$  significa que há correlação perfeita entre  $x$  e  $y$ .

## 8 | GRÁFICOS DE ASSOCIAÇÃO ENTRE DUAS OU MAIS VARIÁVEIS

As medidas de associação entre duas ou mais variáveis vistas anteriormente são bastante úteis para descrever as relações de intensidade e direção entre variáveis, mas só ficam mais claras quando visualizadas através de gráficos 2D ou 3D, devido a seu apelo visual.

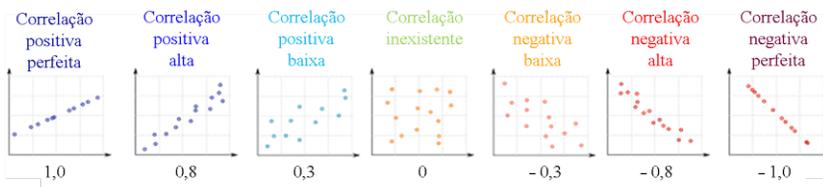
### 8.1 GRÁFICO DE DISPERSÃO 2D

Consideremos  $x$  uma variável explicativa (de entrada) e  $y$  uma variável de resposta (de saída).

Em uma relação determinística,  $y = f(x)$ , a variável explicativa  $x$  é completamente informativa com relação à variável de resposta  $y$ , ou seja, toda alteração no valor de  $y$  corresponde a uma variação no valor de  $x$ .

Já em uma relação estatística, ocorre que, em geral, parte da variação em  $y$  não pode ser explicada a partir de  $x$ .

O gráfico de dispersão 2D (*scatterplot*) nos ajuda justamente a visualizar as relações de intensidade e direção (ver Figura 8) entre pares de variáveis explicativas e de resposta, de acordo com seus coeficientes de correlação linear  $r_{x,y}$ .



**Figura 8.** Gráficos de dispersão 2D.

Observação importante: uma *relação de correlação* não implica necessariamente uma *relação causal*:

- Um coeficiente de correlação alto (próximo de +1 ou -1) entre  $x$  e  $y$  indica uma potencial existência de relação causal entre  $x$  e  $y$ ;
- Portanto, a correlação revelada no gráfico de dispersão não pode ser usada automaticamente para inferir uma relação causal entre  $x$  e  $y$ .

### 8.2 QUADRANTES NO GRÁFICO DE DISPERSÃO 2D

É possível incluir no gráfico de dispersão as retas vertical e horizontal que passam, respectivamente, pelas médias amostrais  $x$  (ou  $\bar{x}$ ) e  $y$  (ou  $\bar{y}$ ). Essas retas definem quatro quadrantes no gráfico de dispersão, conforme ilustra a Figura 9.

Para analisar o que acontece em cada quadrante, é interessante calcular as quantidades abaixo para cada observação:

- O desvio em relação à média da variável explicativa ( $x$ ):  $(x_i - \bar{x})$ ,  $\forall i=1, \dots, n$ ;
- O desvio em relação à média da variável de resposta ( $y$ ):  $(y_i - \bar{y})$ ,  $\forall i=1, \dots, n$ ;
- O produto dos desvios:  $(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$ ,  $\forall i=1, \dots, n$ .

O gráfico de dispersão da Figura 9 mostra que a relação entre  $x$  e  $y$  é aproximadamente linear e positiva. Em vista disso, podemos concluir que:

- As observações em  $Q_1$  são tais que:  $(x_i - \bar{x}) > 0$ ;  $(y_i - \bar{y}) > 0$ ; e, conseqüentemente,  $(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) > 0$ ;
- As observações em  $Q_2$  são tais que:  $(x_i - \bar{x}) < 0$ ;  $(y_i - \bar{y}) > 0$ ; e, conseqüentemente,  $(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) < 0$ ;
- As observações em  $Q_3$  são tais que:  $(x_i - \bar{x}) < 0$ ;  $(y_i - \bar{y}) < 0$ ; e, conseqüentemente,  $(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) > 0$ ;
- Finalmente, as observações em  $Q_4$  são tais que:  $(x_i - \bar{x}) > 0$ ;  $(y_i - \bar{y}) < 0$ ; e, conseqüentemente,  $(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) < 0$ ;
- Se a conclusão de que a relação entre  $x$  e  $y$  é aproximadamente linear e positiva faz sentido, é de se esperar que haja mais observações em  $Q_1$  e  $Q_3$  (onde os produtos dos desvios são positivos) do que em  $Q_2$  e  $Q_4$  (onde os produtos dos desvios são negativos). Sendo assim, espera-se que a soma dos produtos dos desvios ( $\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$ ) seja positiva.

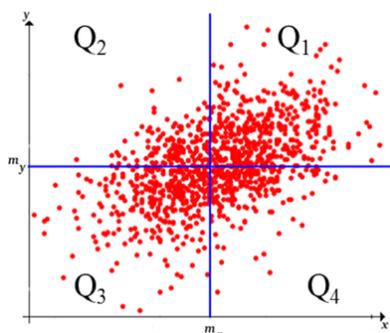


Figura 9. Quadrantes no gráfico de dispersão 2D.

### 8.3 GRÁFICO DE DISPERSÃO 3D

Os gráficos de dispersão 3D são uma extensão para a terceira dimensão dos gráficos de dispersão, como mostrado na Figura 10, com o intuito de visualizar as relações de intensidade e direção entre três variáveis de interesse.

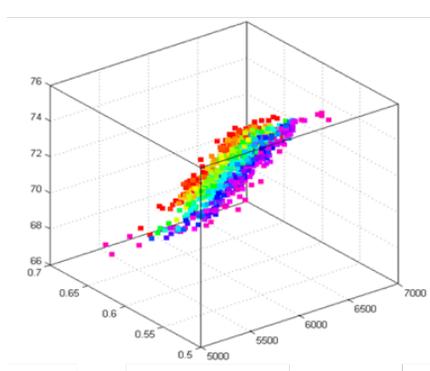


Figura 10. Gráfico de dispersão 3D.

## 9 | TRANSFORMAÇÕES E PADRONIZAÇÕES DE DADOS

Depois de selecionados os dados, muitas vezes torna-se necessário transformá-los e/ou padronizá-los. As razões para tal vêm tanto do lado estatístico quanto do lado ambiental:

- **Motivações estatísticas:** melhorar as hipóteses estatísticas da modelagem (normalidade, linearidade, homogeneidade da variância etc.), e tornar as unidades dos dados comparáveis entre si quando medidas em escalas diferentes;
- **Motivações ambientais:** reduzir o efeito da quantidade total para focar nas quantidades relativas, e equalizar a importância relativa das variáveis.

### 9.1 TRANSFORMAÇÕES DE DADOS

A *transformação de dados* envolve a aplicação de uma função matemática a cada dado da amostra, e é comumente utilizada quando se deseja:

- **Ajustar variáveis altamente assimétricas:** às vezes, é necessário tornar as distribuições mais simétricas para melhor atender às premissas de algum teste estatístico (p. ex., normalidade ou variância constante). Os dados ambientais geralmente contêm distribuições positivamente assimétricas que, em alguns casos, podem ser problemáticas para alguns modelos estatísticos;
- **Enfatizar a presença/ausência de algum atributo/característica:** em alguns conjuntos de dados ambientais, o padrão dominante de interesse pode ser a presença/ausência de algum atributo/característica, em vez dos dados quantitativos coletados.

A escolha da melhor transformação a utilizar depende do tipo dos dados coletados e da melhor adequação da transformação ao que se deseja atingir.

A seguir, algumas transformações comumente usadas com dados ambientais.

#### 9.1.1 TRANSFORMAÇÃO BINÁRIA

A transformação binária (ver Figura 11) converte dados quantitativos em dados binários que representam presença ou ausência. É útil quando há pouca informação quantitativa presente na variável, ou quando se deseja enfatizar a presença/ausência de algum atributo/característica, mas pode ser uma transformação severa, já que toda a informação quantitativa é removida da variável.

#### 9.1.2 TRANSFORMAÇÃO LOGARÍTMICA

Amostra	A	B	C	D	E	F	Total
1	1	1	1	3	3	1	10
2	2	2	4	6	6	0	20
3	10	10	20	30	30	0	100
4	3	3	2	1	1	0	10
5	0	0	0	0	1	0	1
6	0	0	0	0	20	0	20
Total	16	16	27	40	61	1	161



Amostra	A	B	C	D	E	F	Total
1	1	1	1	1	1	1	6
2	1	1	1	1	1	0	5
3	1	1	1	1	1	0	5
4	1	1	1	1	1	0	5
5	0	0	0	0	1	0	1
6	0	0	0	0	1	0	1
Total	4	4	4	4	6	1	23

Figura 11. Transformação binária.

A transformação logarítmica (ver Figura 12) é muito utilizada em dados ambientais, e pode ser usada sobre valores positivos. A transformação logarítmica comprime valores altos e espalha valores baixos, expressando-os como ordens de grandeza. É muito útil quando há um alto grau de variação entre os valores ou quando a distribuição da variável em questão possui um viés, ou seja, uma das extremidades elevadas e uma cauda longa.

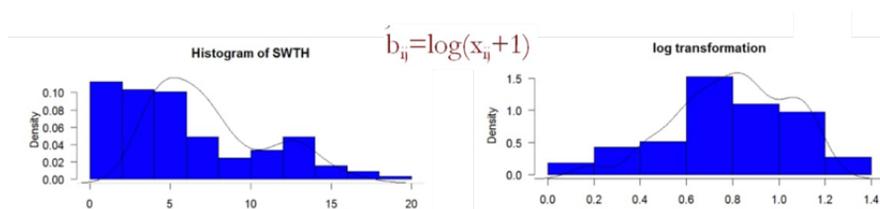


Figura 12. Transformação logarítmica.

### 9.1.3 ARCO-SENO DA RAIZ QUADRADA

A transformação arco-seno da raiz quadrada (ver Figura 13) é muito utilizada em dados ambientais expressos em porcentagem. O efeito da transformação consiste em espalhar o final da escala e comprimir o meio, o que pode ser muito útil para dados com assimetria positiva. A transformação arco-seno (sem a raiz quadrada) pode ser usada para dados assimétricos negativos.

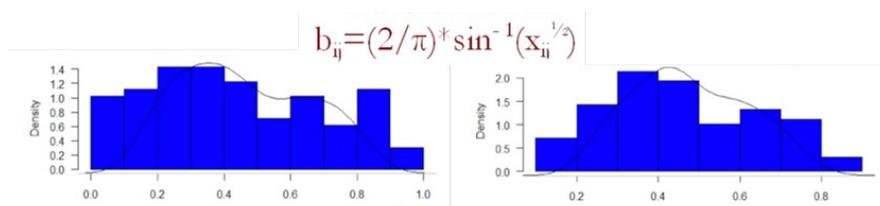


Figura 13. Transformação arco-seno da raiz quadrada.

## 9.2 PADRONIZAÇÕES DE DADOS

A padronização de dados envolve o ajuste de um valor em relação a um padrão especificado, que pode ser derivado da linha (amostra) e/ou da coluna (variável) correspondente da matriz de dados. A padronização de dados é comumente utilizada quando se deseja:

- Tornar as variáveis comparáveis, quando são medidas em diferentes escalas;
- Reduzir o efeito da quantidade total nas amostras, e colocar o foco nas quantidades relativas;
- Equalizar, ou alterar de alguma forma, a importância relativa das variáveis (p. ex., ao lidar ao mesmo tempo com espécies comuns e espécies raras).

A escolha da melhor padronização a utilizar depende do objetivo que se deseja atingir e do método estatístico que será utilizado. Além disso, a escolha entre uma padronização de coluna ou linha tem implicações importantes.

As padronizações de linha são apropriadas quando a principal preocupação é ajustar as diferenças (p. ex., abundância total e diversidade) entre as unidades da amostra (linhas), para colocá-las em pé de igualdade.

As padronizações de coluna são apropriadas quando a principal preocupação é ajustar as diferenças (p. ex., abundância total e variâncias) entre as variáveis (colunas) para colocá-las em pé de igualdade.

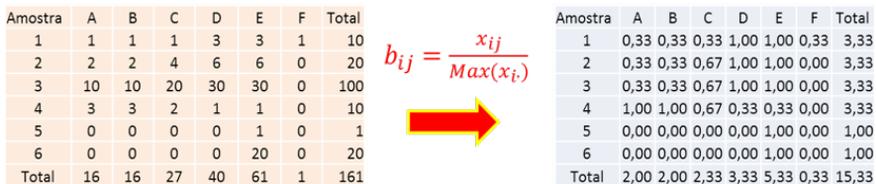
As padronizações podem ser aplicadas em linhas, em colunas, ou em ambas, e a escolha é muitas vezes difícil e requer muita prática e muitos testes.

**9.2.1 PADRONIZAÇÃO DE LINHAS**

A seguir, três padronizações de linha comumente utilizadas com dados ambientais.

**Divisão pelo máximo**

Consiste em dividir cada elemento da linha pelo máximo da linha, conforme exemplo da Figura 14.



**Figura 14.** Padronização divisão de linha pelo máximo.

**Divisão pelo total**

Consiste em dividir cada elemento da linha pelo total da linha, conforme exemplo da Figura 15.

### Hellinger

Consiste em dividir cada elemento da linha pelo total da linha, conforme feito na Figura 15, e, em seguida, tomar a raiz quadrada de cada elemento. Quando os dados já estão expressos em forma de abundância relativa (divisão pelo total da linha), a padronização Hellinger consiste em simplesmente calcular a raiz quadrada de cada elemento.

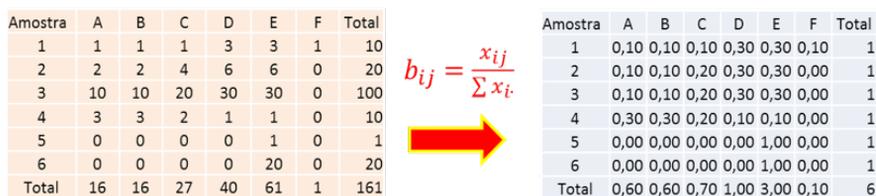


Figura 15. Padronização divisão de linha pelo total.

### 9.2.2 PADRONIZAÇÃO DE COLUNA

A seguir, uma padronização de coluna muito utilizada com dados ambientais.

### Z-score

A padronização Z-score centraliza os valores em zero e escala o espalhamento em uma unidade, ou seja, os dados passam a ter média nula e variância unitária. Isso é feito ao subtrair, de cada elemento da coluna, a média dos valores da coluna, e posteriormente dividir o resultado pelo desvio-padrão da coluna, conforme exemplo da Figura 16.

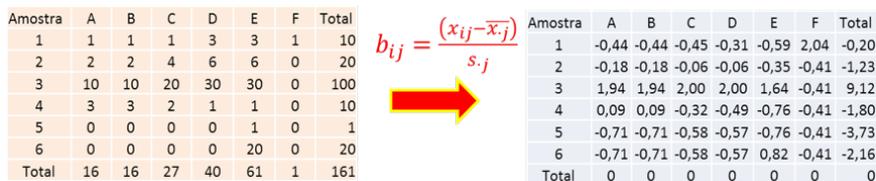


Figura 16. Padronização de coluna Z-score.

A base de qualquer metodologia estatística para análise de dados em estudos de biotecnologia marinha fundamenta-se nas relações que existem entre as observações biológicas/ecológicas e seus resultados.

Os modelos matemáticos fazem uma aproximação do fenômeno/problema biológico/ecológico que se deseja avaliar, ou seja, uma abstração da realidade, e por isso costumam se basear em generalizações ou reduções dos aspectos mais relevantes do fenômeno de interesse.

Um dos maiores desafios do modelador ou do analista de dados consiste em estudar as relações entre os diversos modelos matemáticos e métodos estatísticos para determinar qual combinação de modelos/métodos é mais adequada para resolver cada tipo de problema biológico/ecológico.

A área de *aprendizado estatístico* se dedica ao desenvolvimento de ferramentas matemáticas para a interpretação de conjuntos de dados complexos de alta cardinalidade.

É uma área relativamente recente da Estatística, que combina as áreas da *ciência da computação* e do *aprendizado de máquinas*, e vem ganhando grande destaque devido ao grande sucesso das áreas de *Big Data* e *Analytics*.

As ferramentas de aprendizado estatístico podem ser classificadas como supervisionadas e não supervisionadas. Em termos gerais, o *aprendizado estatístico supervisionado* envolve a construção de um modelo estatístico para prever ou estimar uma variável de resposta ou saída (*resultado*) a partir de uma ou mais variáveis de entrada (*preditores*). Já no caso do *aprendizado estatístico não supervisionado*, existem as variáveis de entrada, mas não há variável de resposta ou saída supervisionada, apesar de podermos inferir ou aprender relações e estruturas a partir das variáveis de entrada.

Nos últimos anos, houve grande progresso e disseminação de conhecimento na área de aplicação do aprendizado estatístico, em grande parte devido à crescente disponibilidade de *softwares* livres poderosos e relativamente fáceis de usar.

A seguir, veremos algumas das principais ferramentas para análise de dados e aprendizado estatístico usadas em biotecnologia marinha. Há várias formas de classificar essas ferramentas; escolhemos classificá-las de acordo com sua natureza e sua aplicabilidade.

## 10.1 REGRESSÃO LINEAR – PREDIÇÃO

A *regressão linear simples* é uma abordagem muito direta para prever uma resposta quantitativa  $y$  com base em uma única variável preditora  $x$ . Assume-se que há uma relação aproximadamente linear entre  $x$  e  $y$ . Matematicamente, escrevemos essa relação linear como:

$$y \approx \alpha + \beta x,$$

em que o símbolo “ $\approx$ ” significa “aproximadamente modelado como”. As constantes  $\alpha$  e  $\beta$  representam, respectivamente, o *intercepto* (ponto onde a reta cruza o eixo  $y$ ) e a *inclinação* (da reta) ou o coeficiente de regressão do modelo linear, e são conhecidos como os coeficientes ou parâmetros do modelo.

Depois de usar os dados de entrada (ou treinamento) para produzir estimativas  $\hat{\alpha}$  e  $\hat{\beta}$  para os coeficientes do modelo, podemos passar a prever a resposta quantitativa  $\hat{y}$  com base na variável de entrada  $x$  através da seguinte fórmula:

$$\hat{y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta}x .$$

Como determinar os coeficientes  $\hat{\alpha}$  e  $\hat{\beta}$ ? Se tivermos  $n$  pares de observações  $(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_n, y_n)$ , podemos determinar  $\hat{\alpha}$  e  $\hat{\beta}$  de tal maneira que o modelo linear se aproxime o máximo possível dos  $n$  pontos observados.

Há várias maneiras de medir essa proximidade dos pontos da reta. A mais comumente usada é a *minimização dos mínimos quadrados*.

Para cada ponto observado  $(x_i, y_i)$ ,  $1 \leq i \leq n$ ,  $y_i$  é o dado observado e  $\hat{y}_i = \hat{\alpha} + \hat{\beta}x_i$  é o valor previsto pelo modelo; portanto, podemos definir o resíduo  $e_i = y_i - \hat{y}_i$ ,  $1 \leq i \leq n$ , como o erro de aproximação entre a  $i$ -ésima resposta observada  $y_i$  e a  $i$ -ésima resposta prevista pelo modelo linear simples.

A soma residual dos quadrados dos erros é definida como:

$$RSS = \varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2 + \dots + \varepsilon_n^2 ,$$

ou, de forma equivalente:

$$RSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{\alpha} - \hat{\beta}x_i)^2$$

Dessa forma, o que se deseja é determinar os parâmetros  $\hat{\alpha}$  e  $\hat{\beta}$  do modelo linear de forma a minimizar os erros de aproximação.

Depois de determinados os parâmetros  $\hat{\alpha}$  e  $\hat{\beta}$  para cada ponto observado  $(x_i, y_i)$ ,  $1 \leq i \leq n$ , temos que:

$$\begin{cases} \hat{y}_i = \hat{\alpha} + \hat{\beta}x_i \rightarrow \text{resposta prevista pelo modelo;} \\ y_i = \hat{\alpha} + \hat{\beta}x_i + \varepsilon_i \rightarrow \varepsilon_i = y_i - \hat{y}_i \text{ livre de sinal, representa o erro de previsão.} \end{cases}$$

A Figura 17 mostra um exemplo de regressão linear: o modelo linear (a reta) aparece em vermelho, e os erros de aproximação parecem como segmentos de reta pretos ligando os pontos observados (também em preto) à reta vermelha.

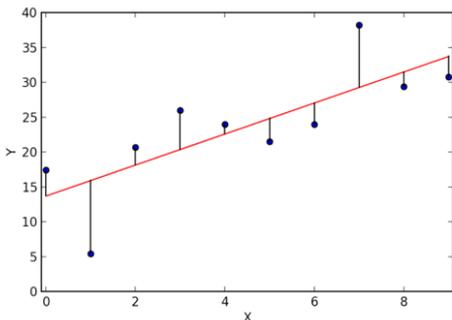


Figura 17. Exemplo de regressão linear.

### 10.1.1 QUANDO USAR REGRESSÃO LINEAR

Existem pelo menos três objetivos principais para o uso da regressão linear simples em problemas de biologia/ecologia: (i) descobrir se a variável de resposta está associada à variável preditora, i.e., se a variável preditora contribui para a previsão da variável de resposta; (ii) medir a força dessa associação/contribuição, e (iii) determinar uma equação que descreva esse relacionamento e que possa ser usada para prever valores desconhecidos.

Já vimos o que fazer para resolver o terceiro objetivo acima; agora veremos como abordar os dois primeiros.

Os erros-padrão definidos anteriormente também podem ser usados para aplicar os testes de hipótese sobre os coeficientes  $\hat{\alpha}$  e  $\hat{\beta}$  determinados. Os testes de hipótese mais usados consistem em testar a hipótese nula e a hipótese alternativa:

- Hipótese nula ( $H_0$ ): não há relação entre  $x$  e  $y$ ;
- Hipótese alternativa ( $H_a$ ): há alguma relação entre  $x$  e  $y$ .

Matematicamente falando, isso corresponde a testar:

- Hipótese nula:  $\beta = 0$  ( $y = \alpha + \epsilon \rightarrow y$  não está associada a  $x$ );
- Hipótese alternativa:  $\beta \neq 0$  ( $y = \beta x + \alpha + \epsilon \rightarrow y$  está associada a  $x$ ).

Os testes de hipótese nos permitem decidir se rejeitamos ou não a hipótese nula, ou seja, a hipótese de que a variável preditora não melhora o ajuste da equação de regressão linear simples mais do que o esperado por acaso.

Inicialmente, admitimos que a hipótese nula ( $H_0$ ) é verdadeira. Se verificarmos estatisticamente que há relação entre a resposta e o preditor, podemos rejeitar a hipótese nula em favor da hipótese alternativa ( $H_a$ ).

Dito de outra maneira, consideramos que a hipótese nula é verdadeira até que uma evidência suficientemente forte indique que essa afirmação é incorreta, com uma baixa probabilidade de erro. Essa probabilidade de erro é dada pela medida conhecida como *p-valor*.

De maneira prática, interpretamos o *p-valor* da seguinte maneira: um *p-valor* pequeno indica que é improvável que observemos uma associação substancial entre o preditor e a resposta devido ao acaso, na ausência de qualquer associação real entre o preditor e a resposta. Portanto, se obtivermos um *p-valor* pequeno, podemos inferir que existe uma associação entre o preditor e a resposta, e rejeitamos a hipótese nula.

O ponto de corte típico de *p-valor* para rejeitar a hipótese nula é 5%, ou seja, *p-valor* menor ou igual a 0,05. Contudo, é muito importante atentar para o seguinte: o *p-valor* não é definitivo, é importante considerar, p.ex., a magnitude do efeito daquela associação, os intervalos de confiança, o tamanho da amostra, o método de coleta dos dados utilizado, a influência de fatores não controlados, entre outros.

Uma vez que tenhamos rejeitado a hipótese nula em favor da hipótese alternativa, o segundo questionamento está relacionado a verificar a força da relação entre as duas variáveis; ou, em outras palavras, verificar quão próximos os pontos observados estão da linha de regressão. Isso significa avaliar (quantificar) até que ponto o modelo linear se encaixa nos dados observados.

A qualidade de um ajuste de regressão linear é avaliada (quantificada) através de duas medidas estatísticas relacionadas - o erro-padrão residual (RSE) e a estatística  $r^2$ :

$$RSE = \sqrt{\frac{RSS}{n-2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} ;$$

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}) - RSS}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}) - \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})}$$

OU

$$r^2 = 1 - \frac{RSS}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})}$$

em que  $\bar{y}$  é a média das respostas observadas, e  $(\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}))$  é a variância total sobre a resposta  $y$ .

O erro residual RSE é considerado uma medida da falta de ajuste do modelo linear em relação aos dados observados. Se as previsões obtidas usando o modelo linear estiverem muito próximas dos valores reais dos resultados, isto é, se  $\hat{y}_i \approx y_i$ , para  $i=1, \dots, n$  então o RSE será pequeno, e poderemos concluir que o modelo se ajusta muito bem aos dados. Por outro lado, se as previsões  $\hat{y}_i$  estiverem muito longe dos valores reais dos resultados  $y_i$  para muitas observações, então o RSE pode ser bastante grande, indicando que o modelo linear proposto não se encaixa bem nos dados.

O erro residual RSE fornece uma medida absoluta de falta de ajuste do modelo linear aos dados. Mas, como é medido de acordo com a unidade usada para medir  $y$ , nem sempre é claro o que constitui um bom RSE.

A estatística  $r^2$  fornece uma medida alternativa de ajuste na forma de uma proporção, a proporção da variância explicada, por isso assume sempre um valor entre 0 e 1, e é independente da escala de  $y$ .

O denominador de  $r^2 (\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}))$  mede a variância total sobre a resposta  $y$ , e pode ser pensado como o total de variabilidade inerente à resposta antes de ser realizada a regressão. Por outro lado, o RSS  $(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i))$  mede o total de variabilidade que é deixada inexplicada após a realização da regressão. Portanto, o numerador de  $r^2 (\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}) - (y_i - \hat{y}_i))$  mede a quantidade de variabilidade na resposta que é explicada (ou removida) executando a regressão linear e, por fim, podemos concluir que  $r^2$  mede a proporção de variabilidade em  $y$  que pode ser explicada através de  $x$ .

Com isso, uma estatística  $r^2$  próxima a 1 indica que uma grande proporção da variabilidade na resposta foi explicada pela regressão linear. Por outro lado, um  $r^2$  próximo a 0 indica que a regressão linear não explicou muito a variabilidade na resposta. Isso pode ocorrer porque o modelo linear não é adequado, ou o erro inerente é alto, ou ambos.

A estatística  $r^2$  tem uma vantagem interpretativa sobre o erro residual RSE, uma vez

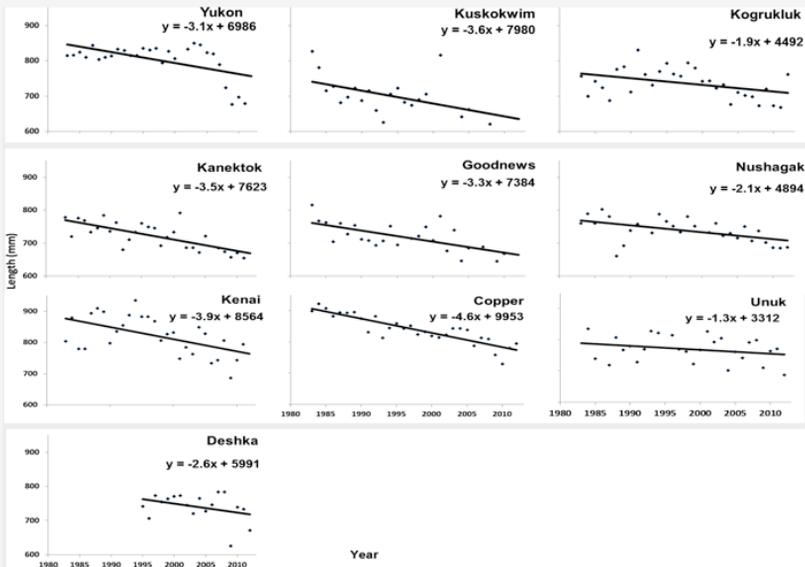
que, ao contrário do RSE, está sempre entre 0 e 1. Entretanto, a avaliação de qual é um bom valor de  $r^2$ , em geral, depende da aplicação.

### 10.1.2 APLICAÇÃO DE REGRESSÃO LINEAR SIMPLES À PRODUÇÃO DE SALMÃO

No quadro a seguir, é apresentada uma aplicação da regressão linear a um estudo sobre o comprimento e a idade de maturação de um tipo de salmão no Alasca.

#### Changes in Size and Age of Chinook Salmon *Oncorhynchus tshawytscha* Returning to Alaska

A regressão linear foi usada para quantificar as tendências de queda no comprimento e na idade de maturação em dez conjuntos de dados provenientes de estoques dispersos de salmão chinook *Oncorhynchus tshawytscha* no Alasca. Os autores constataram que, em média, esses peixes se tornaram menores nos últimos 30 anos (~6 gerações). Eles concluíram que: a colheita seletiva por tamanho pode estar levando a maturação prematura e diminuição de tamanho; fatores adicionais, como as condições oceânicas ou as interações competitivas com outras espécies de salmão, também podem ser responsáveis; e essas mudanças fenotípicas amplas e disseminadas influenciam a fecundidade e a abundância populacional, afetando diretamente as populações de peixes e as pescarias associadas.



Fonte: Bert Lewis, W. Stewart Grant, Richard E. Brenner, and Toshihide Hamazaki. Changes in Size and Age of Chinook Salmon *Oncorhynchus tshawytscha* Returning to Alaska. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130184. Published online 2015 Jun 19. doi: 10.1371/journal.pone.0130184

### 10.1.3 REGRESSÃO LINEAR × CORRELAÇÃO

A estatística  $r^2$  é uma medida da relação de linearidade entre  $x$  e  $y$ , e, junto com o  $p$ -valor, é a medida mais usada para avaliar a qualidade da regressão linear. Talvez por isso haja tanta confusão na literatura acerca do uso de correlação ou regressão.

Existem diferenças reais entre *correlação* e *regressão linear*, mas, em geral, elas não importam. A correlação e a regressão linear dão exatamente o mesmo  $p$ -valor para o teste de hipóteses, e, para muitos dos experimentos biológicos/ecológicos, esse é o resultado importante. Então, se estivermos interessados principalmente no  $p$ -valor, não precisamos nos preocupar com a diferença entre correlação e regressão.

Agora, se estivermos mais interessados em comparar a força da relação ( $r^2$ ), estaremos mais preocupados com a correlação, e deveremos projetar o experimento de forma a mensurar  $x$  e  $y$  sobre uma amostra aleatória de indivíduos. Se determinarmos os valores de  $x$  antes de fazer o experimento, estaremos fazendo uma regressão, e não devemos interpretar o  $r^2$  como uma estimativa de algo geral sobre a população que observamos.

### 10.1.4 REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA

A regressão linear simples é uma abordagem útil para prever uma variável de resposta com base em uma única variável preditora. No entanto, na prática, muitas vezes temos mais de um preditor. Nesse caso, atribuímos a cada variável preditora um coeficiente de inclinação separado. Suponhamos que temos  $p$  variáveis predictoras distintas, então o modelo de regressão linear múltipla assume a seguinte forma:

$$y = \alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_p x_p + \varepsilon,$$

em que as  $x_j, 1 \leq j \leq p$ , representam as variáveis predictoras e os coeficientes da regressão  $\beta_j, 1 \leq j \leq p$ , quantificam a associação entre a  $j$ -ésima variável preditora e a variável de resposta  $y$ . Os coeficientes  $\beta_j$  podem ser interpretados como o efeito médio sobre  $y$  de uma unidade de acréscimo sobre  $x_j$ , quando as demais predictoras são mantidas fixas.

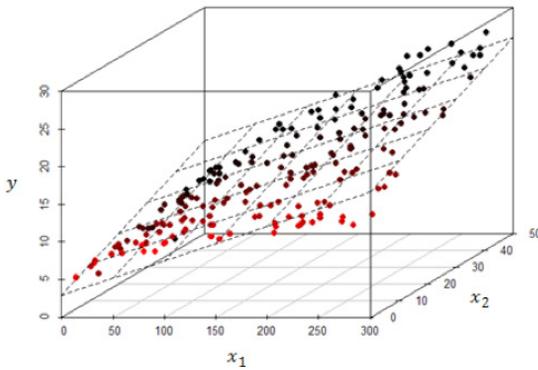
Como determinar os coeficientes  $\alpha, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p$ ? Se tivermos  $n$  pares de observações  $(x_{11}, x_{12}, \dots, x_{1p}, y_1), (x_{21}, x_{22}, \dots, x_{2p}, y_2), \dots, (x_{n1}, x_{n2}, \dots, x_{np}, y_n)$ , podemos determinar os coeficientes estimados  $\hat{\alpha}, \hat{\beta}_1, \hat{\beta}_2, \dots, \hat{\beta}_p$  e fazer previsões para  $y$  usando a fórmula:

$$\hat{y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta}_1 x_1 + \hat{\beta}_2 x_2 + \dots + \hat{\beta}_p x_p.$$

Os parâmetros são estimados usando a mesma abordagem de mínimos quadrados utilizada para a regressão linear simples - de tal maneira que o modelo linear se aproxime o máximo possível dos  $n$  pontos observados (mínimo RSS):

$$RSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{\alpha} - \hat{\beta}_1 x_{i1} - \hat{\beta}_2 x_{i2} - \dots - \hat{\beta}_p x_{ip})^2.$$

A Figura 18 ilustra um exemplo de aplicação de mínimos quadrados ajustados a um conjunto de dados com duas variáveis predictoras.



**Figura 18.** Exemplo de regressão linear múltipla com duas variáveis predictoras.

### 10.1.5 TESTES DE HIPÓTESE

A principal hipótese nula de uma regressão múltipla é que não há relação entre as variáveis predictoras e a variável de resposta. Em outras palavras, os valores previstos para a resposta através da equação de regressão múltipla não estão mais próximos dos valores reais da resposta do que seria de esperar por acaso.

Quando se trabalha com uma regressão múltipla, deve-se testar uma hipótese nula para cada variável preditora, ou seja, a hipótese de que a adição de cada variável preditora, individualmente, à regressão múltipla não melhora o ajuste da equação de regressão mais do que o esperado por acaso. Matematicamente, se é uma regressão múltipla com  $p$  preditores, é necessário que todos os coeficientes de regressão sejam nulos, i. e.  $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p = 0$ .

Mesmo obtendo um p-valor para cada uma das hipóteses nulas, eles devem ser usados com cautela como guia para construir a equação de regressão múltipla. Os p-valores não devem ser usados como testes de hipóteses nulas biológicas, ou seja, para inferir causalidade biológica, como será detalhado mais à frente.

### 10.1.6 QUANDO USAR A REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA

Utilizamos a regressão múltipla quando queremos analisar três ou mais variáveis de medição, onde uma delas é a variável dependente (resposta) e as demais são as variáveis independentes (predictoras), e imaginamos que elas possam ter um efeito sobre a variável de resposta.

Assim como no caso da regressão linear simples, existem pelo menos três objetivos principais para o uso da regressão linear múltipla em problemas de biologia/ecologia: (i) descobrir se pelo menos uma entre as variáveis predictoras contribui para a previsão da variável de resposta; (ii) descobrir se todas as variáveis predictoras contribuem para a previsão da variável de resposta, ou se é apenas um subconjunto das variáveis predictoras; (iii) avaliar a qualidade do modelo linear múltiplo gerado, i.e., checar se ele se ajusta bem aos dados observados.

Em relação ao primeiro objetivo, basta aplicar o teste de hipóteses e testar uma hipótese nula para cada variável preditora, conforme mostrado anteriormente.

Em relação ao segundo objetivo, se concluirmos, com base nos p-valores, que pelo menos uma das variáveis preditoras está relacionada à variável de resposta, então teremos que descobrir qual é o subconjunto das preditoras que estão associadas à resposta. Isso é importante para a criação de um único modelo envolvendo apenas essas preditoras, e essa tarefa é referida na literatura como “seleção de variáveis”.

Heurística gulosa para a seleção de variáveis: (i) começar com um modelo linear simples contendo apenas um intercepto e nenhuma variável preditora; (ii) testar as  $p$  regressões lineares simples, e adicionar ao modelo inicial a variável preditora que resulte na menor soma residual dos quadrados dos erros (RSS), i.e., a que fornece o melhor ajuste ao modelo inicial; (iii) adicionar ao modelo com uma única variável preditora a nova variável preditora que resulte no menor RSS para esse novo modelo de duas variáveis; (iv) adicionar ao modelo com duas variáveis preditoras a nova variável preditora que resulte no menor RSS para esse novo modelo de três variáveis; (v) e assim sucessivamente, até que algum critério de parada seja satisfeito (p.ex., até que todas as variáveis preditoras fora do modelo tenham um p-valor grande quando adicionadas ao modelo anterior). Por se tratar de uma heurística gulosa, costuma incluir variáveis de maneira precoce, de tal forma que, mais tarde, se tornam redundantes.

Terceiro objetivo: avaliar a qualidade do modelo linear múltiplo gerado, i.e., checar se ele se ajusta bem aos dados observados. A medida mais utilizada para avaliar o ajuste do modelo é a estatística  $r_2$ , i.e., a proporção da variância explicada, que é computada e interpretada de forma similar à regressão linear simples. A única diferença é que, na regressão múltipla,  $r_2 = \text{Cor}(y, \hat{y})^2$ , ou seja, o quadrado da correlação entre a resposta e o modelo linear ajustado, aquele que maximiza essa correlação dentre todos os modelos lineares possíveis. Um valor de  $r_2$  próximo a 1 indica que o modelo linear ajustado explica uma grande parcela da variância da variável de resposta.

### 10.1.7 CORRELAÇÃO × CAUSALIDADE

A presença de correlação entre duas variáveis não implica necessariamente causalidade, ou seja, relação de causa-efeito. Isso porque uma associação significativa entre duas variáveis não significa necessariamente que uma variação em uma certamente provocará uma variação na outra, pois, dependendo do caso, pode haver uma terceira variável (geralmente chamada de “variável de confusão”) que pode afetar as duas primeiras.

Se o nosso objetivo é a predição, a multicolinearidade não é tão importante. No entanto, se o objetivo é entender as relações de causa e efeito, a multicolinearidade pode nos confundir. Antes de fazer a regressão múltipla, devemos verificar a correlação entre cada par de variáveis independentes (preditoras) e, se duas delas estiverem altamente correlacionadas, devemos escolher apenas uma para compor o modelo.

Os exemplos mais comuns de autocorrelação em biologia/ecologia são: (i) a autocorrelação temporal, em que uma mesma variável é medida em momentos diferentes; e (ii) a autocorrelação espacial, que ocorre quando medimos uma mesma variável em locais que estão

muito próximos.

### 10.1.8 LIMITAÇÕES DA REGRESSÃO LINEAR

Os modelos de regressão linear que vimos até agora fornecem resultados interpretativos e funcionam muito bem para muitas aplicações do mundo real, como a que vimos anteriormente para o estudo sobre o salmão no Alasca.

No entanto, para poder trabalhar com esses modelos, assumimos algumas premissas (pressupostos) que são restritivas e muitas vezes são violadas na prática. Duas das premissas mais importantes afirmam que a relação entre as variáveis preditoras e a resposta é aditiva e linear:

- A premissa da aditividade implica que o efeito das mudanças em um preditor  $x_j$  sobre a resposta  $y$  é independente dos valores dos outros preditores;
- A premissa da linearidade afirma que a mudança na resposta  $y$  devido a uma mudança de unidade em  $x_j$  é constante, independentemente do valor de  $x_j$ .

Até agora, assumimos a existência de uma relação linear entre a resposta e os preditores. Uma maneira simples de estender diretamente o modelo linear para acomodar relações não lineares é através da regressão polinomial. Através dela, incluímos versões transformadas dos preditores no modelo, como, por exemplo,  $x \rightarrow x^2$  ( $y = \alpha + \beta_1 x_1 + \epsilon \rightarrow y = \alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_1^2 + \epsilon$ ),  $x \rightarrow \log x$ ,  $x \rightarrow \sqrt{x}$ .

Além disso, como já mencionado anteriormente, a colinearidade refere-se à situação em que duas ou mais variáveis preditoras estão intimamente relacionadas entre si. A presença de colinearidade pode causar problemas quando estamos trabalhando com regressão linear múltipla, pois pode ser difícil separar os efeitos individuais das variáveis preditoras colineares sobre a resposta.

Uma maneira simples de detectar colinearidade consiste em investigar a matriz de correlação entre os preditores. Um valor absoluto alto para um elemento  $(i,j)$  dessa matriz indica que as variáveis preditoras  $x_i$  e  $x_j$  são altamente correlacionadas e, portanto, há um problema de colinearidade nos dados. Infelizmente, nem todos os problemas de colinearidade podem ser detectados por inspeção da matriz de correlação: é possível que a colinearidade exista entre três ou mais variáveis, mesmo que nenhum par de variáveis tenha uma correlação particularmente alta. Chamamos essa situação de multicolineariedade.

Por fim, temos assumido que todas as variáveis em nosso modelo de regressão, seja ele simples ou múltiplo, são quantitativas. Na prática, nem sempre isso é verdade, pois, muitas vezes, alguns preditores são qualitativos. Nesse caso, o tipo de modelo mais adequado é o da regressão logística, que será visto em seguida.

### 10.2 REGRESSÃO LOGÍSTICA – CLASSIFICAÇÃO

Um problema de *classificação* consiste na previsão de respostas qualitativas, como, por exemplo, Sim/Não ou Verdadeiro/Falso. O processo é chamado de classificação porque envolve a categorização da resposta, ou seja, a identificação da resposta com uma categoria ou uma classe. Os problemas de classificação ocorrem frequentemente e, dependendo da área de aplicação, podem aparecer mais do que os problemas de regressão.

Existem muitas técnicas de classificação, ou classificadores, que podem ser usadas para prever uma resposta qualitativa. Vamos nos concentrar em uma das mais utilizadas, e cujos cálculos matemáticos são mais facilmente compreendidos: a regressão logística.

Assim como na predição, na classificação temos um conjunto de observações de treinamento que são usadas para construir um classificador. Queremos que nosso classificador funcione bem não apenas com os dados de treinamento, mas também com novas observações que não tenham sido usadas para treinar o classificador.

### 10.2.1 REGRESSÃO LOGÍSTICA SIMPLES

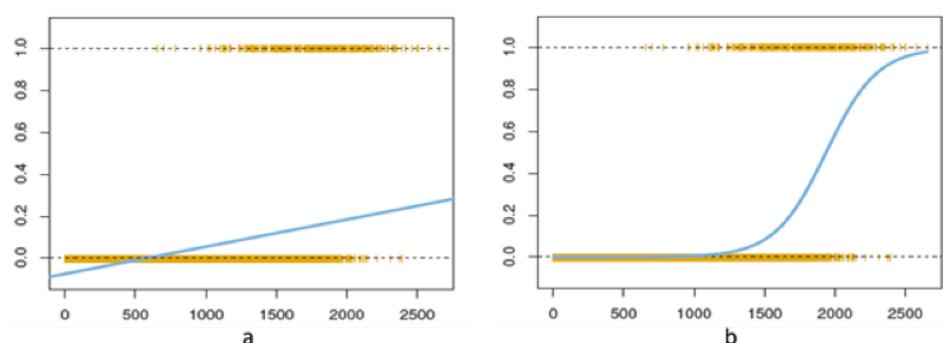
A regressão logística simples se aplica a um conjunto de dados onde o padrão de resposta  $y$  cai em uma entre duas categorias: Sim/Não, Verdadeiro/Falso, Sucesso/Falha, Presença/Ausência, ou, de uma maneira simplificada, 1/0.

Em vez de modelar diretamente a resposta  $y$ , a regressão logística modela a probabilidade de  $y$  pertencer a uma categoria específica, geralmente a positiva, ou seja:

$$p(x) = \Pr(y = 1|x) = \Pr(y = \text{Sim}|x).$$

Se utilizarmos a regressão linear para prever que  $y = 1$ , dado  $x$ , obteremos um modelo linear como o mostrado na Figura 19a: para valores de  $x$  próximos de 0 (zero), será prevista uma probabilidade negativa para  $y$ ; situação semelhante (mas neste caso com previsões maiores do que 1) aconteceria com valores de  $x$  muito grandes.

Esse problema acontecerá sempre que tentarmos ajustar uma linha reta a uma resposta binária: poderemos prever  $p(x) < 0$  para valores pequenos de  $x$ , e  $p(x) > 1$  para valores grandes de  $x$ , a menos que o domínio de  $x$  seja adequadamente limitado.



**Figura 19.** Comparação entre regressão linear (a) e regressão logística (b).

É justamente para evitar esse tipo de problema que modelamos  $p(x)$  através da *função logística*, que fornece saídas entre 0 e 1 para todos os valores de  $x$ :

$$p(x) = \frac{e^{\alpha+\beta x}}{1 + e^{\alpha+\beta x}}.$$

Se utilizarmos a regressão logística para prever que  $y = 1$ , dado  $x$ , obteremos um modelo logístico como o mostrado na Figura 19b: agora, para valores baixos de  $x$ , conseguimos prever uma probabilidade próxima (mas nunca abaixo) de 0 (zero) para  $y$ ; da mesma forma, para valores altos de  $x$ , conseguimos prever uma probabilidade próxima (mas nunca acima) de 1 para  $y$ . A função logística sempre produz uma curva em forma de S, como a mostrada na Figura 19b.

A razão de chances<sup>1</sup> (OR, odd ratio), é dada pela seguinte fórmula:

$$OR = \frac{p(x)}{1 - p(x)} = e^{\alpha+\beta x}.$$

A razão das chances é uma estatística que se tornou muito importante nas pesquisas epidemiológicas e clínicas, porque fornece informações sobre qual abordagem de tratamento tem as melhores chances de beneficiar o paciente. É usada na clínica médica e na epidemiologia como uma medida de associação entre uma exposição a uma variável de interesse (p. ex., vírus, bactéria, radiação, característica de saúde, aspecto da história médica) e um resultado (p. ex., doença ou desordem): ela representa as chances de ocorrência de um resultado em função de uma dada exposição específica, em comparação com as chances de o resultado ocorrer na ausência dessa exposição.

A razão OR é usada para determinar se uma exposição específica é um fator de risco para um determinado resultado, e comparar a magnitude de vários fatores de risco para esse resultado:

- OR = 1 → a exposição não afeta as chances de resultado;
- OR > 1 → a exposição está associada a maiores probabilidades/chances de resultado;
- OR < 1 → a exposição está associada a menores probabilidades/chances de resultado.

Quando tomamos o logaritmo dos dois lados da expressão da razão OR, obtemos o que chamamos de *log-odds* ou *logit*:

$$\log\left(\frac{p(x)}{1 - p(x)}\right) = \alpha + \beta x.$$

Obs.: o modelo da regressão logística possui um *logit* linear em  $x$ .

<sup>1</sup> Segundo o Glossário Inglês-Português de Estatística da Sociedade Portuguesa de Estatística e da Associação Brasileira de Estatística (<http://glossario.spestatistica.pt/>).

Lembremos que, no modelo de regressão linear, o coeficiente  $\beta$  era interpretado como o efeito médio sobre  $y$  de uma unidade de acréscimo sobre  $x$ . Já no modelo de regressão logística, como a relação entre  $p(x)$  e  $x$  não é uma linha reta,  $\beta$  não corresponde à alteração em  $p(x)$  associada a um acréscimo unitário sobre  $x$ . O que temos é que o acréscimo de uma unidade sobre  $x$  altera o *logit* em  $\beta$  unidades, ou, de forma equivalente, multiplica a razão OR por  $e^\beta$ .

Se  $\beta$  for positivo, um acréscimo sobre  $x$  acarretará um acréscimo sobre  $p(x)$ ; e se  $\beta$  for negativo, um acréscimo sobre  $x$  acarretará um decréscimo sobre  $p(x)$ .

Os coeficientes da regressão logística são, em princípio, desconhecidos, e devem ser estimados com base nos dados de treinamento disponíveis, de tal maneira que o modelo logístico se aproxime o máximo possível dos  $n$  pontos observados. Há várias maneiras de medir essa proximidade dos pontos da reta; a mais comumente usada é através do método da *máxima verossimilhança*.

Não entraremos nos detalhes do cálculo matemático da máxima verossimilhança, já que estão além do escopo deste livro, mas o modelo de regressão logística pode ser facilmente ajustado usando algum *software* estatístico livre, como o R, por exemplo.

Podemos mensurar a precisão da estimativa feita para os coeficientes através do cálculo de seus erros-padrão e verificação dos testes de hipótese, como fizemos para a regressão linear.

## 10.2.2 REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA

Usamos a regressão logística múltipla quando queremos prever uma resposta do tipo Sim/Não ou binária a partir de duas ou mais variáveis preditoras, ou seja, quando desejamos saber como as variáveis preditoras afetam a variável de resposta.

Por analogia ao que foi feito para a regressão linear, podemos estender a regressão logística simples à regressão logística múltipla, obtendo as seguintes generalizações para a função logística e a *logit* (ou *log-odds*):

$$p(x) = \frac{e^{\alpha + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_p x_p}}{1 + e^{\alpha + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_p x_p}} \quad ; \quad \log\left(\frac{p(x)}{1 - p(x)}\right) = \alpha + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_p x_p.$$

Os coeficientes da regressão logística múltipla também são estimados por meio do método da máxima verossimilhança; e também podemos mensurar a precisão dessa estimativa através do cálculo de seus erros-padrão e verificação dos testes de hipótese.

Conforme já comentado anteriormente, os epidemiologistas usam muito a regressão múltipla, principalmente a logística, e em particular a razão de chances OR, para estudar variáveis de resposta dependentes, como, p. ex., a probabilidade de um paciente viver/morrer ou de uma vacina fazer/não fazer efeito, ou se os pacientes estão respondendo/não respondendo a algum tratamento. Além disso, como eles estudam pessoas, é muito difícil fazer experimentos bem controlados, então têm que trabalhar com muitas variáveis independentes.

Nesse sentido, o objetivo de aplicação de uma regressão logística múltipla é encontrar uma equação que melhor preveja a probabilidade de um valor da variável dependente de resposta  $y$

como uma função logística das variáveis preditoras independentes  $x$ . Em posse do modelo, o especialista pode utilizá-lo para medir as variáveis preditoras em novos indivíduos e estimar a probabilidade de cada um deles apresentar um valor particular da variável de resposta.

Podemos também usar regressão logística múltipla para entender a relação funcional entre as variáveis preditoras e a variável de resposta, i.e., para avaliar quais variáveis independentes têm um efeito importante sobre a resposta da variável dependente. No entanto, neste caso, é preciso ter muita cautela, principalmente em presença de variáveis de confusão ou correlações entre as variáveis preditoras que deveriam ser independentes.

Os resultados obtidos ao se usar um preditor podem ser bem diferentes daqueles obtidos quando se usam múltiplos preditores, especialmente quando há correlação entre eles. A presença de correlação entre os preditores pode causar problemas quando estamos trabalhando com regressão logística múltipla, pois pode ser difícil separar os efeitos individuais das variáveis preditoras colineares sobre a resposta.

### 10.2.3 LIMITAÇÕES DA REGRESSÃO LOGÍSTICA

A regressão logística simples assume que as observações são independentes e que a relação entre o logaritmo natural da razão de chances OR (*log-odds* ou *logit*) e a variável preditora ( $x$ ) é linear.

Quando as classes ou categorias de classificação estão bem separadas, ou quando o tamanho da amostra ( $n$ ) é pequeno, as estimativas de parâmetros para o modelo de regressão logística podem ficar instáveis.

### 10.3 ORDENAMENTO E REDUÇÃO DE DIMENSÃO

Os modelos lineares vistos até agora possuem vantagens em termos de inferência estatística, além de muitas vezes chegarem a apresentar resultados tão bons quanto os métodos não lineares para problemas advindos de aplicações reais.

Portanto, antes de passar para o mundo dos métodos baseados em árvores, apresentaremos algumas melhorias no modelo linear que substituem o ajuste de mínimos quadrados por alguns procedimentos de ajuste alternativos capazes de produzir melhor predição e interpretabilidade do modelo.

Quando a relação entre a variável de resposta e as variáveis preditoras é, de fato, aproximadamente linear, as estimativas de mínimos quadrados são boas, ou seja, são pouco enviesadas.

Quando  $n \gg p$ , i.e., quando o número de observações é muito maior do que o número de variáveis preditoras, as estimativas dos mínimos quadrados tendem a ter baixa variação e funcionar bem.

Quando  $n$  não é muito maior do que  $p$ , pode haver muita variabilidade no ajuste dos mínimos quadrados, resultando em superposição e, conseqüentemente, previsões ruins em futuras observações não utilizadas durante o treinamento do modelo.

Por fim, no caso extremo em que  $n < p$ , não é possível fazer uma estimativa por meio

dos mínimos quadrados, pois a variância é infinita e o método não pode ser utilizado.

Ao reduzir os coeficientes que necessitam ser estimados, muitas vezes podemos reduzir substancialmente a variância, ao custo de um aumento insignificante no viés. Isso pode levar a melhorias substanciais na precisão com a qual podemos prever respostas futuras para observações não utilizadas durante o treinamento do modelo.

Na prática, algumas variáveis preditoras utilizadas em um modelo de regressão múltipla não têm influência sobre a resposta. Nesse caso, a inclusão dessas variáveis irrelevantes no modelo leva a um aumento de complexidade desnecessário. Ao remover essas variáveis, obtemos um modelo que pode ser mais facilmente interpretado.

Existem algumas formas de fazer essa redução de variáveis, e cada abordagem possui suas vantagens e desvantagens. Veremos dois métodos muito utilizados nas áreas de Biologia, Ecologia e Biotecnologia Marinha: Análise dos Componentes Principais e MDS.

### 10.3.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A *Análise de Componentes Principais* (PCA, *Principal Component Analysis*) é uma técnica muito utilizada em regressão múltipla para a redução de uma grande quantidade de dados, com menor perda possível da informação. É muito usada para geração de indicadores e agrupamento de indivíduos.

O objetivo é reduzir a dimensão da matriz de entrada de dados  $X$  de ordem  $n \times p$  (em que  $n$  é o tamanho da amostra, ou o número de observações, e  $p$  é o número de variáveis preditoras), de forma a redistribuir a variação (variância) observada nos eixos originais e obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados.

A estrutura de interdependência entre as variáveis preditoras da matriz de dados é representada pela matriz de covariância ou pela matriz de correlação. O entendimento dessa estrutura pode se tornar complicado na prática, principalmente quando estamos lidando com uma grande massa de dados.

A PCA consiste, então, em transformar essa estrutura complicada – representada pelas variáveis preditoras originais que são correlacionadas – em uma nova estrutura, representada por novas variáveis que sejam não correlacionadas e com variâncias ordenadas, de tal maneira que seja possível comparar os indivíduos observados usando apenas aquelas novas variáveis que apresentem maior variância.

Normalmente, as características são observadas em unidades de medidas diferentes entre si; nesse caso, a primeira medida consiste em padronizar as variáveis. A padronização mais comumente utilizada é a *Z-score* (vista em 9.2.2.1), que faz com que os dados passem a ter média nula e variância unitária.

A partir dos dados padronizados, montamos a matriz de correlação  $R$  e determinamos os componentes principais de  $R$  a partir da resolução da equação característica:  $\det[R - \mu I] = 0$ , onde  $I$  é a matriz identidade e  $\mu$  é o vetor de autovalores da matriz  $R$ .

Se a matriz  $R$  não apresentar nenhuma coluna que seja combinação linear de outra, a equação  $\det[R - \mu I] = 0$  terá  $p$  raízes,  $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_p$ , chamadas de autovalores ou raízes características da matriz  $R$ , tais que  $\mu_1 > \mu_2 > \dots > \mu_p$ .

Na montagem da matriz de dados  $X$  é importante observar que o valor de  $n$  (indivíduos, observações etc.) deve ser maior do que  $p$ , i.e., pelo menos igual a  $p+1$ , ou seja, se queremos montar um experimento para analisar o comportamento de  $p$  características acerca dos indivíduos de uma população, é recomendado coletar pelo menos  $p+1$  informações.

A cada autovalor  $\mu_i$ ,  $1 \leq i \leq p$ , está associado um autovetor  $\vartheta_i$  de dimensão  $p$ , ou seja,  $\vartheta_i = [\vartheta_{i1} \ \vartheta_{i2} \ \dots \ \vartheta_{ip}]^T$ . Os autovetores  $\vartheta_i$  são normalizados (i.e., a soma dos quadrados dos coeficientes é igual a 1) e ortogonais entre si.

Sendo  $\vartheta_i$  o autovetor correspondente ao autovalor  $\mu_i$ , o  $i$ -ésimo componente principal é dado por:  $\omega_i = \vartheta_{i1}X_1 + \vartheta_{i2}X_2 + \dots + \vartheta_{ip}X_p$ , onde  $X_1, X_2, \dots, X_p$  são as colunas da matriz de dados original  $X$ .

Os componentes principais apresentam as seguintes propriedades:

- A variância do componente principal  $\omega_i$  é igual ao valor do autovalor  $\mu_i$ :  $Var(\omega_i) = \mu_i$ ;
- O primeiro componente principal é o que apresenta maior variância, e assim por diante:  $Var(\omega_1) > Var(\omega_2) > \dots > Var(\omega_p)$ ;
- O total de variância das variáveis originais é igual ao somatório dos autovalores, que, por sua vez, é igual ao total de variância dos componentes principais:  $\sum_{i=1}^p Var(X_i) = \sum_{i=1}^p \mu_i = \sum_{i=1}^p Var(\omega_i)$ ;
- Os componentes principais são não correlacionados entre si:  $Cov(\omega_i, \omega_j) = 0$ .

A contribuição  $C_{\omega_i}$  de cada componente principal  $\omega_i$  costuma ser expressa em porcentagem, e é calculada dividindo-se a variância de  $\omega_i$  pela variância total e multiplicando por 100. Essa contribuição representa a proporção da variância total explicada pelo componente principal  $\omega_i$ :

$$C_{\omega_i} = \frac{Var(\omega_i)}{\sum_{i=1}^p Var(\omega_i)} \cdot 100 = \frac{\mu_i}{\sum_{i=1}^p \mu_i} \cdot 100.$$

A importância de cada componente principal  $\omega_i$  é avaliada por meio de sua contribuição  $C_{\omega_i}$ , ou seja, pela proporção da variância total que é explicada por aquele componente.

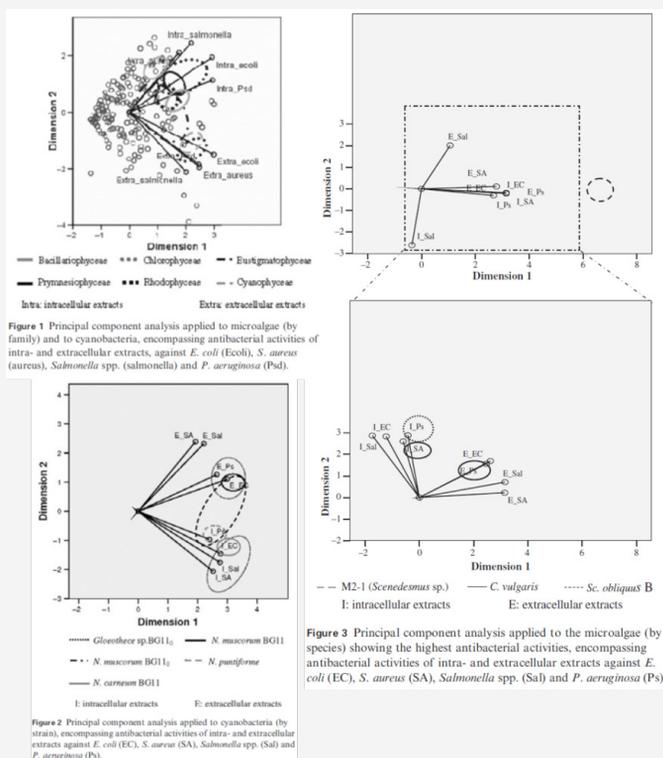
A soma dos  $k$  primeiros autovalores representa a proporção de informação original contida na redução de  $p$  para  $k$ ,  $k < p$ , dimensões. Com base nessa informação, podemos decidir quantos componentes principais utilizaremos na análise, ou seja, quantos componentes serão utilizados para diferenciar os indivíduos coletados originalmente. Não há uma regra geral para a determinação de  $k$ , mas é comum que o número de componentes utilizados seja aquele que represente pelo menos 70% da variância total:

$$\frac{Var(\omega_1) + \dots + Var(\omega_k)}{\sum_{i=1}^k Var(\omega_i)} \cdot 100 \geq 70, k < p.$$

**Exemplo de aplicação da análise de componentes principais (PCA) em biotecnologia marinha**

**Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens:**

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada a um estudo sobre a atividade de treze cianobactérias e doze microalgas contra alguns dos mais importantes agentes patogênicos transmitidos por alimentos: *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A Figura 1 mostra que dois componentes principais poderiam explicar 60% da variabilidade total dentro do conjunto de dados experimental. Através da análise estatística dos dados referentes a esses dois grupos principais de microorganismos, concluiu-se ainda que as cianobactérias possuíam um maior espectro de ação antibacteriana do que microalgas. A Figura 2 mostra uma análise mais refinada das cianobactérias, indicando que *Nostoc* spp. apresentou maior capacidade antibacteriana contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. No que diz respeito às microalgas, a parte superior da Figura 3 mostra que a *Scenedesmus obliquus* (M2-1) foi a microalga que exibiu a maior atividade antibacteriana, levando realmente à inibição total de *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas* sp.; já a parte inferior da Figura 3 mostra que os extratos intracelulares de *S. obliquus* B e *C. vulgaris* também foram eficazes contra *P. aeruginosa*, enquanto os extratos extracelulares de *C. vulgaris* causaram menor inibição de *S. aureus* e *E. coli*.



Fonte: Ana Catarina Guedes, Catarina R. Barbosa, Helena M. Amaro, Cláudia I. Pereira, Francisco Xavier Malcata. Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46, 862–870. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02567.x

### 10.3.2 DIMENSIONAMENTO MULTIDIMENSIONAL NÃO MÉTRICO (NMDS)

O *Dimensionamento Multidimensional* (MDS, *Multidimensional Scaling*) e o *Dimensionamento Multidimensional Não Métrico* (nMDS, *Nonmetric Multidimensional Scaling*) podem ser considerados uma alternativa à análise de componentes principais (PCA).

O objetivo do MDS e do nMDS é detectar dimensões significativas que permitam ao pesquisador explicar semelhanças ou dissimilaridades (distâncias) observadas entre os indivíduos investigados. Dito de outra maneira, o objetivo do MDS e do nMDS é estabelecer um mapa espacial dos dados em que as informações relativas às múltiplas dimensões são colapsadas em apenas algumas dimensões, para que os dados sejam mais facilmente visualizados e interpretados.

Na análise de componentes principais (PCA), as semelhanças entre as variáveis preditoras são expressas na matriz de correlação. No MDS e no nMDS, podemos analisar qualquer tipo de matriz de similaridade ou dissimilaridade, além das matrizes de covariância e correlação.

Quando pensamos em distâncias em um mapa, automaticamente pensamos em distâncias euclidianas. Distâncias euclidianas são mapeadas por meio do método MDS, enquanto distâncias não euclidianas são mapeadas por meio do método nMDS, uma versão não métrica do método MDS, que funciona de maneira similar.

Ao contrário da PCA, que é um método baseado em autovetores, o MDS não maximiza a variabilidade associada aos eixos da ordenação: os eixos MDS são arbitrários, de modo que os gráficos podem ser arbitrariamente girados, centrados ou invertidos. Os motivos para isso se tornarão claros a partir da apresentação do método.

De forma geral, o MDS tenta organizar os dados observados em um espaço com um número específico de dimensões (tipicamente duas ou três dimensões) com o intuito de explicar as distâncias em termos dessas dimensões.

Consideremos uma matriz de distâncias  $D$ , calculada a partir de uma medida adequada aos dados coletados, ou resultante de observações diretas. Essas matrizes podem ser simétricas ou não simétricas. O algoritmo para o dimensionamento multidimensional não métrico (nMDS) da matriz  $D$  pode ser resumido nas seguintes etapas:

1. Escolher o número  $k$  de dimensões que serão utilizadas na ordenação;
2. Construir uma configuração inicial para os pontos em  $k$  dimensões, para ser usada como ponto de partida para o processo de ajuste iterativo das etapas seguintes. A forma como essa configuração inicial é escolhida é crítica para a convergência do algoritmo. Quando os dados são naturalmente espacialmente estruturados e as posições geográficas dos pontos são conhecidas, essas posições geográficas podem ser usadas como a configuração inicial para o MDS de uma matriz  $D$  calculada a partir dos dados. Uma alternativa bastante utilizada consiste em usar como configuração inicial uma ordenação obtida usando a PCA;
3. Calcular a matriz de distâncias ajustadas  $D$  no espaço ordenado, comparando todos os pontos par-a-par. Uma das formas de realizar esse cálculo é a partir das distâncias euclidianas;

4. Comparar as distâncias originais organizadas na matriz  $D$  com as obtidas no ordenamento  $\bar{D}$  a partir de uma regressão (regressão linear, p. ex.). Os valores previstos pela regressão formam a matriz de distâncias  $\bar{D}$ ;
5. Medir a qualidade do ajuste da regressão usando uma função objetivo, que geralmente é chamada de stress. Essa função é baseada na soma das diferenças quadradas entre os valores ajustados  $\bar{D}_{ij}$  e os valores correspondentes  $\hat{D}_{ij}$  previstos pela regressão (critério de mínimos quadrados). A seguinte função objetivo é comumente usada:

$$\text{Stress} = \sqrt{\frac{\sum_{i,j} (\bar{d}_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_{i,j} \bar{d}_{ij}^2}}$$

6. Melhorar a configuração movendo-a ligeiramente na direção de diminuição da função stress através de um método de descida rápida (*steepest descent method*). Essa direção é encontrada através da análise das derivadas parciais da função stress;
7. Repetir as etapas 3 a 6 até que a função objetivo stress atinja um pequeno valor predeterminado (tolerância), ou até que, depois de um certo número de passos, nenhum progresso adicional possa ser feito. As coordenadas calculadas na última passagem pela etapa 6 tornam-se as coordenadas dos  $n$  pontos nas  $k$  dimensões da ordenação de escala multidimensional.

A maioria dos pacotes computacionais que implementam o MDS e o nMDS rotacionam a solução final usando a análise de componentes principais (PCA), para facilitar a interpretação dos resultados.

Geralmente traçamos as novas distâncias para as  $k$  dimensões em relação aos dados de entrada observados (distâncias originais) através do diagrama de Shepard. Esse gráfico mostra as novas distâncias no eixo vertical e as distâncias originais no eixo horizontal.

### **Exemplo de aplicação de dimensionamento multidimensional não métrico (nMDS) em biotecnologia marinha**

#### **The abundance of functional genes, *cbbL*, *nifH*, *amoA* and *apsA*, and bacterial community structure of intertidal soil from Arabian Sea:**

O Golfo do Camboja é uma entrada do Mar da Arábia, localizado ao longo da costa oeste da Índia, caracterizado por altas marés e fortes correntes de água. A região pertence a uma zona semi-árida e os solos alcalinos salinos são considerados biologicamente extremos. O dimensionamento multidimensional não métrico (nMDS) e a análise de componentes principais (PCA) foram aplicados a um estudo sobre as características hostis predominantes do hábitat extremo e das estruturas comunitárias bacterianas do Golfo do Camboja. Os quatro tipos de solo amostrados ( $S_1, S_2, S_3, S_4$ ) foram afetados

pela salinidade, alcalinidade e sodicidade. A estrutura da comunidade microbiana revelou que os solos S<sub>1</sub> e S<sub>3</sub> eram dominados pelo filo Firmicutes, enquanto S<sub>2</sub> e S<sub>4</sub> apresentavam abundância de clones de proteobactérias. Estes solos também apresentavam os clones de Bacteroidetes, Chloroflexi, Actinobacteria, Planctomycetes e Acidobacteria. A filogenia molecular mostrou uma variação significativa na distribuição da comunidade bacteriana entre os tipos de solo (ver Figura 1). O plano de ordenação nMDS com base na distribuição taxonômica ao nível das espécies revelou uma separação dos tipos de solo em extremos (S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>) e moderados (S<sub>3</sub> e S<sub>4</sub>) – ver Figura 2.

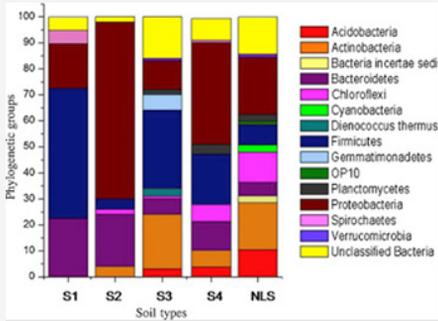


Fig.1

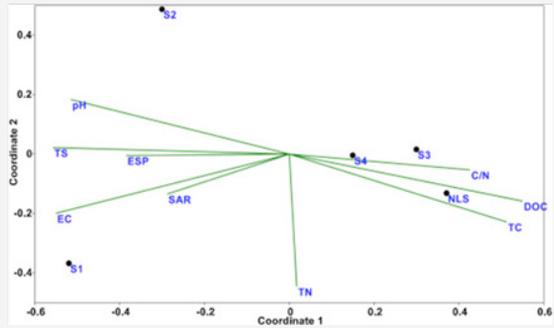


Fig.2

A ordenação PCA das características do solo e a abundância de genes (16S rRNA e genes funcionais) sugeriram que a sodicidade (ESP, SAR), salinidade (EC), pH e TS restringem a abundância bacteriana (16S rRNA), enquanto o DOC e TC favoreceram a abundância em solo. O mesmo padrão também foi observado para a abundância bacteriana de fixação de carbono (cbbL) – ver Figura 3a. A ordenação PCA das características do solo e índices de diversidade sugeriu que EC, pH, ESP, SAR e TS restringem a diversidade bacteriana, enquanto a relação DOC, C / N e TC os favorecem (ver Figura 3b).

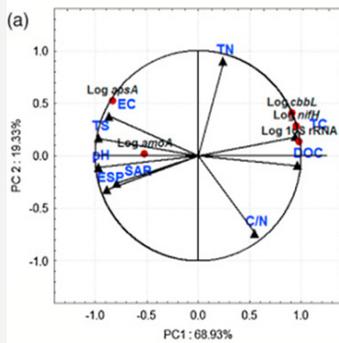


Fig.3a

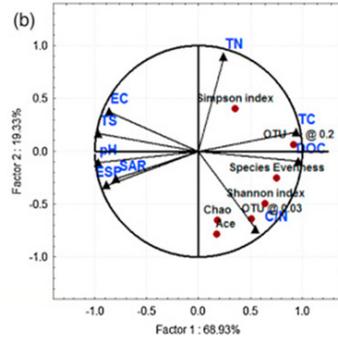


Fig.3b

**Fonte: Jitendra Keshri, Basit Yousof, Avinash Mishra, Bhavanath Jha. The abundance of functional genes, cbbL, nifH, amoA and apsA, and bacterial community structure of intertidal soil from Arabian Sea. Microbiological Research, Vol. 175, 2015, 57-66. doi: 10.1016/j.micres.2015.02.007**

## 10.4 AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO

O *agrupamento hierárquico* provê uma representação gráfica de uma matriz de distâncias que é mais fácil de compreender e interpretar, em que os objetos de estudo são dispostos de forma hierárquica, do mais próximo (o mais parecido) ao mais distante (o mais diferente).

Veremos a seguir o grupamento hierárquico mais utilizado em Biologia Marinha, o *dendograma*.

### 10.4.1 DENDOGRAMA

O método de agrupamento hierárquico dendograma começa a partir de uma matriz de similaridades ou dissimilaridades entre os dados observados.

Dada uma matriz de medição, que costuma ter dimensão cheia, e pode representar, p.ex., o número de espécies em cada amostra, o primeiro passo do método consiste em padronizar os dados e depois calcular a matriz de similaridades/dissimilaridades a partir dessa matriz inicial.

Para transformar a matriz inicial em uma matriz de similaridades/dissimilaridades, precisamos de uma definição de distância entre os objetos/indivíduos amostrados.

Algumas definições de distância entre objetos dependem do tipo dos atributos que estamos avaliando: ordinal, nominal, booleano, intervalar, proporção, etc. As distâncias mais comumente utilizadas são casos particulares da distância de Minkowski: a distância euclidiana

$$\left( d_{ij} = \sqrt{\left( |x_{i1} - x_{j1}|^2 + |x_{i2} - x_{j2}|^2 + \dots + |x_{ip} - x_{jp}|^2 \right)} \right)$$

e a distância de Manhattan

$$\left( d_{ij} = |x_{i1} - x_{j1}| + |x_{i2} - x_{j2}| + \dots + |x_{ip} - x_{jp}| \right).$$

As matrizes de similaridades/dissimilaridades são simétricas, então, em geral, utilizamos a matriz triangular inferior ou a matriz triangular superior.

Uma vez obtida a matriz de similaridades/dissimilaridades, o próximo passo do método de agrupamento hierárquico dendograma consiste em procurar pelo par de amostras que é mais similar/dissimilar entre si, ou seja, as amostras mais próximas/distantes entre si em termos do índice de similaridade/dissimilaridade que se está analisando.

Daí em diante, continuaremos a aplicar esse mesmo raciocínio, porém o próximo passo englobará o cálculo da similaridade/dissimilaridade combinada, ou seja, a similaridade/dissimilaridade entre o par escolhido anteriormente e os demais objetos/indivíduos.

A maneira como esse cálculo é feito é importante, pois determina o tipo de agrupamento hierárquico que pretendemos realizar, e existem várias opções. As mais utilizadas são: (i) aquela em que a similaridade/dissimilaridade entre o par combinado e os demais é a máxima similaridade/dissimilaridade de cada elemento do par em relação aos demais; (ii) aquela em que, a cada etapa do agrupamento, a distância atualizada entre os agrupamentos unidos  $A \cup B$  e um novo agrupamento  $C$  é dada pela média proporcional (ou ponderada) entre as distâncias

$$d_{AC} \text{ e } d_{BC}: d_{(A \cup B),C} = \frac{|A| \cdot d_{AC} + |B| \cdot d_{BC}}{|A| + |B|}$$

Exemplo: Suponhamos que queremos agrupar as amostras *a*, *b*, *c*, *d*, e segundo as distâncias entre elas, que nos são fornecidas na seguinte matriz:

$D_1$	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>
<i>a</i>	0	17	21	31	23
<i>b</i>	17	0	30	34	21
<i>c</i>	21	30	0	28	39
<i>d</i>	31	34	28	0	43
<i>e</i>	23	21	39	43	0

Como nosso objetivo é agrupar segundo as similaridades, e nos foi fornecida uma matriz de distâncias, o par inicial mais similar é o par (A,B), pois apresenta a menor dissimilaridade:  $D_1(A,B) = 17$ .

Comprimento do primeiro ramo do dendograma: seja *u* um nó imaginário ao qual *a* e *b* estão agora conectados. Ao definir a distância  $\delta(a,u) = \delta(b,u) = (D_1(a,b))/2 = 17/2 = 8,5$  garantimos que os elementos *a* e *b* sejam equidistantes de *u* (ver Figura 20).

Primeira atualização da matriz de distâncias: precisamos atualizar a matriz de distâncias, que agora será chamada de  $D_2$  e terá uma linha e uma coluna a menos por causa do agrupamento entre *a* e *b* no passo anterior. Cálculo das novas distâncias  $D_2$  a partir da média proporcional ou ponderada entre as distâncias  $D_1$ :

$$\begin{cases} D_2((a,b),c) = \frac{D_1(a,c) + D_1(b,c)}{2} = \frac{21 + 30}{2} = 25,5 \\ D_2((a,b),d) = \frac{D_1(a,d) + D_1(b,d)}{2} = \frac{31 + 34}{2} = 32,5 \\ D_2((a,b),e) = \frac{D_1(a,e) + D_1(b,e)}{2} = \frac{23 + 21}{2} = 22 \end{cases}$$

$D_2$	( <i>a</i> , <i>b</i> )	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>
( <i>a</i> , <i>b</i> )	0	25,5	32,5	22
<i>c</i>	22,5	0	28	39
<i>d</i>	32,5	28	0	43
<i>e</i>	22	39	43	0

Agora,  $D_2((a,b),e) = 22$  é o menor valor de  $D_2$ , então juntamos o elemento *e* ao agrupamento (*a*,*b*).

Comprimento do segundo ramo do dendograma: seja *v* um nó imaginário ao qual estão agora conectados o par (*a*,*b*) e o elemento *e*. Os ramos unindo *a* ou *b* a *v* e *e* a *v* devem ter o mesmo comprimento:  $\delta(a,v) = \delta(b,v) = \delta(e,v) = D_2((a,b),e)/2 = 22/2 = 11$ , garantindo que (*a*,*b*) e *e* sejam equidistantes de *v*. A distância entre *u* e *v* é o que falta a 8,5 para chegar a 11, ou seja, 2,5 (ver Figura 20).

Segunda atualização da matriz de distâncias: cálculo das novas distâncias  $D_3$  a partir da média proporcional ou ponderada entre as distâncias  $D_2$ :

$$\begin{cases} D_3((a,b),e),c) = \frac{2 \times D_2((a,b),c) + D_2(e,c)}{(2+1)} = \frac{2 \times 25,5 + 39}{3} = 30 \\ D_3((a,b),e),d) = \frac{2 \times D_2((a,b),d) + D_2(e,d)}{(2+1)} = \frac{2 \times 32,5 + 43}{3} = 36 \end{cases}$$

$D_3$	$((a,b),e)$	$c$	$d$
$((a,b),e)$	0	30	36
$c$	30	0	28
$d$	36	28	0

Agora,  $D_3(c,d) = 28$  é o menor valor de  $D_3$ , então juntamos os elementos  $c$  e  $d$ .

Comprimento do terceiro ramo do dendograma: seja  $w$  um nó imaginário unindo os elementos  $c$  e  $d$ . Os ramos unindo  $c$  e  $d$  a  $w$  devem ter o mesmo comprimento:  $\delta(c,w) = \delta(d,w) = 28/2 = 14$ , garantindo que  $c$  e  $d$  sejam equidistantes de  $w$ .

Terceira e última atualização da matriz de distâncias: cálculo das novas distâncias  $D_4$  a partir da média proporcional ou ponderada entre as distâncias  $D_3$ :

$$D_4((c,d),((a,b),e)) = \frac{D_3(c,((a,b),e)) + D_3(d,((a,b),e))}{(1+1)} = \frac{30 + 36}{2} = 33$$

$D_4$	$((a,b),e)$	$(c,d)$
$((a,b),e)$	0	33
$(c,d)$	33	0

Dessa forma, juntamos os agrupamentos  $((a,b),e)$  e  $(c,d)$ . Seja  $r$  um nó imaginário unindo os agrupamentos  $((a,b),e)$  e  $(c,d)$ . Os ramos unindo  $((a,b),e)$  e  $(c,d)$  a  $r$  devem ter o mesmo comprimento:  $\delta(((a,b),e),r) = \delta(c,d,r) = 33/2 = 16,5$ , garantindo que  $c((a,b),e)$  e  $(c,d)$  sejam equidistantes de  $r$ .

A distância entre  $v$  e  $r$  é o que falta a 11 para chegar a 16,5, i.e., 5,5; e a distância entre  $w$  e  $r$  é o que falta a 14 para chegar a 16,5, i.e., 2,5 (ver Figura 20):

$$\begin{cases} \delta(v,r) = \delta(((a,b),e),r) - \delta(e,v) = 16,5 - 11 = 5,5 \\ \delta(w,r) = \delta((c,d),r) - \delta(c,w) = 16,5 - 14 = 2,5 \end{cases}$$

O dendograma está completo agora; sua raiz é o nó  $r$ , o nó mais profundo em relação aos elementos iniciais.

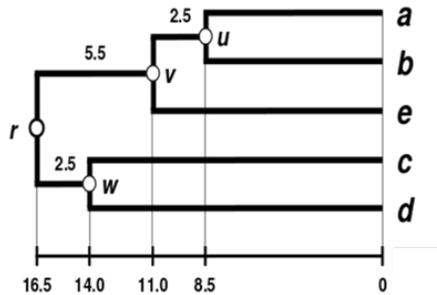
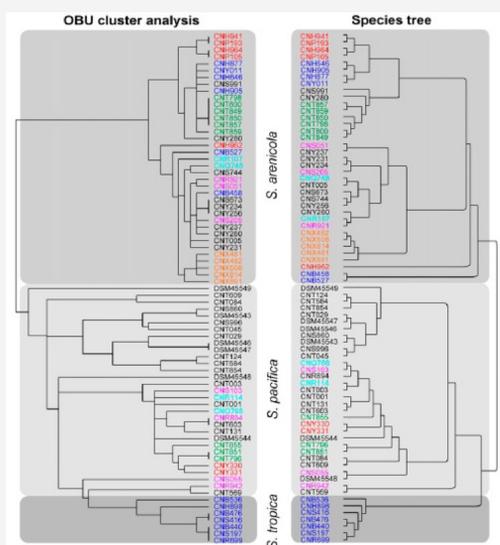


Figura 20. Exemplo de dendograma.

## Exemplo de aplicação de dendograma em biotecnologia marinha

### Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*

Os produtos naturais microbianos são uma das principais fontes de novos fármacos, mas os esforços de descoberta são limitados pela falta de informação que descreva a diversidade e as distribuições das vias biossintéticas associadas entre as bactérias. Usando o gênero de actinomicetos marinhos *Salinispora* como modelo, os autores analisaram os dados da sequência do genoma de 75 cepas, estreitamente relacionadas, para verificar os caminhos associados à poliestioide e à biossíntese de peptídios não tumorais, cujos produtos derivados integram alguns dos medicamentos mais importantes de hoje. Os resultados forneceram evidências de níveis elevados de diversidade de caminhos, sendo a maioria adquirida relativamente recentemente na evolução do gênero. As distribuições e as histórias evolutivas desses caminhos fornecem informações sobre os mecanismos que geram a nova diversidade química e as estratégias usadas por bactérias para maximizar sua capacidade de nível populacional para produzir diversos metabólitos secundários. A imagem a seguir mostra o agrupamento hierárquico para a filogenia de espécies gerada a partir de 10 genes. As cores indicam o site de coleta: azul, Bahamas; rosa, Palau; preto, Fiji; vermelho, Mar de Cortez; laranja, Palmyra; turquesa, Guam; verde, Hawaii.



**Fonte:** Nadine Ziemert, Anna Lechner, Matthias Wietz, Natalie Millán-Aguinaga, Krystle L. Chavarria, Paul Robert Jensen. Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. *PNAS*, Vol. 111, No. 12, 2014, E1130–E1139, doi: 10.1073/pnas.1324161111

## 10.5 MÉTODOS BASEADOS EM ÁRVORES DE DECISÃO

Os dados biológicos/ecológicos são, em geral, complexos, desbalanceados, contêm valores faltantes e as relações entre as variáveis podem ser fortemente não lineares. Por isso, muitas vezes as técnicas de modelagem estatística de uso comum não conseguem encontrar padrões biológicos/ecológicos significativos a partir desses dados.

Apesar dessas dificuldades, os métodos de modelagem estatística devem ser simples de entender e dar resultados facilmente interpretáveis.

Nesse sentido, as *árvores de decisão* são técnicas estatísticas modernas ideais para explorar e modelar esse tipo de dados, pois representam formas robustas e, ao mesmo tempo, flexíveis de análise. Elas são capazes de explicar a variação de uma variável de resposta, que pode ser categórica (árvores de classificação) ou numérica (árvores de regressão), a partir de uma ou mais variáveis preditoras/explicativas, que podem ser categóricas e/ou numéricas.

Árvores de decisão utilizam um treinamento supervisionado para a classificação e previsão de dados. Em outras palavras, em sua construção é utilizado um conjunto de treinamento formado por entradas (observações de teste) e saídas (classes ou respostas médias).

A estratégia que embasa a criação das árvores de decisão é a estratégia de dividir para conquistar: um problema complexo é decomposto em subproblemas mais simples e, recursivamente, esta técnica é aplicada a cada subproblema.

As árvores explicam a variação de uma única variável de resposta dividindo repetidamente os dados em grupos mais homogêneos, usando combinações de variáveis preditoras/explicativas que podem ser categóricas ou numéricas. Cada grupo é caracterizado por um valor típico da variável de resposta, o número de observações no grupo e os valores das variáveis explicativas que o definem.

As vantagens das árvores de decisão incluem: (i) sua representação gráfica, que ajuda na exploração, compreensão e interpretação dos dados; (ii) flexibilidade para lidar com uma ampla gama de tipos de resposta, incluindo dados numéricos, categóricos, de classificação e de sobrevivência; (iii) facilidade de construção; (iii) capacidade de lidar com valores faltantes tanto na resposta como nas variáveis preditoras/explicativas.

As principais desvantagens das árvores de decisão são: (i) o *overfitting*: o sobreajuste do modelo ao conjunto de dados. Isso acontece sempre que a árvore estende a sua profundidade até ao ponto de classificar individualmente todos os indivíduos do conjunto de dados de treino, reduzindo a sua capacidade de generalização. Para contornar esse problema, são utilizadas técnicas de poda, que permitem detectar e excluir sub-árvores do modelo, com o objetivo de melhorar a taxa de acerto de novas observações; (ii) a falta de robustez ou a alta variância: às vezes, pequenas alterações nos dados de entrada podem causar grandes variações nas árvores finais.

Dessa forma, as árvores complementam ou representam uma alternativa a muitas técnicas estatísticas tradicionais, incluindo as vistas anteriormente: regressão múltipla, análise de variância, regressão logística.

### 10.5.1 ÁRVORES DE REGRESSÃO

De maneira simplificada, podemos pensar que há duas etapas no processo de construção de uma árvore de regressão:

1. Dividimos o espaço preditor, i.e., o conjunto de valores possíveis para  $x_1, x_2, \dots, x_p$ , em  $J$  regiões distintas e não sobrepostas:  $R_1, R_2, \dots, R_j$ ;
2. Para todas as observações que caírem na região  $R_j$ , fazemos a mesma previsão: a média

dos valores de resposta para as observações de treinamento em  $R_j$ .

Na etapa 1, em princípio, as regiões  $R_1, R_2, \dots, R_j$  podem ter qualquer forma. No exemplo a seguir, o espaço preditor será dividido em formato de retângulos, por simplicidade e pela facilidade de interpretação do modelo preditivo resultante.

O objetivo é encontrar, então, retângulos  $R_1, R_2, \dots, R_j$  que minimizem o RSS:

$$RSS = \sum_{j=1}^J \sum_{i \in R_j} (y_i - \hat{y}_{R_j})^2,$$

em que  $\hat{y}_{R_j}$  é a média dos valores de resposta para as observações de treinamento do retângulo  $R_j$ .

Em biologia, ecologia e biotecnologia marinha, a divisão mais utilizada é a divisão *binária recursiva*, procedimento conhecido popularmente como “binagem”: um método do tipo *top-down*, hierárquico, recursivo, binário e guloso.

A binagem é um método (i) *top-down* e hierárquico, porque se traduz em uma estrutura hierárquica, em forma de árvore, que se desenvolve a partir da raiz (ponto em que todas as observações pertencem a uma única região) em direção às folhas; (ii) recursivo, porque em cada nó o procedimento de binagem é reaplicado; (iii) binário, porque a cada nó divide (separa) o espaço preditor através da criação de dois novos ramos disjuntos; (iv) guloso, porque é “miópe”, ou seja, em cada etapa do processo de construção da árvore, a melhor divisão para aquele passo é feita olhando apenas para aquele passo, sem olhar para a frente e escolher uma divisão que pudesse levar a uma árvore melhor em algum passo futuro.

Para realizar a binagem, consideramos todos os preditores  $x_1, x_2, \dots, x_p$  e todos os valores possíveis do ponto de corte  $s$  para cada um dos preditores  $e$ , em seguida, escolhemos o preditor  $e$  e o ponto de corte de modo que a árvore resultante tenha o RSS mais baixo.

O ponto de corte  $s$  divide o espaço preditor nas regiões:

$$R_2(j, s) = \{x|x_j > s\} \text{ (ou } R_1(j, s) = \{x|x_j < s\} \text{ e } R_2(j, s) = \{x|x_j \geq s\}).$$

Buscamos, então, os valores de  $j$  e  $s$  que minimizem:

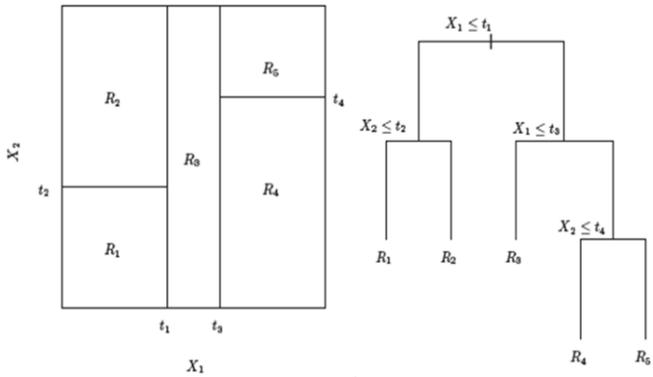
$$\sum_{i: x_i \in R_1(j,s)} (y_i - \hat{y}_{R_1})^2 + \sum_{i: x_i \in R_2(j,s)} (y_i - \hat{y}_{R_2})^2,$$

em que  $\hat{y}_{R_1}$  é a média dos valores de resposta para as observações de treinamento do retângulo  $R_1(j, s)$ ; e que  $\hat{y}_{R_2}$  é a média dos valores de resposta para as observações de treinamento do retângulo  $R_2(j, s)$ . Esse processo, em geral, pode ser feito de maneira razoavelmente rápida.

Em seguida, repetimos o processo, procurando o melhor preditor e melhor ponto de corte para dividir os dados de forma a minimizar o RSS dentro cada uma das regiões resultantes.

No entanto, desta vez, em vez de dividir todo o espaço de previsão, dividimos uma das regiões anteriormente identificadas. E assim sucessivamente, até que um critério de parada seja alcançado, p.ex., até que nenhuma região contenha mais do que  $\tau$  (previamente estipulado) observações.

Uma vez que as regiões  $R_1, R_2, \dots, R_j$  tenham sido criadas, prevemos a resposta para uma determinada observação de teste usando a média das observações de treinamento da região à qual pertence essa observação de teste. Um exemplo de binagem com cinco regiões é mostrado na Figura 21.



**Figura 21.** Exemplo de árvore de regressão.

### 10.5.2 ÁRVORES DE CLASSIFICAÇÃO

Uma árvore de classificação é muito semelhante a uma árvore de regressão; a diferença é que ela é usada para prever uma resposta qualitativa e não quantitativa.

Vimos que, para uma árvore de regressão, a resposta prevista para uma determinada observação de teste é dada pela *resposta média* das observações de treinamento da região à qual pertence essa observação de teste.

De forma diferente, para uma árvore de classificação, a previsão é de que cada observação de teste pertencerá à *classe mais comum* de observações de treinamento na região à qual pertence essa observação de teste.

O procedimento usado para a criação de uma árvore de classificação é bem semelhante ao procedimento utilizado anteriormente para a árvore de regressão: a divisão binária recursiva, popularmente conhecida como “binagem”.

No entanto, na criação da árvore de classificação, não faz sentido utilizar o RSS como critério para fazer as divisões binárias. Uma alternativa natural ao RSS é a taxa de erro de classificação.

Uma vez que planejamos atribuir uma observação de teste, pertencente a uma determinada região, à classe mais comum de observações de treinamento nessa região, a maneira mais intuitiva de medir a taxa de erro de classificação seria através da proporção das observações de treino dessa região que não pertencem a essa classe mais comum, ou seja:  $E = 1 - \max_k (\hat{p}_{mk})$ , em que  $\hat{p}_{mk}$  representa a proporção de observações de treinamento da  $m$ -ésima região pertencentes à classe  $k$ .

Na prática, apesar de intuitivo, o erro de classificação  $E = 1 - \max_k (\hat{p}_{mk})$  costuma não funcionar muito bem, e há outras medidas que são muito mais utilizadas: o índice Gini e a entropia de Shannon.

O índice Gini mede o grau de heterogeneidade dos dados:

$$G = 1 - \sum_{k=1}^K \hat{p}_{mk}^2 .$$

Notemos que o índice Gini  $G$  assumirá um valor pequeno sempre que as proporções  $p_{mk}$  forem próximas de uma unidade, ou seja, sempre que a proporção de observações de treinamento da  $m$ -ésima região pertencentes à classe  $k$  estiver próxima de 1.

Portanto,  $G$  nulo implica que a região  $m$  é pura (contém predominantemente observações de uma única classe); e, conforme  $G$  se aproxima de uma unidade, a região  $m$  fica mais impura (aumenta o número de classes uniformemente distribuídas nessa região). Por esse motivo, o índice Gini  $G$  é conhecido como uma medida da pureza/impureza da região  $m$ .

A entropia de Shannon também mede o grau de heterogeneidade dos dados:

$$E_{Shannon} = - \sum_{k=1}^K \hat{p}_{mk} \log_2 \hat{p}_{mk} .$$

A entropia de Shannon também é uma medida da pureza/impureza da região  $m$ : valores de  $E_{Shannon}$  próximos a zero indicam que  $m$  é mais pura; e valores de  $E_{Shannon}$  próximos a uma unidade indicam que  $m$  é mais impura.

Ao construir uma árvore de classificação, costumamos usar o índice de Gini ou a entropia de Shannon para fazer as divisões a partir dos nós pais, uma vez que essas duas medidas são mais sensíveis à pureza dos nós (ou ao grau de heterogeneidade dos dados) do que a taxa de erro de classificação. Qualquer dessas três medidas pode ser usada na poda da árvore, quando esta cresce muito.

Dentre os algoritmos disponíveis para a construção de árvores de classificação e regressão, um dos mais utilizados é o algoritmo CART (*classification and regression trees*), proposto em 1984 por Breiman, Friedman, Olshen e Stone.

Na prática, como devemos decidir entre usar a regressão linear ou logística ou as árvores de regressão ou classificação? Se a relação entre os preditores e a resposta for bem aproximada por um modelo linear, então uma abordagem como a regressão linear ou a regressão logística provavelmente funcionará bem, e poderá até superar o desempenho de um método baseado em árvore, que não explora essa estrutura linear. Se, por outro lado, existir uma relação altamente não linear e complexa entre os preditores e a resposta, as árvores de decisão costumam superar as abordagens clássicas.

Infelizmente, as árvores de regressão e decisão geralmente não possuem o mesmo nível de previsão das regressões linear e logística. Conforme mencionado anteriormente, essas árvores costumam sofrer com o sobreajuste do modelo ao conjunto de dados (*overfitting*) e com a falta de robustez (alta variância).

Felizmente, ao agregar várias árvores de decisão, usando métodos como ensacamento (*bagging*), florestas aleatórias (*random forests*) e crescimento progressivo (*boosting*), o desempenho preditivo das árvores pode ser substancialmente melhorado. Esses métodos usam as árvores como blocos de construção para elaborar modelos de previsão mais poderosos.

### 10.5.3 ÁRVORES ENSACADAS (BAGGING TREES)

Conforme comentado anteriormente, as árvores de regressão e classificação sofrem de alta variância. Por exemplo, se dividimos os dados de treinamento em duas partes ao acaso, e geramos uma árvore de decisão para cada metade, os resultados que obtemos podem ser bastante diferentes.

O método do ensacamento (*bagging*) é um procedimento desenvolvido para reduzir a variância das árvores de decisão.

Relembremos que, em um conjunto com  $n$  observações independentes, cada uma com variância  $\sigma^2$ , a variância da média das observações é dada por  $\sigma^2/n$ . Daí surge uma maneira natural de reduzir a variância e, portanto, aumentar a precisão de previsão das árvores de decisão: a partir da população inicial de observações, gerar  $B$  conjuntos de treinamento separados, aplicar o modelo de predição a cada conjunto em separado e depois calcular a média das previsões.

Quando não dispomos de vários conjuntos de treinamento, podemos aplicar um método de reamostragem, como, por exemplo, o *Bootstrap*, que gera amostras repetidas a partir de um único conjunto de dados de treinamento (observações).

Para aplicar o ensacamento (*bagging*) para árvores de regressão, construímos  $B$  árvores de regressão usando  $B$  conjuntos de treinamento separados (se não os tivermos, os geramos via *Bootstrap*) e, em seguida, tomamos a média das previsões resultantes. Essas árvores costumam ser profundas se não forem podadas; logo, cada árvore individual possui variância alta, mas tendência (*bias*) baixa. Portanto, ao tomar a média das previsões dessas  $B$  árvores, reduzimos a variância.

Para aplicar o ensacamento (*bagging*) para árvores de classificação, registramos a classe prevista por cada uma das  $B$  árvores e tomamos o voto majoritário, ou seja, tomamos como previsão geral a classe mais escolhida (a mais comum) entre as  $B$  previsões realizadas.

O número  $B$  de árvores não é um parâmetro crítico para o ensacamento (*bagging*). Usar valores muito grandes de  $B$  não costuma levar à sobrestimação. Na prática, usamos um valor de  $B$  suficientemente grande para que o erro se estabeleça, em geral algo entre 100 e 150 árvores.

### 10.5.4 FLORESTAS ALEATÓRIAS (RANDOM FORESTS)

As florestas aleatórias (*random forests*) são consideradas um refinamento das árvores ensacadas (*bagging trees*), pois proporcionam uma melhoria de predição em relação às árvores ensacadas, por meio de um pequeno ajuste que descorrelaciona as árvores envolvidas no processo.

Assim como no procedimento de ensacamento (*bagging*), no processo de geração das florestas aleatórias (*random forests*) são construídas várias árvores de decisão a partir de amostras de treinamento geradas através da aplicação de um procedimento de *Bootstrap* sobre as observações originais.

A diferença está no processo de construção das árvores de decisão: a cada vez que uma divisão em uma árvore é considerada, uma amostra aleatória de  $m$  preditores do conjunto completo de  $p$  preditores é escolhida como candidatos para a divisão. A divisão deve, então,

selecionar apenas um desses  $m$  preditores. Uma nova amostra de  $m$  preditores é escolhida a cada divisão. Portanto, a menos que uma semente aleatória seja configurada inicialmente, os modelos finais serão ligeiramente diferentes cada vez que forem executados.

A motivação por trás das árvores aleatórias é a de descorrelacionar as árvores envolvidas no processo: suponhamos que no conjunto de dados haja um preditor muito forte e outros preditores moderadamente fortes. Então, na coleção de árvores ensacadas, a grande maioria (ou todas) das árvores de decisão usará esse forte preditor na divisão superior. Consequentemente, todas as árvores ensacadas acabarão sendo bastante parecidas entre si, e as previsões derivadas dessas árvores serão altamente correlacionadas. Isso é um problema, porque a média de variâncias, nesse caso, não levará a uma grande redução de variância do conjunto de árvores ensacadas.

As florestas aleatórias superam esse problema forçando cada divisão em uma árvore a considerar apenas  $m$  preditores do conjunto completo de  $p$  preditores. Ao fazer isso, em média  $(p-m)/p$  das divisões não considerará o preditor mais forte, e outros preditores terão mais chances.

Ao injetar aleatoriedade dessa maneira, as correlações entre as previsões das árvores individuais são reduzidas, e isso, por sua vez, reduz a variância do modelo preditivo único. Além disso, por se reduzir o número de preditores usados em cada divisão, há uma considerável economia computacional.

A principal diferença entre as árvores ensacadas (*bagging trees*) e as florestas aleatórias (*random forests*) está na escolha do tamanho do subconjunto preditor  $m$ . Se uma floresta aleatória for construída usando  $m = p$  preditores, ela será equivalente a uma árvore ensacada.

Geralmente usamos um pequeno valor de  $m$  na construção de uma floresta aleatória quando temos um grande número de preditores correlacionados. Na prática, o que costuma funcionar bem é  $m \approx \sqrt{p}$ , ou seja, o número  $m$  de preditores considerados a cada divisão é aproximadamente igual à raiz quadrada do número total  $p$  de preditores.

### 10.5.5 ÁRVORES DE CRESCIMENTO PROGRESSIVO (*BOOSTING TREES*)

Agora veremos as árvores de crescimento progressivo (*boosting trees*), mais uma abordagem para melhorar as previsões resultantes de uma árvore de classificação de regressão.

Conforme vimos anteriormente, no método de ensacamento (*bagging*), o conjunto de dados original é multiplicado, através da aplicação do método de *Bootstrap*, depois uma árvore de decisão é ajustada a cada novo conjunto de dados e, em seguida, todas as árvores são combinadas para criar um único modelo preditivo, que possuirá a variância substancialmente reduzida caso as árvores não sejam muito correlacionadas.

O método de crescimento progressivo (*boosting*) funciona de forma semelhante, entretanto há duas diferenças essenciais: (i) as árvores aumentam de forma sequencial e gradual: cada árvore cresce usando informações das árvores criadas previamente; (ii) não é usado um procedimento do tipo *Bootstrap*, apesar de cada árvore crescer a partir de uma versão modificada do conjunto de dados original.

A grande diferença reside no fato de que o método de crescimento progressivo, em vez

de gerar uma única árvore de decisão grande para os dados, aprende lentamente. O modelo final pode ser entendido como um modelo de regressão aditiva em que os termos individuais são árvores simples, montadas de forma transitória e gradual.

Apesar de os modelos de *boosting* serem complexos, seu desempenho preditivo é superior aos métodos de *bagging* e *random forests*.

No *boosting*, as árvores de decisão são ajustadas iterativamente aos dados de treinamento, de forma gradual, para aumentar a ênfase nas observações que foram mal modeladas pela coleção de árvores corrente. Os algoritmos de *boosting* variam em relação ao modo como eles quantificam a falta de ajuste e selecionam as configurações para a próxima iteração. Os primeiros algoritmos de *boosting* foram desenvolvidos para problemas de classificação com apenas duas classes.

O *boosting* para as árvores de classificação é bem mais complexo, então focaremos na explicação do método de *boosting* para árvores de regressão, conhecido na literatura como BRT (*boosting regression tree*).

Para problemas de regressão, BRT é um método de “descida via gradiente”. Consideremos uma função de perda – no nosso caso, uma função que representa (que mede) a perda de desempenho preditivo devido a um modelo subótimo. O BRT é uma técnica de otimização para minimizar a função de perda, adicionando, em cada etapa, uma nova árvore que melhora (reduz) a função de perda. A primeira árvore de regressão é aquela que, para o selecionado tamanho de árvore, reduz ao máximo a função de perda. Para cada passo seguinte, o foco está nos resíduos, ou seja, na variação da resposta que até então não é explicada pelo modelo.

No segundo passo, uma árvore é ajustada aos resíduos da primeira árvore, e a segunda árvore pode conter variáveis e pontos de divisão bem diferentes em relação à primeira árvore.

O modelo é então atualizado para conter duas árvores (dois termos), e os resíduos desse modelo de dois termos são calculados, e assim por diante.

O processo é gradual, o que significa que as árvores preexistentes permanecem inalteradas à medida que o modelo é ampliado: somente o valor ajustado para cada observação é reestimado em cada etapa para refletir a contribuição da árvore recém-adicionada.

O modelo BRT final é uma combinação linear de muitas árvores (geralmente de centenas a milhares de árvores), ou seja, ele pode ser pensado como um modelo de regressão onde cada termo é uma árvore.

O processo de construção da BRT funciona melhor quando ele se move lentamente na direção de descida derivada do gradiente. Nesse sentido, costuma-se controlar a contribuição de cada árvore através uma taxa de aprendizado, que é substancialmente inferior a uma unidade (similar ao tamanho de passo nos métodos do tipo gradiente e subgradiente em otimização).

Os valores ajustados do modelo final são calculados como a soma de todas as árvores multiplicadas pela taxa de aprendizagem, e são muito mais estáveis e precisos do que aqueles provenientes de um modelo de árvore de decisão única.

Os modelos BRT podem ser adaptados a uma grande variedade de tipos de resposta: gaussiana, Poisson, binomial etc. Além disso, o processo de construção das BRT é um processo estocástico, i.e., inclui um componente aleatório ou probabilístico. A estocasticidade melhora o desempenho preditivo, reduzindo a variância do modelo final. Assim como nas florestas ale-

atórias, apenas um subconjunto aleatório de dados é utilizado para ajustar cada nova árvore. Portanto, conforme já comentado para as florestas aleatórias, a menos que uma semente aleatória seja configurada inicialmente, os modelos finais serão ligeiramente diferentes cada vez que forem executados.

A previsão de um modelo BRT é direta, mas a interpretação requer ferramentas para identificar quais variáveis e interações são importantes e para visualizar as funções ajustadas. O modelo conta com a definição de três parâmetros importantes de ajuste: (i) o número  $B$  de árvores que serão geradas; (ii) a taxa de aprendizagem  $\lambda$  (tipicamente  $\lambda = 0,01$  ou  $\lambda = 0,001$ ), também conhecida como parâmetro de encolhimento, que determina a contribuição de cada árvore para o modelo e (iii) o número  $d$  de divisões em cada árvore, que controla a complexidade da árvore: parâmetro  $d$  é conhecido como a profundidade de iteração da árvore, uma vez que as divisões  $d$  podem envolver no máximo  $d$  variáveis.

Para determinar o número  $B$  de árvores geralmente usamos um procedimento do tipo *cross-validation*:

Algoritmo para a determinação de  $B$  - *Boosting Regression Tree*:

1. Divida aleatoriamente os dados disponíveis em  $n$  subconjuntos (tipicamente  $n = 10$ );
2. Construa  $n$  conjuntos distintos de treinamento, cada um compreendendo uma combinação única de  $n - 1$  subconjuntos. Dessa forma, para cada conjunto de teste, existe um único subconjunto que foi omitido e é usado para validação;
3. Comece com um conjunto inicial de  $\tilde{B}$  árvores ( $\tilde{B}$  em torno de 50), e desenvolva  $n$  modelos BRT simultaneamente em cada conjunto de treinamento, e teste o desempenho preditivo de cada um sobre o respectivo conjunto de validação omitido no passo anterior. Calcule o desempenho médio e os erros-padrão;
4. Aumente o número de árvores em cada modelo ( $\tilde{B} \leftarrow \tilde{B} + \tau$ ) e repita o passo 3;
5. Repita 10 vezes o passo 4 e, então, compare o desempenho preditivo das iterações 6 a 10 contra as iterações 1 a 5. Quando o desempenho médio das últimas iterações for maior do que o desempenho médio das iterações anteriores,  $\tilde{B}$  estará ok; PARE e retorne  $\tilde{B}$ .

A seguir, o algoritmo para a geração da árvore de regressão BRT.

Algoritmo BRT - *Boosting Regression Tree*:

1. Inicialize  $\hat{f}(x) = 0$  e  $r_i = y_i$  para cada  $i$  no conjunto de treinamento;
2. Para  $b = 1, 2, \dots, B$  repita:
  - a. Ajustar uma árvore  $\hat{f}^b$  com  $d$  divisões ( $d + 1$  nós terminais) aos dados de treinamento  $(X, r)$ ;
  - b. Atualizar  $\hat{f}$  adicionando uma versão encolhida da nova árvore:

c. Atualize os resíduos:

$$\hat{f}(x) \leftarrow \hat{f}(x) + \lambda \hat{f}^b(x).$$

3. Retorne o modelo BRT:

$$r_i \leftarrow r_i - \lambda \hat{f}^b(x_i).$$

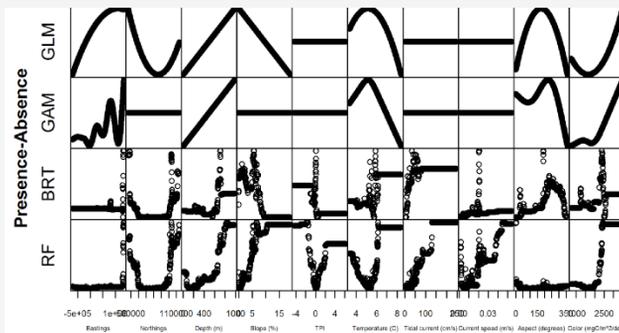
A capacidade de previsão da BRT é bem superior à das florestas aleatórias, e ainda bem maior do que a das *bagging trees*. O intuito aqui foi dar uma ideia de como se constroem as BRTs. Há softwares livres, como o R, por exemplo, que constrói as BRTs.

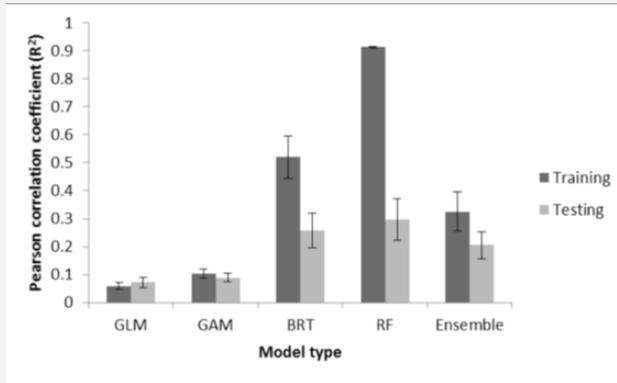
$$\hat{f}(x) = \sum_{b=1}^B \lambda \hat{f}^b(x).$$

**Exemplo de aplicação de random forests e boosting regression trees em biotecnologia marinha**

**Comparison of modeling methods to predict the spatial distribution of deep-sea coral and sponge in the Gulf of Alaska**

Os ecossistemas de corais e esponjas de águas profundas estão presentes nas águas marinhas do Alasca e estão associados a muitas espécies diferentes de peixes e invertebrados. Esses ecossistemas são vulneráveis aos efeitos das atividades comerciais de pesca e mudanças climáticas. Os autores compararam quatro modelos de distribuição de espécies comumente usados em ecologia (modelos lineares gerais, modelos aditivos generalizados, *boosted regression trees* e floresta aleatória) para prever a presença ou ausência e a abundância de seis grupos de invertebrados bentônicos no Golfo do Alasca. Concluíram que os quatro tipos de modelo tiveram desempenho adequado nos dados de treinamento para prever dados de presença e ausência, sendo que os modelos de regressão de florestas tiveram o melhor desempenho geral. Para os dados de abundância, houve uma grande diferença no desempenho entre os dois métodos baseados em regressão (modelos lineares gerais e modelos aditivos generalizados) e os modelos baseados em árvores. Os modelos baseados em BRT e floresta aleatória se sobrepuseram aos outros modelos por uma ampla margem, tanto nos dados de treinamento quanto nos dados de validação. No entanto, houve uma queda significativa no desempenho para todos os modelos de abundância de invertebrados (~ 50%) quando se mudou dos dados de treino para os dados de validação.





Fonte: Christopher N. Rooper, Mark Zimmermann, Megan M. Prescott. Comparison of modeling methods to predict the spatial distribution of deep-sea coral and sponge in the Gulf of Alaska. *Deep-Sea Research, Part I*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2017.07.002>

## 11 | CONCLUSÕES

As pesquisas em biotecnologia marinha envolvem a análise e o tratamento de uma quantidade gigantesca de dados e demandam a utilização de ferramentas estatísticas poderosas para examinar esses dados e interpretar os resultados dos estudos.

Neste capítulo vimos algumas das ferramentas estatísticas mais poderosas usadas atualmente para os estudos em biotecnologia marinha.

## REFERÊNCIAS

Greenacre, M.; Primicerio, R. (2013) **Multivariate Analysis of Ecological Data**. Fundación BBVA, España.  
Legendre, P.; Legendre, L. (1998) **Numerical Ecology**: Second English Edition. Elsevier, Amsterdam.  
The R Project for Statistical Computing: <https://www.r-project.org/>





# PRODUÇÃO DE MICROALGAS MARINHAS E O CONCEITO DE BIORREFINARIA

Paulo Cesar Abreu<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande

## RESUMO

Microalgas marinhas possuem um enorme potencial econômico como fonte de biomassa para a produção de alimentos, rações, remédios, produtos químicos e biocombustíveis. A composição química das microalgas marinhas é comparável com a da soja, contendo altos níveis de proteínas. O teor médio de lipídeos pode chegar até a 70% do peso seco, caracterizando-se como uma importante fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel. Entre os ácidos graxos produzidos pelas microalgas, os poli-insaturados das famílias  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 são de particular interesse, como, por exemplo, os ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA; C20:5) e docosahexaenoico (DHA; C22:6), que possuem efeitos benéficos no combate a diversas doenças e subnutrição. Além disso, as microalgas marinhas produzem carboidratos como amido, glicose e outros polissacarídeos de alta digestibilidade, além de vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico), sendo indicadas para alimentação de animais e seres humanos. Os pigmentos presentes nesses micro-organismos com ação antioxidante, como clorofila, carotenoides (astaxantina e fucoxantina) e ficobiliproteínas (ficocianina e ficoeritrina), são empregados na coloração de alimentos e como fármacos, e também no emagrecimento em pessoas obesas. O cultivo em larga escala das microalgas marinhas é hoje uma realidade, o que garante a produção de uma matéria-prima que pode ter emprego nas indústrias farmacêutica e de alimento, sendo a produtividade desses cultivos muito maior do que a de plantas terrestres. Além disso, as microalgas podem ser cultivadas em águas utilizadas como esgotos domésticos e industriais, realizando a depuração desses efluentes. O conceito de biorrefinaria permite desenvolver processos acoplados e integrados de extração de diferentes bioelementos produzidos pelas microalgas, podendo levar a um processo de grande rentabilidade.

# 1 | INTRODUÇÃO

Imaginemos uma máquina avançada capaz de absorver a energia solar que chega ao planeta e armazená-la na forma de várias substâncias que, em última análise, vão abastecer outros organismos incapazes de fazer esse processo de conversão de energia luminosa em energia química. Da mesma forma, os elementos produzidos ricos em energia podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis para motores a explosão, produzindo diversos tipos de trabalho. Ao utilizar a energia contida nos elementos, os organismos, e também os motores a explosão, decompõem as substâncias que foram sintetizadas em seus elementos mais simples, que serão novamente utilizados pela máquina que absorve energia solar para formar matéria-prima, onde a energia é novamente armazenada.

Esse seria um processo cíclico, que pode se manter indefinidamente enquanto houver energia solar e elementos para a síntese de material energético. Essa visão é bastante diferente da realidade de hoje, em que a energia é obtida de matéria-prima fóssil, enterrada a muitos metros de profundidade. É fato que a energia contida em combustíveis fósseis, como o petróleo e o carvão, também tem origem solar, incorporada a essas substâncias milhões de anos atrás, e posteriormente soterradas. O grande problema é que o uso de combustíveis fósseis traz para a superfície e para a atmosfera do planeta elementos que não estavam em circulação. Por exemplo, o uso do combustível fóssil faz aumentar significativamente a concentração de um poderoso gás de “efeito estufa”, o dióxido de carbono. Esse gás cobre o planeta com um “manto” e acaba retendo grande parte da energia solar que antes era refletida de volta ao espaço. A consequência disso é o aumento da temperatura média do nosso planeta, causando grandes mudanças climáticas que, por sua vez, resultam em desastres ambientais como enchentes, elevação do nível do mar, que provocam sérios problemas sociais, econômicos, ambientais e à saúde humana.

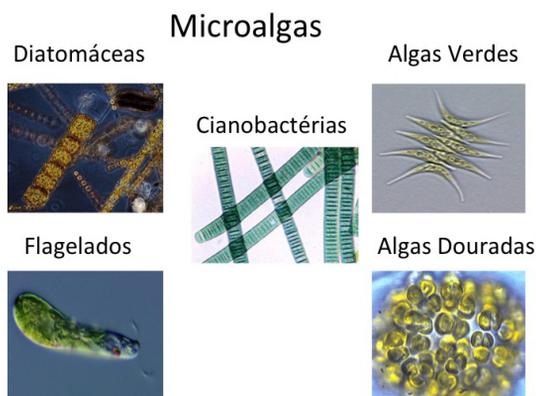
Mas voltemos à nossa máquina perfeita de captura de energia e que funciona baseada na circulação contínua de elementos. Na verdade, essa máquina já existe e se chama “organismo autotrófico clorofilado”, que é também uma bela maneira de nos referirmos aos vegetais que realizam a fotossíntese, esse processo mágico de captura de energia solar e armazenamento desta em substâncias orgânicas, que são fontes para os biocombustíveis (Nelson; Cox, 2006). Hoje em dia, vegetais como a cana-de-açúcar, o milho e a soja já são largamente empregados na produção de biocombustíveis. A cana-de-açúcar e o milho são utilizados há décadas na produção do etanol, empregado em veículos automotores, seja na sua forma pura, ou misturado à gasolina. No Brasil, a gasolina vendida nos postos recebe mais de 20% de etanol, e nosso país é um exemplo, com o uso da tecnologia “Flex”, de motores que podem utilizar álcool e gasolina em diferentes proporções. Outra grande evolução foi o uso do óleo de soja para a produção de biodiesel, que hoje é misturado ao diesel de petróleo em pequenas, mas crescentes, proporções (5 a 10%).

Além de ser uma grande economia para o país, a produção de etanol e biodiesel repre-

senta os primeiros passos para o uso sustentável de combustíveis que imaginamos no começo deste texto e que, no futuro, fará diminuir os efeitos deletérios do aquecimento global causado pelo uso de combustíveis fósseis.

Certo, mas vamos continuar imaginando. Pensemos agora em um “superorganismo autotrófico clorofilado”, com capacidade de produção muito maior e mais rápida do que a cana-de-açúcar, milho ou soja, gerando, em dias, a mesma biomassa que esses vegetais superiores levam meses para produzir. Além disso, esse organismo não precisa de terras aráveis para crescer, mas apenas de água. E a água utilizada para o seu crescimento pode ser salgada, que não tem uso agrícola. Por último, imaginemos que esse superorganismo pode utilizar esgotos domésticos e industriais como fontes de nutrientes. Ao utilizar efluentes para produção de biomassa, o superorganismo também realiza a limpeza, ou depuração, do próprio efluente, que pode ser posteriormente despejado em corpos de água sem causar impactos ambientais como a eutrofização acelerada e a produção de áreas com pouco ou nenhum oxigênio.

O mais interessante é que esse “superorganismo autotrófico clorofilado” é, na verdade, um micro-organismo, isto é, devido às suas diminutas dimensões não se pode observá-lo a olho nu, mas sim com o auxílio de instrumentos óticos de magnificação, como microscópios e lupas. Diferentemente dos vegetais superiores como soja, milho e cana-de-açúcar, os micro-organismos autotróficos não têm raiz, caule ou folhas, sendo apenas células, eucariotas ou procariotas, que vivem em suspensão na coluna de água. Esses micro-organismos recebem a denominação geral de MICROALGAS. Portanto, microalgas são organismos autotróficos clorofilados, unicelulares, proto- ou eucariotas, que habitam a zona eufótica dos corpos de água e retiram nutrientes diretamente da água circundante. Esses micro-organismos apresentam uma enorme variedade taxonômica, com diferentes tamanhos, formas e composição bioquímica (Figura 1).



**Figura 1.** Diferentes grupos de microalgas. Fotos obtidas nna internet.

## 2 | COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS

As microalgas apresentam uma composição média de 5 a 50% de proteína, 20 a 40%

de carboidratos e 10 a 30% de lipídeos. Todos esses valores se referem ao percentual da biomassa seca. Além disso, existem outros elementos presentes em menores quantidades, como pigmentos (1%), vitaminas e sais minerais (Lourenço, 2006). Muitos desses elementos presentes em baixas concentrações têm alto preço de mercado, pois apresentam ações terapêuticas no combate a doenças e também são usados como nutracêuticos, ou elementos para cosméticos. Falaremos mais sobre esses elementos no item “Bioelementos”, abaixo.

A composição bioquímica das microalgas varia de acordo com a espécie, fase de crescimento e condições de cultivo, entre outros fatores. Condições estressantes para o crescimento das microalgas, como excesso ou falta de luz, poucos nutrientes e temperaturas extremas, podem ser empregadas para produzir algum desses elementos em maior quantidade. Por exemplo, a restrição de nutrientes, especialmente nitrogenados, faz com que as microalgas diminuam sua taxa de crescimento e comecem a produzir substâncias de reserva como lipídeos e carboidratos para serem utilizados como fonte de energia para um novo crescimento, quando as condições ambientais se tornam mais favoráveis.

A maior concentração de proteína celular é uma clara indicação de que as microalgas são principalmente utilizadas como fonte de alimentos em todos os ambientes aquáticos, representando a base da cadeia alimentar desses ecossistemas. Por outro lado, substâncias de reserva como lipídeos e carboidratos podem ser empregadas na produção de biocombustíveis como o álcool e o biodiesel, a exemplo da cana-de-açúcar, milho e soja.

### 3 | BIOCOMBUSTÍVEIS

As duas principais substâncias de reserva produzidas pelas microalgas, carboidratos e lipídeos, podem ser empregadas diretamente, e de forma sustentável/reciclável, na produção de biocombustíveis para motores a explosão, que predominam nos dias de hoje. Entretanto, além desses biocombustíveis, as microalgas podem ainda fornecer outros combustíveis como biogás e hidrogênio (Gupta et al., 2017).

A produção de biogás, especialmente o metano, pode ser obtida através da decomposição anaeróbica da biomassa produzida pelas microalgas. Esse seria um dos biocombustíveis mais baratos e pode ser produzido a partir da biomassa remanescente após a extração de outros elementos como carboidrato e lipídeo, bem como substâncias com valor nutricional e farmacêutico. Além disso, após a produção do biogás, o material remanescente nos biodigestores pode ser empregado como biofertilizante, pois ainda contém grandes concentrações de macronutrientes, como nitrogênio, fósforo e sais minerais.

A produção de hidrogênio, por outro lado, é mais complexa e, por isso, mais difícil de obter em larga escala. A energia produzida pelos organismos vivos começa pelo estabelecimento, nas bactérias (e nas mitocôndrias em organismos superiores), de um sistema de transformação de energia chamado força próton-motora (Nelson; Cox, 2006). Nesse processo, uma substância reduzida, ou seja, com elétrons sobrando, doa esses elétrons a outros compostos químicos distribuídos na membrana celular. A transferência de elétrons ocorre entre compostos com

diferentes potenciais redox (capacidade de retirar ou doar elétrons), sendo que o elétron doado pela substância reduzida é finalmente capturado por um elemento com o maior potencial redox, também chamado de aceptor final de elétrons. Durante as transferências de elétrons entre elementos ocorre a eliminação de hidrogênio ( $H^+$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ) para diferentes lados da membrana. A grande concentração de hidrogênio e hidroxilas em lados opostos da membrana faz com que haja uma diferença de potencial, isto é, uma energia potencial que, em última análise, é transferida para elementos químicos como a adenosina di-fosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi), formando adenosina tri-fosfato (ATP), que é a moeda energética de qualquer organismo vivo. Esse processo de transferência de energia potencial é feito através da ação de uma enzima, a ATP sintase, que permite, de forma controlada, a junção de hidrogênio e hidroxila que estão em lados diferentes da membrana, direcionando a energia dessa reação para a formação do ATP.

Entretanto, a ação de algumas enzimas como a hidrogenase e nitrogenase pode gerar hidrogênios livres, que são liberados diretamente no meio que circunda a célula, não sendo utilizado para a formação de ATP. O hidrogênio também pode ser produzido através de processos químicos como pirólise e gaseificação, que extraem o hidrogênio diretamente da biomassa de microalgas. O hidrogênio produzido naturalmente, ou por processos químicos, pode ser coletado e utilizado para produzir energia ao se ligar ao oxigênio atmosférico. O melhor desse biocombustível é que o produto final dessa reação é apenas água e energia. Por isso, este é considerado o combustível do futuro.

Para a realidade brasileira dos dias de hoje, combustíveis renováveis como álcool e biodiesel atenderiam melhor às necessidades energéticas de nossa sociedade, uma vez que existe em nosso país tecnologia disponível para a produção, armazenamento e distribuição desses combustíveis. Dessa forma, a produção de lipídeos e carboidratos pelas microalgas teria o maior potencial para uso imediato como biodiesel e álcool, respectivamente.

A concentração média de carboidratos nas microalgas (20 a 40% do peso seco) é similar à da cana-de-açúcar (40 a 50% do peso seco). Porém, é pouco provável que a produção de microalgas possa substituir em curto ou médio prazo a cana-de-açúcar, cuja tecnologia de produção vem sendo desenvolvida desde os anos 1970.

Da mesma forma, os lipídeos produzidos pelas microalgas representam uma fonte de grande potencial para a produção de biodiesel, especialmente por seu elevado potencial de produção. Isso pode ser visto na Tabela 1, onde a produção de óleo de algumas espécies de microalgas é comparada com várias plantas oleaginosas.

Como se pode verificar na tabela, a produção de óleo pelas microalgas é uma das mais altas. Além disso, há aquelas vantagens já citadas – como a não necessidade de terras aráveis e a possibilidade de usar água salgada para a produção das microalgas. Mas, se é assim, por que ainda é pequeno o número de veículos movidos a biodiesel de microalgas?

Apesar desse enorme potencial, a produção de microalgas enfrenta hoje várias limitações. Dentre estas podemos destacar a falta de sistemas de produção adequados para geração de milhões de litros de cultivo, necessários para produzir biomassa suficiente para atender ao mercado de biocombustíveis. Hoje em dia as microalgas podem ser produzidas em sistemas fechados, como os fotobiorreatores (Figura 2) e sistemas abertos, como tanques (Figura 3). Os

**Tabela 1.** Produção potencial de óleo combustível de diferentes plantas oleaginosas e de três espécies de microalgas. O cálculo de produção de óleo baseou-se na concentração de lipídeo nos grãos e nas células (percentual do peso seco) e na produtividade por hectare e por ano. (Adaptado de Faupel e Kurki, 2002)

FONTE	NOME CIENTÍFICO	PRODUÇÃO (KG ÓLEO.HA <sup>-1</sup> ANO <sup>-1</sup> )
Milho	<i>Zea mays</i>	145
Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i>	273
Soja	<i>Glycine max</i>	375
Café	<i>Coffea arabica</i>	386
Linhaça	<i>Linum usitatissimum</i>	402
Arroz	<i>Oriza sativa</i> L.	696
Tungue	<i>Aleurites fordii</i>	790
Girassol	<i>Helianthus annuus</i>	800
Canola	<i>Brassica napus</i>	1000
Oliva	<i>Olea europea</i>	1019
Mamona	<i>Ricinus communis</i>	1188
Jojoba	<i>Simmondsia chinensis</i>	1528
Pequi	<i>Caryocar brasiliensis</i>	3142
Palma (dendê)	<i>Elaeis guineensis</i>	5000
Microalga	<i>Nannochloropsis oculata</i>	1700-3200
Microalga	<i>Skeletonema costatum</i>	2100-4400
Microalga	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	7700-16500

sistemas fechados são os que apresentam os maiores níveis de produção, pois permitem um maior nível de controle das variáveis ambientais e, principalmente, não ocorre a contaminação da cultura por outras microalgas, ou por seus predadores, como ciliados e rotíferos. Entretanto, a confecção, operacionalização e manutenção de fotobiorreatores de grandes volumes é bastante onerosa, por isso são indicados, principalmente, para a produção de derivados de microalgas com alto valor comercial.



**Figura 2.** Fotobiorreator utilizado no Laboratório de Produção de Microalgas da Estação Marinha de Aquicultura - FURG.



**Figura 3.** Tanques circulares utilizados no Laboratório de Produção de Microalgas da Estação Marinha de Aquicultura - FURG.

Os sistemas abertos, por outro lado, são bem mais baratos e permitem o escalonamento, atingindo facilmente tanques com 50.000 litros, ou mais, de cultura. Porém, esses sistemas são instalados em locais abertos, o que dificulta o controle de variáveis como temperatura e até mesmo salinidade, pois estão sujeitos a evaporação intensa e entrada de água de chuva. Além disso, o fato de serem sistemas abertos faz com que estejam mais sujeitos à entrada de organismos invasores (contaminação), o que pode levar à perda de toda a produção em questão de dias.

Outro problema que precisa ser equacionado com relação à produção de microalgas é a colheita da biomassa produzida. Por terem tamanho diminuto e estarem diluídas em grandes volumes de água, a retirada das microalgas do meio de cultivo é um processo trabalhoso e caro. As metodologias mais eficientes empregadas hoje em dia para a coleta das microalgas são a filtração e a centrifugação. Ambos os processos são muito eficientes, mas extremamente caros, pois consomem muita energia. Muitas vezes a energia gasta para retirar as microalgas da água por esses processos é maior do que a energia que se poderá utilizar do carboidrato ou lipídeo produzido pelas microalgas coletadas. Nesse caso, temos um processo cujo balanço energético é negativo, o que não se justifica economicamente.

A floculação, seguida da sedimentação ou flotação das microalgas é, talvez, o processo com maior potencial para colheita de grande quantidade de microalgas do meio de cultura. Essa tecnologia baseia-se na adição de um eletrólito que anula as cargas negativas das microalgas e estabelece “pontes” entre estas, permitindo que se juntem formando flocos. Posteriormente esses flocos podem sedimentar, ou flutuar até a superfície da água, permitindo, em ambos os casos, a coleta da biomassa produzida. Apesar de ser uma técnica barata, a floculação ainda apresenta muitos problemas técnicos que precisam ser solucionados. Por exemplo, fatores como salinidade, pH e até mesmo a matéria orgânica dissolvida produzida pelas próprias microalgas podem diminuir a eficiência dos flocculantes, fazendo com que, muitas vezes, o processo seja ineficiente.

Já os processos de extração de lipídeo e produção de biodiesel estão razoavelmente desenvolvidos para as microalgas, não sendo estes uma barreira para a produção em larga escala de biodiesel.

Em vista desses e de outros problemas é que cálculos mais otimistas mostram que a produção de biodiesel a partir de microalgas custaria hoje cerca de US\$10 por litro, o que é totalmente inviável do ponto de vista econômico, especialmente se lembrarmos que o litro do diesel de petróleo custa menos de US\$1. Portanto, a produção em grande escala de biocombustíveis a partir de microalgas só será possível quando se conseguir otimizar e baratear todas as fases de produção de microalgas. Por outro lado, as microalgas produzem elementos de química fina que têm elevado valor de mercado e poderiam ser produzidos juntamente com os biocombustíveis, agregando valor a todo o processo de produção. Esse é o conceito da “biorrefinaria”, que passaremos a explicar a seguir.

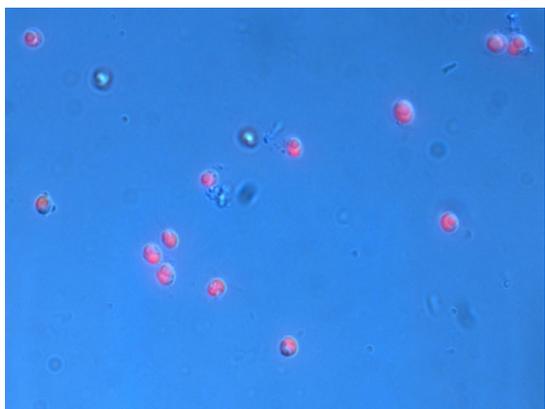
## 4

## O CONCEITO DE BIORREFINARIA

O que é uma refinaria? Originalmente o conceito de refinaria refere-se ao processo de refinar ou depurar algum material bruto, gerando vários elementos. Esse conceito pode ser aplicado ao refino do açúcar mascavo, do qual derivam diferentes tipos de açúcar refinado, ou do petróleo, que gera vários produtos – combustíveis (gasolina, diesel, querosene de aviação, gás de cozinha), óleos lubrificantes, ceras e até mesmo insumos para outras indústrias como plásticos, fertilizantes etc. O importante nesse processo é que o conjunto dos elementos produzidos gera muito mais valor do que a produção de um único elemento. Esse mesmo conceito pode ser aplicado à biomassa de microalgas num processo denominado biorrefinaria.

Biorrefinaria, portanto, é um conjunto de processos integrados capazes de extrair diferentes elementos a partir da biomassa de um organismo produzido em larga escala. No caso das microalgas, além da obtenção de lipídeos e carboidratos utilizados para a produção de bio-combustíveis, outros elementos de alto valor comercial, como proteínas, ácidos graxos, pigmentos, poderiam ser gerados, aumentando a diversidade da produção e também os ganhos. Para melhor entendermos esse conceito aplicado às microalgas, vamos tomar como exemplo o potencial de produção de lipídeos e ácidos graxos pela microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*.

*Nannochloropsis oceanica* é uma microalga marinha do grupo das Eustigmatofíceas. Apresenta células esféricas e de pequeno tamanho (3-5 $\mu$ m)(Figura 4). Essa e outras espécies do gênero são empregadas como alimento vivo para rotíferos e até mesmo juvenis de peixes e crustáceos. Além de apresentar crescimento rápido e grande rusticidade, essa microalga tem elevado conteúdo de lipídeo, podendo chegar até a 40% da biomassa seca, o que despertou interesse para a produção de biodiesel.



**Figura 4.** Microfotografia de *Nannochloropsis oceanica* (Luz + UV). As regiões marcadas em vermelho brilhante mostram os cloroplastos e o brilho da clorofila a produzido pela exposição a radiação ultra-violeta (microscópio Zeiss Axioplan – aumento final 1000x)(Foto: Paulo Cesar Abreu).

O lipídeo da *N. oceanica* tem uma composição diferenciada de ácidos graxos, como pode ser visto na Tabela 2. Cada ácido graxo descrito na tabela é representado pela notação CX:Y, em que X representa o número de carbonos na cadeia e Y o número de duplas ligações. Portanto, o ácido graxo C16:0 (hexadecanoico) tem uma cadeia com 16 carbonos e nenhuma dupla ligação, sendo, portanto, um ácido graxo saturado. Por outro lado, o ácido graxo hexadecenoico (C16:1) tem também 16 carbonos, mas uma dupla ligação, por isso é considerado um ácido graxo mono-insaturado. Ácidos graxos com mais de duas duplas ligações são chamados de poli-insaturados.

Como mencionado anteriormente, a alta produtividade e o elevado teor de lipídeo faz de *N. oceanica* um forte candidato a fornecedor de matéria-prima para a produção de biodiesel. Entretanto, a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, compondo cerca de 40% do total de ácidos graxos, faz com que o biodiesel produzido a partir dessa fonte seja de baixa qualidade, pois apresenta grande potencial de oxidação. Por outro lado, esses mesmos ácidos graxos poli-insaturados representam uma importante fonte de elementos com potencial uso nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

Por exemplo, na tabela 2 verifica-se que o ácido graxo poli-insaturado presente em maior quantidade é o eicosapentaenoico (EPA)(C20:5). Trata-se de um ácido ômega-3, que tem importante ação clínica, reduzindo processos inflamatórios e também atuando na redução do colesterol ruim. Por isso, o EPA pode ser utilizado como medicamento e também como nutracêutico, cujo consumo previne a ocorrência de doenças coronarianas e inflamatórias. Para se ter uma ideia da importância desse ácido graxo, basta dizer que 1g desse elemento purificado custa hoje em dia mais de US\$20.000, que é um valor muito superior aos US\$10 que seriam pagos por um litro de biodiesel de microalgas.

**Tabela 2.** Perfil de ácidos graxos da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*. Valores apresentados como percentual do lipídeo total. [Dados não publicados]

	ÁCIDO GRAXO	DESIGNAÇÃO	% LIPÍDEO
Saturados	C14:0	Mirístico	3,9
	C15:0	Pentadecanoico	1,8
	C16:0	Hexadecanoico	20,5
	C17:0	Heptadecanoico	1,1
	C18:0	Octadecanoico	1,8
Monoinsaturados	C14:1	Tetradecenoico	0,2
	C16:1	Hexadecenoico	25,2
	C18:1	Octadecenoico	4,1
Poli-insaturados	C16:2	Hexadecadienoico	0,8
	C16:3	Hexadecatrienoico	0,6
	C18:2	Octadecadienoico	2,2
	C18:3	Octadecatrienoico	0,9
	C18:4	Octadecatetraenoico	0,1
	C20:2	Eicosadienoico	0,1
	C20:3	Eicosatrienoico	0,3
	C20:4	Eicosatetraenoico	5,3
	C20:5	Eicosapentaenoico (EPA)	29,7

Fica claro, portanto, que a produção de EPA, mesmo em menor quantidade, geraria muito mais valor do que a produção de biodiesel. Assim, de acordo com o conceito de biorrefinaria, a mesma produção de microalgas poderia ser direcionada não só para a geração de biodiesel, mas também para a produção de ácidos graxos poli-insaturados, que têm amplo uso nas indústrias alimentícia e farmacêutica e que têm maior valor comercial. O mesmo conceito é válido para outros elementos produzidos pelas microalgas, como pigmentos, substâncias antioxidantes e açúcares, que também têm elevado valor de mercado. Porém, para que isso ocorra, é necessário não só resolver os “gargalos” tecnológicos da produção e colheita de microalgas, mas também desenvolver sistemas integrados de extração e produção de diferentes bioelementos produzidos pelas microalgas.

## 5 | BIOELEMENTOS

As microalgas produzem uma série de elementos considerados de “química fina” que têm muitas aplicações industriais e que podem beneficiar significativamente a saúde humana, animal e ambiental (Larsen et al., 2011). A seguir apresentamos alguns exemplos desses elementos que podem ser produzidos a partir da biomassa de microalgas.

### 5.1 ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídeos são moléculas orgânicas, insolúveis em água, que, nas células, têm função de reserva energética e também estrutural, como os fosfolipídeos, que formam as membranas celulares. Em geral os lipídeos são formados por ácidos graxos e um álcool, como glicerol. Os ácidos graxos são classificados de acordo com o número de duplas ligações (ou insaturações) presentes em suas cadeias. Dessa forma temos os ácidos graxos saturados, sem duplas ligações. Estes estão em maior quantidade nas gorduras e têm como característica se solidificarem a temperaturas mais baixas. O outro grupo de ácidos graxos é o dos insaturados, característico dos óleos, que apresentam diferentes números de duplas ligações, sendo, por isso, classificados como mono- e poli-insaturados. Entre os ácidos graxos poli-insaturados encontram-se os ômega-3 e ômega-6, que têm grande importância para a saúde humana, com ação anti-inflamatória, prevenção de doenças coronarianas e até mesmo ação no cérebro, podendo atuar na prevenção e controle de doenças como o Alzheimer.

Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, como o eicosapentaenoico (EPA) (C20:5) e o docosehexaenoico (DHA) (C22:6), são obtidos através do consumo de peixe, ou óleo de peixe, de água fria. Entretanto, estes são produzidos em grande quantidade por microalgas, que servem de alimento a peixes como sardinha e salmão. Assim, a produção de microalgas pode se tornar uma fonte para o fornecimento desses ácidos graxos essenciais mais importante do que o próprio pescado.

## 5.2 PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

Grande parte da biomassa das microalgas (até 50% de seu peso seco) é composta por proteínas, e estas podem ser facilmente extraídas das microalgas. Além disso, as microalgas produzem muitos aminoácidos essenciais, isto é, que não são produzidos pelo corpo humano. Dessa forma, seu consumo é importante para o crescimento e manutenção da biomassa corporal. Além disso, peptídeos, pequenos pedaços de proteínas resultantes da digestão incompleta da proteína, podem ter ação contra a hipertensão arterial e propriedades antioxidantes.

Mais importante é que, considerando-se a demanda crescente de proteínas para atender as necessidades da população humana, a disponibilidade de uma fonte de fácil produção como as microalgas pode ser a garantia futura de combate à fome.

## 5.3 AÇÚCARES

Polissacarídeos são substâncias de reserva energética produzidas pelas microalgas especialmente quando o crescimento destas diminui devido a limitações de nutrientes ou de luz. Os açúcares, que podem atingir até 40% do peso seco das microalgas, têm potencial uso para a produção de álcool combustível, mas também ação terapêutica antilipídêmica, antioxidante e estimulante do sistema imunológico. Além disso, muitos polissacarídeos estão sendo usados na produção de polímeros para a fabricação de bioplásticos e elementos terapêuticos para a recuperação de queimaduras.

## 5.4 PIGMENTOS

A clorofila *a* é o principal pigmento dos organismos autotróficos para a produção de substâncias energéticas através da fotossíntese. Além deste, outros pigmentos, como carotenoides e ficobilinas, também conhecidos como pigmentos antena, auxiliam na captação de energia solar, permitindo a realização da fotossíntese mesmo em condições de pouca luz.

Do ponto de vista comercial, os pigmentos têm larga aplicação – e alto preço – como corantes na indústria alimentícia. A clorofila, por exemplo, pode atingir o preço de US\$400 por miligrama. Outros pigmentos, como a astaxantina, têm comprovadamente uso medicinal, com ação anticâncer, antioxidante e anti-inflamatória, também apresentando elevado valor de mercado.

## 5.5 VITAMINAS E MINERAIS

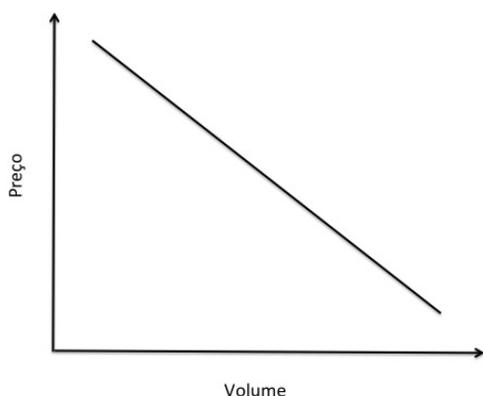
Apesar de presentes em menor quantidade, as microalgas podem fornecer muitos elementos como vitaminas e minerais que são essenciais para o desenvolvimento humano e de muitos animais. Por exemplo, as microalgas podem fornecer vitamina D, que tem grande importância no processo de incorporação de cálcio nos ossos.

Outros elementos importantes que podem ser fornecidos pelas microalgas são o iodo e o selênio. A falta de iodo na alimentação pode provocar problemas de saúde como o bócio,

abortos prematuros, até mesmo acelerar o mal de Parkinson. O selênio, além de participar como cofator de algumas enzimas, tem também efeito antioxidante e estimula o sistema imunológico.

## 6 | CONCLUSÕES

O sonho de se ter hoje um sistema de geração de energia renovável e sustentável a partir da produção de microalgas é inviável, devido ao alto custo de produção da biomassa e extração de elementos como lipídeo e açúcar. Entretanto, é possível que num futuro próximo se solucionem os problemas tecnológicos que encarecem a produção desses micro-organismos, mas isso depende de investimento contínuo e de grande porte nos próximos anos, que permita o desenvolvimento de tecnologias de produção, colheita da biomassa e produção de biocombustíveis a baixos custos (Figura 5).



**Figura 5.** Relação entre preço e volume dos bio-produtos gerados pelas microalgas.

Por outro lado, se aplicarmos hoje o conceito de biorrefinaria, isto é, desenvolver processos acoplados e integrados de extração de diferentes bioelementos produzidos pelas microalgas, poderemos tornar a produção desses micro-organismos um processo de grande rentabilidade em curto prazo. Seria, portanto, necessário o desenvolvimento de sistemas de produção que permitam a extração de elementos de alto valor mas presentes em pequena quantidade, e também aqueles de menor valor comercial mas que compõem a maior parte da biomassa das microalgas.

## REFERÊNCIAS

Faupel, K.; Kurki, A. (2002) **Biodiesel: a brief overview**. ATTRA (Appropriate Technology Transfer for Rural Areas). Disponível em: <<http://attra.ncat.org/attra-pub/biodiesel.html>>.

Gupta, S.K.; Malik, A.; Bux, F. (Eds.) (2017) Algal biofuels. **Recent advances and future prospects**. Springer Int. Publ.

Larsen, R.; Eilertsen, K.-E.; Elvevoll, E. (2011) Health benefits of marine foods and ingredients. **Biotechnol. Adv.** 29: 508-518.

Lourenço, S.O. (2006). **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2006) **Lehninger. Principles of biochemistry**. 4th ed. W. H. Freeman and Company, New York.



# MACROALGAS E TERPENÓIDES MARINHOS

Renato Crespo Pereira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal Fluminense

## RESUMO

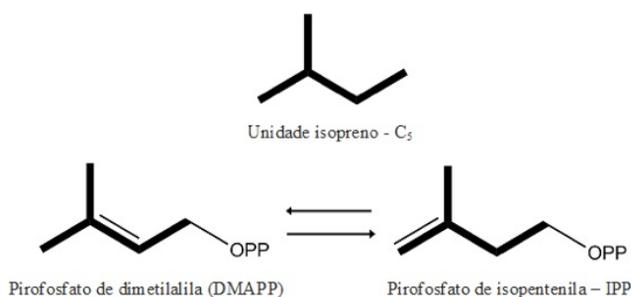
Os terpenos são os principais tipos de metabólitos secundários encontrados em macroalgas marinhas; são produzidos como respostas adaptativas destes organismos aos diferentes nichos que ocupam no ambiente marinho. Diversos desses metabólitos exibem funções ecológicas vitais e também são alvos de grande interesse como potenciais agentes terapêuticos para diferentes doenças, ou mesmo outros usos biotecnológicos como anti-incrustantes, por exemplo. Este capítulo foi organizado com intuito de ressaltar esse potencial, através de uma caracterização geral dos terpenóides de macroalgas marinhas, seu potencial biotecnológico e os desafios que são necessários e prementes para que sejam alcançados novos patamares na bioprospecção marinha. São também apresentados aspectos práticos, sem grande aprofundamento ou fundamentação teórica, sobre procedimentos gerais de laboratório e analíticos para o isolamento e a identificação de metabólitos secundários marinhos.

# 1 | TERPENOS

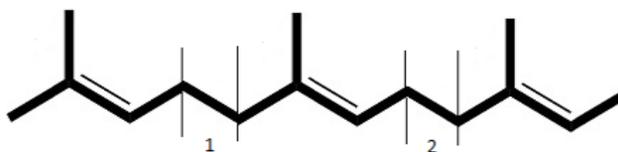
## 1.1 DEFINIÇÃO

Os terpenos formam uma ampla e diversificada classe de metabólitos secundários produzidos por organismos vivos. No ambiente marinho, eles possuem características peculiares como a funcionalização das moléculas com grupamentos hidroxílico, éster e outros, ou podem ser terpenos simples constituídos somente por átomos de hidrogênio e carbono. As denominações terpenóides ou isoprenóides (sufixo "óide") são usadas justamente para tratar desses metabólitos mais funcionalizados de origem marinha.

Os terpenos são derivados, por biossíntese, de unidades de isopreno, que tem a fórmula molecular  $C_5H_8$ , assim tornando a fórmula molecular básica dos terpenos sempre múltipla da estrutura básica ( $C_5H_8$ );  $n$  é o número de unidades de isopreno constituindo uma molécula de terpeno. Essa é a conhecida regra biogenética do isopreno ou  $C_5$ . Duas formas ativas, o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) e o seu isômero pirofosfato de isopentenila - IPP (Figura 1) podem gerar a agregação de unidades  $C_5$  através de reações de condensação que propiciam o estabelecimento de ligações do tipo "cabeça-cauda" (Figura 2) entre essas unidades básicas que constituirão as moléculas maiores, sempre repetindo esse padrão.



**Figura 1.** Unidades de isopreno  $C_5$  e as formas ativas pirofosfato de dimetilalila e o seu isômero pirofosfato de isopentenila.



**Figura 2.** Três unidades de isopreno ligadas (1 e 2) de modo cabeça-cauda, formando o que seria uma estrutura básica de um sesquiterpeno ( $C_{15}$ ).

Os terpenos são classificados em função do número de unidades  $C_5$  (isopreno) que os constituem, e o prefixo no nome indica o número destes constituintes da molécula. Por exemplo, os hemiterpenos são constituídos de uma simples unidade de isopreno, enquanto alguns múltiplos são os monoterpenos - 10 carbonos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpenos - 15 carbonos ( $C_{15}H_{24}$ ), diterpenos - 20 carbonos ( $C_{20}H_{32}$ ) e outros.

## 1.2 HISTÓRICO DE ESTUDOS

Desde a descoberta dos primeiros metabólitos secundários de macroalgas marinhas, na década de 1950, novas substâncias desses organismos marinhos continuam sendo isoladas e descritas, mesmo que em números decrescentes desde então. A manutenção do interesse por essas moléculas advém de seus diversos significados ecológicos, bem como das suas inúmeras propriedades biológicas e presumíveis aplicações no contexto biotecnológico. O quadro atual revela e destaca os terpenos como a maior classe de metabólitos secundários produzidos por organismos marinhos e também muito bem representados dentre as macroalgas marinhas.

As estimativas recentes apontam para a existência de mais de 3.000 metabólitos secundários isolados de macroalgas marinhas em todo o mundo, com as espécies de cada filo (Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta) produzindo substâncias bem características. No entanto, entre as macroalgas marinhas, cerca de 60% de todos os metabólitos secundários descritos são terpenóides. Este capítulo trata apenas desses terpenóides, embora um elevado percentual de outras substâncias conhecidas para as macroalgas marinhas também sejam isoprenóides (e.g. esteróides, carotenóides e hidroquinonas preniladas). Os terpenóides de macroalgas constituem um amplo e bem documentado grupo de metabólitos secundários com estruturas peculiares, distintas de análogos produzidos por vegetais terrestres.

As macroalgas vermelhas (Rhodophyta) constituem o grupo com a química mais rica e diversificada de metabolismo secundário, totalizando cerca de 1.700 moléculas distintas; dentre todos os terpenóides conhecidos para macroalgas marinhas, cerca de 50% foram isolados de espécies de Rhodophyta. Outra particularidade desse grupo é o fato de que cerca de 50% de seus metabólitos secundários são halogenados, possuindo bromo, cloro ou iodo em suas estruturas moleculares; nos outros dois filios, Chlorophyta (algas verdes) e Phaeophyta (algas pardas), essas substâncias representam apenas 11% e 4%, respectivamente. Em Rhodophyta, destaca-se *Laurencia*, talvez o gênero de organismo vivo mais rico em metabólitos secundários.

Mais de 1.200 metabólitos secundários foram isolados de macroalgas pardas, destacando-se, dentre os terpenóides, principalmente os diterpenos de espécies de *Dictyota*. Estes terpenóides de *Dictyota* chegam a representar 1/3 dos metabólitos secundários de macroalgas pardas.

As macroalgas verdes constituem o grupo menos prolífico na produção de metabólitos secundários, com apenas cerca de 300 moléculas conhecidas, mais de 85% delas de origem terpenoídica, principalmente sesqui- e diterpenóides primariamente funcionalizados; frequentemente eles têm um grupamento diacetoxila.

Os metabólitos secundários com duas, três ou quatro unidades de isopreno, constituindo monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, respectivamente, são os mais comuns em

macroalgas marinhas. Dentre os terpenóides, os monoterpenos são aqueles mais raramente encontrados em macroalgas, mas os gêneros de Rhodophyta *Plocamium* e *Portieria* produzem inúmeros desses metabólitos estruturalmente relacionados. De fato, os monoterpenos são mais diversos e ocorrem em maior número em macroalgas vermelhas, e são raros em espécies verdes e pardas.

A espécie-tipo de *Plocamium* foi originalmente descrita para a Europa, com ocorrência da Noruega ao Senegal e Mar Mediterrâneo, mas hoje é conhecida amplamente em águas temperadas frias em todos os hemisférios, assim como diversas outras desse gênero. Embora seja principalmente um gênero de clima frio, algumas espécies são características das águas tropicais, como *P. brasiliense* comum no Brasil.

O gênero *Portieria* tem espécie-tipo originalmente descrita para o Mar Vermelho, mas outras espécies distribuem-se em locais no Oceano Pacífico, Índico e Pacífico Oriental e Central, como Havaí, Japão, Filipinas, Austrália Oriental, Ilhas Maurício e África do Sul.

Os sesqui- e diterpenos são bem diversificados e produzidos em grande número por macroalgas marinhas; os sesquiterpenos são mais comuns dentre as espécies vermelhas, enquanto os diterpenos predominam nas macroalgas pardas. Comparados aos monoterpenos, o aumento de tamanho molecular é também acompanhado de maior complexidade estrutural desses sesqui- e diterpenos; por exemplo, com oxigenação e mais de um anel numa mesma molécula.

Os sesquiterpenos são os terpenóides dominantes entre as macroalgas vermelhas, particularmente em espécies de *Laurencia*, um gênero com mais de uma centena de espécies distribuídas em regiões marinhas costeiras temperadas e tropicais de todo o mundo.

Os diterpenos representam o maior grupo de metabólitos secundários produzidos por macroalgas marinhas, dominantes principalmente em espécies pardas e particularmente nas de *Dictyota*, um gênero cosmopolita e que constitui a maior fonte desse tipo de terpenóide nesse grupo de algas. Em macroalgas pardas também são encontrados os meroditerpenos, originados por biossíntese mista, com uma parte terpenoídica e outra fenólica constituindo uma molécula. Esse tipo de terpeno é encontrado, por exemplo, em *Cystoseira*, com espécies distribuídas em regiões temperadas do Hemisfério Norte, principalmente no Mediterrâneo, mas também em áreas na Índia e do Oceano Pacífico.

Diversos terpenóides de macroalgas marinhas são conhecidos por suas diversas atividades biológicas: anti-incrustantes, anti-inflamatórias, antifúngicas, antivirais, antibióticas, antioxidantes, anti-helmínticas, dentre muitas outras. Embora o presente capítulo enfatize o potencial dos terpenóides nos contextos farmacológico e de anti-incrustantes, as diversas substâncias produzidas por macroalgas marinhas também são usadas como valiosos recursos bioativos nas indústrias biomédicas em geral, tais como alimentícia, cosmética, cosmocêutica, nutracêutica, etc. Essas possibilidades de aplicações industriais fazem com que as macroalgas marinhas sejam um dos principais alvos da bioprospecção marinha por moléculas bioativas, como os terpenóides.

A Tabela 1 reúne alguns poucos exemplos, apenas para ilustrar essa potencialidade biotecnológica. Terpenóides encontrados em espécies de Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta possuem diversas atividades biológicas e são naturalmente alvos promissores para obtenção

de fármacos ou seus protótipos, bem como anti-incrustantes.

A potencialidade biotecnológica dos terpenóides de macroalgas marinhas conhecida hoje vem se constituindo desde os primeiros estudos de bioprospecção realizados com esses organismos (Tabela 1); nesta tabela é mencionado um exemplo da década de 1970. De uma maneira geral, os metabólitos de macroalgas vermelhas são aqueles que exibem a mais ampla gama de atividades biológicas, talvez como reflexo da maior riqueza e diversificação de metabólitos secundários por elas produzidos. Essa superioridade é algo realmente marcante no contexto dos inúmeros estudos sobre terpenóides bioativos de Rhodophyta e não um reflexo dos exemplos reunidos nesta tabela apenas como exemplo.

A potencialidade de terpenóides de macroalgas marinhas advém de pesquisas mais recentes (não mais de duas décadas), mas são igualmente promissoras para constituir formulações ou tintas anti-incrustantes.

Os anti-incrustantes são mais facilmente encontrados do que outros terpenóides com propriedades biológicas, por razões ecológicas/evolutivas. As macroalgas marinhas produzem anti-incrustantes para evitar os efeitos adversos de organismos incrustantes sobre elas, os mesmos organismos cuja ação as tintas anti-incrustantes combatem, por exemplo, no casco de embarcações. Por outro lado, os metabólitos secundários de macroalgas marinhas não foram selecionados por agentes adversos de origem terrestre ou que causam enfermidades em seres humanos.

**Tabela 1.** Exemplos de atividades biológicas de terpenóides de macroalgas marinhas.

ATIVIDADE	TIPO DE TERPENÓIDE	FONTE	REFERÊNCIA
Acaricida	Sesquiterpeno Diterpeno	<i>Laurencia dendroidea</i> (R) <i>Canistrocarpus cervicornis</i> (P)	Born et al., 2012 Born et al., 2012
Algicida	Diterpeno	<i>Dictyota dichotoma</i> (P)	Finer et al., 1979
Analgésica	Diterpeno	<i>Laurencia glandulifera</i> (R)	Chatter et al., 2009
Anti-fúngica	Sesquiterpeno Meroditerpeno	<i>Laurencia obtusa</i> (R) <i>Cystoseira tamariscifolia</i> (P)	Alarif et al., 2012; 2016 Benamara et al., 1999
Anti-helmíntica	Diterpeno Sesquiterpeno	<i>Jania rubens</i> (R) <i>Laurencia scoparia</i> (R)	Awad, 2004 Davyt et al., 2006
Anti-incrustante	Sesquiterpeno Diterpeno	<i>Laurencia dendroidea</i> (R) <i>Canistrocarpus cervicornis</i> (P)	Da Gama et al., 2008 Bianco et al., 2009
Anti-inflamatória	Meroterpeno Diterpeno	<i>Taonia atomaria</i> (P) <i>Laurencia glandulifera</i> (R)	Tziveleka et al., 2005 Chetter et al., 2011
Anti-malárica	Sesquiterpeno	<i>Laurencia obtusa</i> (R)	Topeu et al., 2003
Antimicrobial	Sesquiterpeno	<i>Laurencia elata</i> (R)	Sims, 1974
Antioxidante	Meroterpeno	<i>Cystoseira crinita</i> (P)	Fisch et al., 2003
Antitumoral	Triterpeno	<i>Laurencia viridis</i> (R)	Pacheco et al., 2011
Antiprotozoária	Sesquiterpeno	<i>Laurencia dendroidea</i> (R)	Machado et al., 2011; Desoti et al., 2012; 2014

ATIVIDADE	TIPO DE TERPENÓIDE	FONTE	REFERÊNCIA
Antiviral	Diterpeno Diterpeno Sesquiterpeno	<i>Halimeda tuna</i> (C) <i>Dictyota pffafii</i> (P) Espécies de <i>Peyssonnelia</i> (R)	Koehn et al., 1991 Barbosa et al., 2004 Talpir et al., 1994
Citotóxica	Vários diterpenos Diterpeno bifurcadiol Meroditerpeno Diterpeno Monoterpeno	<i>Halimeda</i> spp. (C) <i>Bifurcaria bifurcata</i> (P) <i>Sargassum tortile</i> (P) <i>Dictyota dichotoma</i> (P) <i>Portieria hornemanii</i> (R)	Paul & Fenical, 1984 Guardia et al., 1999 Numata et al., 1991 Wu et al., 1990 Fuller et al., 1992
Inseticida	Monoterpenos Sesquiterpeno	<i>Plocamium cartilagineum</i> (R) <i>Laurencia dendroidea</i> (R)	San-Martin et al., 1991 Bianco et al., 2013

(C)= Chlorophyta; (P)= Phaeophyta; (R)= Rhodophyta.

### 1.3 ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA

No âmbito da biotecnologia marinha, uma área das mais destacadas é a bioprospecção de substâncias terpenoídicas de macroalgas marinhas visando a principalmente a obtenção de fármacos ou anti-incrustantes, ou protótipos com esses propósitos.

Ambas as atividades motivadoras de bioprospecção marinha, fármacos e anti-incrustantes, compreendem etapas bastante similares, tendo como objetivos a obtenção de moléculas bioativas a partir de procedimentos usuais (Tabela 2). Cabe ressaltar que essa bioprospecção é uma atividade lenta, onerosa e com custos ambientais crescentes e usualmente não mensurados. Por exemplo, as amostras para análises iniciais são geralmente de pequeno porte (por exemplo, de 100g a 1kg), mas são cada vez maiores à medida que se faz necessário o aprofundamento dos estudos. Existem exemplos de extinção local causada pela bioprospecção de substâncias bioativas de organismos marinhos, e o impacto pode ser ainda mais danoso se o uso comercial se basear na exploração de fontes silvestres. Por outro lado, deve-se também considerar que diversos são os fatores limitantes, como suprimento, formulação, método analítico, farmacogenética e índice terapêutico e porque são eles muitas vezes restritivos para o desenvolvimento de fármacos e anti-incrustantes (Tabela 3).

**Tabela 2.** Etapas gerais para descoberta e desenvolvimento de fármacos e anti-incrustantes.

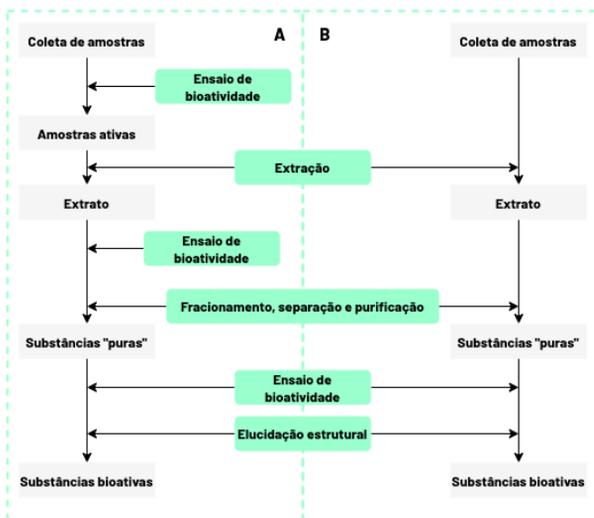
LINHA DO TEMPO	NÚMERO DE AMOSTRAS/ESPÉCIES	COLETAS
1 ano	Amostras coletadas	Coleta primária (0,1 a 1kg)
1 ano	Amostras avaliadas	
1 a 2 anos	Atividade detectada Moléculas ativas identificadas	Escala média de pré-coleta ~ 1-5kg
2 a 4 anos	Testes pré-clínicos e testes anti-incrustantes em laboratório ou campo	Grandes coletas - > 5kg ou 100-1.000kg
4 a 6 anos	Testes clínicos e anti-incrustantes	
?	Fármaco ou anti-incrustante comercial	?

**Tabela 3.** Fatores limitantes para o desenvolvimento de fármacos e anti-incrustantes de origem marinha (adaptado de Malve, 2016).

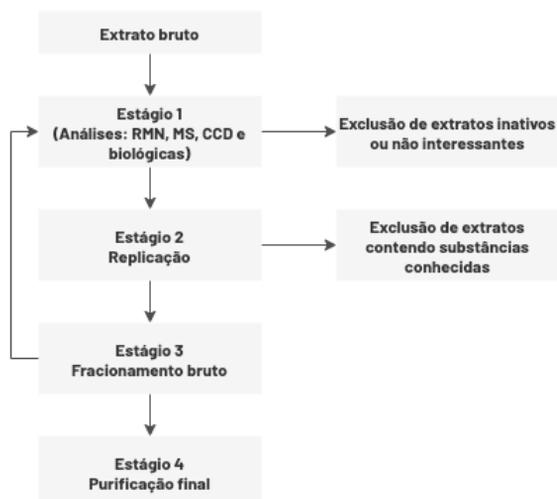
FATORES LIMITANTES	RAZÕES
Suprimento	Obtenção sustentável de moléculas para assegurar a continuidade de pesquisas e futuro mercado
Formulação	Identificação de uma formulação clínica e anti-incrustante viável
Método analítico	A complexidade estrutural das drogas e anti-incrustantes de origem marinha torna difícil encontrar métodos analíticos simples e abrangentes.
Farmacogenética	Difícil entendimento das variações fenotípicas
Índice terapêutico	O baixo índice terapêutico pode limitar o uso terapêutico.
Toxicidade	São necessários novos modelos toxicológicos para testes de drogas e anti-incrustantes.

Sem dúvida, a bioprospecção marinha, não só de macroalgas, precisa ser sustentável, para evitar o comprometimento dos recursos naturais, assim como prover subsídios e alternativas de suprimento para abordagens em escalas comerciais. Por exemplo, a síntese de moléculas em laboratório, usualmente propalada como uma alternativa, é comumente difícil devido à complexidade das moléculas de origem marinha, ou resulta de processos economicamente inviáveis para serem empregados em escalas comerciais. Uma das vertentes promissoras é a clonagem heteróloga, por permitir obter micro-organismos capazes de produzir metabólitos secundários bioativos de macroalgas marinhas. No entanto, as pesquisas nessa área ainda estão em estágios iniciais, mas precisam ser incrementadas não só para garantir suprimento de matéria prima, mas para promover o desenvolvimento sustentável e a preservação da biodiversidade marinha.

Uma forma de otimizar a bioprospecção é utilizar, por exemplo, o fracionamento bio guiado para a busca de substâncias bioativas (Figuras 3 e 4). As substâncias-alvo não necessariamente podem ser novas, mas esse é um procedimento que deve ser incorporado como rotina, visando principalmente evitar desperdício de recursos financeiros e de tempo.



**Figura 3.** Esquema comparativo de procedimentos básicos para a busca de substâncias bioativas: (A) fracionamento bio guiado; (B) busca por substâncias (adaptada de Duarte et al., 2014).



**Figura 4.** Abordagem geral para o fracionamento de extratos brutos obtidos de organismos marinhos (adaptada de Houssem & Jaspars, 2006).

## 2 | ABORDAGENS METODOLÓGICAS

Os processos analíticos comumente empregados no isolamento e na identificação de constituintes terpenoídicos de macroalgas marinhas envolvem os seguintes passos sequenciais: 1 – Coleta e preservação da amostra; 2 – Extração do conteúdo da amostra; 3 – Purificação de terpenos por cromatografia em coluna e cromatografia semipreparativa em HPLC; 4 – Elucidação estrutural por métodos físicos, como RMN e outros.

### 2.1 COLETA E PRESERVAÇÃO

A coleta de macroalgas marinhas pode ser realizada manualmente, de modo direto, em regiões costeiras e rasas, ou em outras mais profundas com o emprego de diferentes técnicas de mergulho. Imediatamente após a coleta, deve-se limpar a macroalga para remover epífitas ou outros organismos associados que possam vir a contaminar a amostra e gerar artefatos na análise de composição química da amostra-alvo.

Após a coleta, a macroalga poderá ser armazenada de diferentes formas, tais como: 1 – Imediatamente congelada; 2 – Úmida – após ter seu excesso de água removido com auxílio de papel-toalha; 3 – Secada ao ar livre; ou 4 – Liofilizada. Cada um desses procedimentos deve ser executado com o conhecimento do que ele proporciona em termos de preservação e resultado final, assim como o objetivo do estudo.

O congelamento imediato preserva todas as características químicas ou reais da amostra. No entanto, o extrato obtido desse material úmido conterá água que precisará ser removida visando à continuidade adequada dos procedimentos analíticos e de purificação.

O uso de papel gera variações significativas, por exemplo, em análises que necessitam

de mensuração de pesos úmidos da amostra. Para remoção e padronização visando à obtenção de peso úmido, recomenda-se remover o excesso de água da amostra por meio de saladeira manual. Por outro lado, ao ser extraída ainda úmida, a amostra seca com papel também produzirá extrato com um pouco de água que precisará ser removida, como já mencionado para amostras úmidas.

A secagem ao livre é um procedimento usual, mas deve-se atentar para a possibilidade de interferências na composição química real da amostra. Por exemplo: 1 – terpenóides ou outros metabólitos de baixo peso molecular, voláteis, podem ser perdidos durante esse procedimento; 2 – Um longo tempo de secagem pode permitir a infestação por fungos, facilitada pela umidade existente na amostra; 3 – Pode ocorrer a degradação de substâncias originalmente produzidas pela macroalga; a secagem ao sol pode facilitar ainda mais essa degradação.

A liofilização é o procedimento mais eficaz de preservação de amostras de organismos vivos visando à extração de metabólitos secundários. No entanto, como para os demais modos de preservação, deve-se ter os devidos cuidados com a possibilidade de degradação de alguma molécula ou mesmo perda daquelas voláteis ou de baixo peso molecular.

De uma maneira geral, a literatura pertinente pode subsidiar com mais detalhes qual o procedimento mais adequado em função do perfil químico da amostra a ser extraída.

## 2.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Após o emprego de um dos procedimentos mencionados no item anterior, a amostra estará pronta para ser extraída com solventes orgânicos visando a obtenção de terpenos ou mesmo outros metabólitos secundários de interesse específico. No entanto, para cada procedimento, deve-se ter em mente o objetivo para o qual a amostra foi coletada.

Em função dos tipos de terpenos já conhecidos ou existentes em cada grupo de macroalgas marinhas (verdes, pardas ou vermelhas), emprega-se um tipo de solvente ou uma combinação de solventes para proceder uma extração mais eficiente possível. Infelizmente, não existe um procedimento padrão de tempo de extração, o que pode acarretar rendimentos variáveis e que impossibilitam comparações. Portanto, em análises comparativas deve-se empregar tempos iguais de extração de diferentes amostras.

## 2.3 PLATAFORMAS ANALÍTICAS

Uma plataforma analítica para obtenção de terpenóides de macroalgas marinhas, e que permita o isolamento e a determinação estrutural de moléculas, requer um conjunto de laboratórios integrados, mas um dos recursos essenciais é o RMN. Ao longo dos últimos 50 anos, a ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido a técnica predominante para a determinação da estrutura de substâncias orgânicas. De fato, essa técnica tornou-se uma ferramenta surpreendente para a caracterização molecular. A RMN é uma ferramenta analítica poderosa e versátil, usada para determinar concentrações, dinâmicas, interações e estruturas de uma grande variedade de moléculas. De todos os métodos espectroscópicos, RMN permite a caracterização completa de um metabólito. Além de todas essas virtudes, também preserva a amos-

tra analisada e permite a caracterização completa de uma molécula utilizando cada vez menos quantidade de amostra, por análises em 1D e 2D em diversos núcleos (e.g.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). Mais recentemente, o desenvolvimento de sonda de alta resolução (High Resolution Magic Angle Spinning - HRMAS), permite uma análise direta de tecido vivo – por exemplo, um pedaço de uma macroalga –, sem a necessidade de extração prévia. Essa técnica fornece informações sobre o conteúdo total e a proporção de diferentes moléculas dentro de uma amostra. Assim, propicia uma ampla gama de análises, como a diferenciação de espécies ou estudos de metabolômica de acordo com várias condições ambientais ou experimentais.

## 2.4 TIPOS DE ANÁLISES

Há poucas décadas, a purificação de qualquer metabólito secundário ou produto natural era uma tarefa bastante trabalhosa. Ainda requer um bom esforço, mas os avanços tecnológicos alcançados nos últimos anos tornaram esse processo quase rotineiro, principalmente ao incorporar separações mais rápidas e automatizadas. Diversas técnicas foram e continuam sendo desenvolvidas para analisar o conteúdo, a composição química e a elucidação estrutural de moléculas advindas do metabolismo secundário de macroalgas marinhas.

# 3

## APLICAÇÕES DA BIODIVERSIDADE NA BIOTECNOLOGIA MARINHA

O ambiente marinho é um habitat natural que abriga grande diversidade de organismos com capacidade para se adaptar a uma variedade de condições ambientais, como ampla variação de temperatura (da Antártica a áreas com  $350^{\circ}\text{C}$ ), ampla variação de pressão (1 a  $1000\text{atm}$ ), áreas de oligo- a eutróficas e grande amplitude de habitats (zonas fóticas e afóticas). A grande diversidade de metabólitos secundários encontrada em macroalgas marinhas, assim como em diversos outros organismos marinhos, é uma resposta adaptativa a essa imensa variabilidade ambiental.

Apesar de ser uma química adaptativa que permite às macroalgas marinhas sobreviverem sob condições adversas, essa diversidade química também constitui uma base promissora para o desenvolvimento biotecnológico. Na verdade, os recursos marinhos são explorados desde a antiguidade e incluíam, por exemplo, o uso de peixes e preparações de algas como fontes de medicamentos. Os óleos de peixe são o exemplo clássico do produto derivado do mar em uso desde tempos imemoriais.

# 4

## CONCLUSÕES

De maneira inequívoca, as macroalgas marinhas são fontes potenciais de elevado interesse biotecnológico, devido à produção de grande diversidade de terpenóides que exibem amplo espectro de atividades biológicas. Destacam-se como alvos principais o desenvolvimento de novas drogas com elevado valor terapêutico e anti-incrustantes de ampla eficácia.

A bioprospecção com plantas terrestres tem sido incrementada com a abordagem etnobotânica. Desse modo, a bioprospecção se fundamenta em um conhecimento tradicional e torna o processo mais eficaz e menos “aleatório” do que coletar inúmeras plantas e realizar diversos bioensaios com base em presença, por exemplo, de classes químicas de substâncias bioativas. A etnobotânica também é usada, por exemplo, em pesquisas com macroalgas marinhas, mas principalmente aquelas voltadas para o uso desses organismos como alimento. Portanto, o desenvolvimento de protocolos que tornem a bioprospecção marinha mais ágil e eficaz, assim como menos onerosa, deve ser encarado como um dos grandes desafios do desenvolvimento dessa área.

Apesar do inegável potencial, há necessidade premente de uso sustentável da biodiversidade marinha como fonte de substâncias bioativas. A bioprospecção deve seguir de modo paralelo com o desenvolvimento de alternativas de suprimento sustentável de matéria-prima tanto para a continuidade das pesquisas sobre alvos ou mesmo visando o futuro suprimento de mercado. A bioprospecção marinha deve ser abrangente, associando a busca de moléculas com uma análise do seu fornecimento, de modo que promova o desenvolvimento sustentável, conservação da biodiversidade e desenvolvimento econômico seguro do Brasil.

## REFERÊNCIAS

Alarif, W.M.; Al-Lihaibi, S.S.; Ayyad, S.-E.N.; Abdel-Rhman, M.H.; Badria, F.A. (2012) Laurene-type sesquiterpenes from the Red Sea red alga *Laurencia obtusa* as potential antitumor-antimicrobial agents. **Eur. J. Med. Chem.** 55: 462-466.

Alarif, W.M.; Al-Footy, K.O.; Zubair, M.S.; Halid, P.H.; Ghandourah, M.A.; Basaif, S.A.; Al-Lihaibi, S.S.; Ayyad, S.-E.N.; Badria, F.A. (2016) The role of new eudesmane-type sesquiterpenoid and known eudesmane derivatives from the red alga *Laurencia obtusa* as potential antifungal-antitumour agents. **Nat. Prod. Res.** 30: 1150-1155.

Awad, N.E. (2004) Bioactive brominated diterpenes from the marine red alga *Jania rubens* (L.) Lamx. **Phytother Res.** 18: 275-279.

Barbosa, J.P.; Pereira, R.C.; Abrantes, J.L.; dos Santos, C.C.C.; Rebello, M.A.; Frugulhetti, I.C.P.P.; Teixeira, V.L. (2004) In vitro antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota pfaaffii*. **Planta Med.** 70: 856-860.

Barbosa, M.; Valentão, P.; Andrade, P.A. (2014) Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: implications for neurodegenerative diseases. **Mar. Drugs.** 12: 4934-4972.

Beattie, A.J.; Hay, M.E.; Magnusson, B.; De Nys, R.; Meathers, J.; Vincent, J.F.V. (2010) Ecology and bioprospecting. **Austral Ecol.** 36: 341-356.

Benamara, A.; Abourrichi, A.; Berrada, M.; Charrouf, M.; Chaid, N.; Boudouma, M.; Garneau, X.F. (1999)

Methoxybifurcarenona: anantifungal and antibacterial meroditerpene from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. **Phytochemistry**. 52: 37-40.

Bhadury, P.; Wright, P.C. (2004) Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. **Planta**. 219: 561-578.

Bianco, E.M.; Pires, L.; Santos, G.K.N.; Dutra, K.A.; Reis, T.N.V.; Vasconcelos, E.R.T.P.P.; Cocentino, A.L.M.; Navarro, D.M.A.F. (2013) Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). **Ind. Crops Prod.** 43: 270-275.

Bianco, E.M.; Rogers, R.; Teixeira, V.L.; Pereira, R.C. (2009) Antifouling diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*. **J. Appl. Phycol.** 21: 341-346.

Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.G.; Prinsep, M.R. (2017) Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** 34: 235-294.

Born, F.S.; Bianco, E.M.; Da Camara, C.A.G. (2012) Acaricidal and repellent activity of terpenoids from seaweeds collected in Pernambuco, Brazil. **Nat. Prod. Commun.** 7: 463-466.

Bugni, T.S.; Richards, B.; Bhoite, L.; Cimborá, D.; Harper, M.K.; Ireland, C.M. (2008) Marine natural product libraries for high-throughput screening and rapid drug discovery. **J. Nat. Prod.** 71: 1095-1098.

Chatter, R.; Kladi, M.; Tarhouni, S.; Maatoug, R.; Kharrat, R.; Vagias, C.; Roussis, V. (2009) Neorogioltriol: a brominated diterpene with analgesic activity from *Laurencia glandulifera*. **Phytochem. Lett.** 2: 25-28.

Chatter, R.; Othman, R.B.; Rabhi, S.; Kladi, M.; Tarhouni, S.; Vagias, C.; Roussis, V.; Guizani-Tabbane, L.; Kharrat, R. (2011) *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of neorogioltriol, a new diterpene extracted from the red algae *Laurencia glandulifera*. **Mar. Drugs**. 9: 1293-1306.

Chambers, L.D.; Stokes, K.R.; Walsh, F.C.; Wood, R.J.K. (2006) Modern approaches to marine antifouling coatings. **Surf Coat. Technol.** 201: 3642-3652.

Da Gama, B.A.P.; Carvalho, A.G.V.; Weidner, K.; Soares, A.R.; Coutinho, R.; Fleury, B.G.; Teixeira, V.L.; Pereira, R.C. (2008) Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. **Bot. Mar.** 51: 191-201.

Davyt, D.; Fernandez, R.; Suescun, L.; Mmomburú, A.W.; Saldaña, J.; Domínguez, L.; Fujii, M.T.; Manta, E. (2006) Bisabolanes from the red alga *Laurencia scoparia*. **J. Nat. Prod.** 69: 1113-1116.

De Nys, R.; Givskov, M.; Kumar, N.; Kjelleberg, S.; Steinberg, P.D. (2006) Furanones. In: Fusetani, N.; Clare, A.S. (org.). **Antifouling compounds**. Progress in Molecular and Subcellular Biology. Heidelberg, Springer. pp. 55-86.

Demunshi, Y.; Chugh, A. (2010) Role of traditional knowledge in marine bioprospecting. **Biodivers Conserv.** 19: 3015-3033.

Desoti, V.C.; Lázarin-Bidóia, D.; Sudatti, D.B.; Pereira, R.C.; Alonso, A.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V.; Oliveira Silva, S. (2012) Trypanocidal action of (–)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. **Mar. Drugs**. 10: 1631-1646.

Desoti, V.; Lázarin-Bidóia, D.; Sudatti, D.; Pereira, R.C.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.; Oliveira Silva, S. (2014) Additional evidence of the trypanocidal action of (–)-elatol on amastigote forms through the involvement of reactive oxygen species. **Mar. Drugs**. 12: 4973-4983.

Duarte, K.; Rocha-Santos, T.A.P.; Freitas, A.C.; Duarte, A.C. (2014) Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. **Trends Anal. Chem.** 34: 97-110.

Finer, I.; Clardy, J.; Fenical, W.; Minale, L.; Riecio, R.; Battaile, I.; Kirkup, M.; Moore, R.E. (1979) Structures of dictyodial and dictyolactone, unusual marine diterpenoids. **J. Org. Chem.** 44: 2044-2047.

Fuller, R.W.; Cardellina, J.H.; Kato, Y.; Brinen, L.S.; Clardy, J.; Sander, K.M.; Boyad, M.R. (1992) A pen-

tahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produced a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. **J. Med. Chem.** 35: 3007-3011.

Fisch, K.M.; Bohm, V.; Wrightand, A.D.; König, G.M. (2003) Antioxidative meroterpenoids from the brown alga *Cystoseira crinita*. **J. Nat. Prod.** 66: 968-975.

Fusetani, N. (2004) Biofouling and antifouling. **Nat. Prod. Rep.** 21: 94-104.

Fusetani, N. (2011) Antifouling marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** 28: 400-410.

Guardia, S.D.; Valls, R.; Mesguiche, V.; Brinei, J.-M.; Gulioli, G. (1999) Enantioselective synthesis of 9(-)-bifurcadiol: a natural antitumor marine product. **Tetrahedron Lett.** 40: 8359-8360.

Harper, M.K.; Bugni, T.S.; Copp, B.R.; James, R.D.; Lindsay, B.S.; Richardson, A.D.; Schnabel, P.C.; Tasdemir, D.; VanWagoner, R.M.; Verbitski, S.M.; Ireland, C.M. (2001) Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In: McClintock, J.B.; Baker, B.J. (eds.). **Marine chemical ecology**. CRC Press. pp. 3-69.

Hellio, C.; Yebra, D. (2009) **Advances in marine antifouling coatings and technologies**. Cambridge: Woodhead.

Hill, R.T.; Fenical, W. (2010) Pharmaceuticals from marine natural products: surge or ebb? **Curr. Opin. Biotech.** 21: 777-779.

Houssen, W.E.; Jaspars, M. (2006) Isolation of marine natural products. In: Saker, S.D.; Latif, Z.; Gray, A.I. (eds.). **Methods in biotechnology. Natural products isolation**. 20. Press Humana, Totowa, NJ. pp. 353-390.

Hunt, B.; Vincent, A.C.J. (2006) Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. **Ambio.** 35: 57- 64.

Ireland, C.M.; Copp, B.R.; Foster, M.P.; McDonald, L.A.; Radisky, D.C.; Swersey, J.C. (1993) Biomedical potential of marine natural products. In: Attaway, D.H.; Zaborsky, O.R. (eds.). **Marine Biotechnology**. New York: Plenum Press. pp. 1-43.

Koehn, F.E.; Gunasekera, S.P.; Niel, D.N.; Cross, S.S. (1991) Halitunal, an unusual diterpene aldehyde from the marine algae *Halimeda tuna*. **Tetrahedron Lett.** 32: 169-172.

Kursar, T.A.; Caballero-George, C.C.; Capson, T.L.; Cubilla-Rios, L.; Gerwick, W.H.; Gupta, M.P.; Ibañez, A.; Linington, R.G.; Mcphai, K.L.; Ortegarbarria, E.; Romero, L.I.; Solis, P.N.; Cole, P.D. (2007) Securing economic benefits and promotion conservation through bioprospecting. **Bioscience.** 56: 1005-1012.

Leal, M.C.; Munro, M.H.; Blunt, J.W.; Puga, J.; Jesus, B.; Calado, R.; Rosa, R.; Madeira, C. (2013) Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** 30:1380-1390.

Lincoln, R.A.; Strupinski, K.; Walker, J.M. (1991) Bioactive compounds from algae. **Life Chem. Rep.** 8: 97-183.

Machado, F.S.; Pacienza-Lima, W.; Rossi-Bergmann, B.; Souza, L.G.; Fujii, M.; Paula, J.C.; Costa, S.; Lopes, N.; Kaiser, C.; Soares, A.R. (2011) Antileishmanial sesquiterpenes from the Brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. **Planta Med.** 77: 733-735.

Malve, M. (2016) Exploring the ocean for new drug developments: marine pharmacology. **J. Pharm. Bioallied Sci.** 8: 83-91.

Maschek, J.A.; Baker, B.J. (2008) The chemistry of algal secondary metabolism. In: Amsler, C.D. (ed.). **Algal chemical ecology**. Berlin: Springer-Verlag. pp. 1-24.

Mayer, A.M.S.; Glaser, K.B.; Cuevas, C.; Jacobs, R.S.; Kem, W.; Little, R.D.; McIntosh, J.M.; Newman, D.J.; Potts, B.C.; Shuster, D.E. (2010) The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective-

ve. **Trends Pharmacol. Sci.** 31: 255-265.

Molinski, T.F.; Dalisay, D.S.; Lievens, S.L.; Saludes, J.P. (2009) Drug development from marine natural products. **Nat. Rev. Drug Discov.** 28: 69-85.

Munro, M.H.G.; Blunt, J.W.; Dumdei, E.J.; Hickford, S.J.H.; Lill, R.E.; Li, S.; Battershill, C.N.; Duckworth, A.R. (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **J. Biotechnol.** 70: 15- 25.

Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2004) Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **J. Nat. Prod.** 67: 1216-1238.

Numata, A.; Kambara, S.; Takahashi, C.; Fuliki, R.; Yoneda, M.; Fujita, E.; Nabeshima, Y. (1991) Cytotoxic activity of marine algae and a cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile*. **Chem. Pharm. Bull.** 39: 2129-2131.

Oliveira, L.S.; Gregoracci, G.B.; Silva, G.G.Z.; Salgado, L.T.; Amado Filho, G.M.; Ferreira, M.A.; Pereira, R.C.; Thompson, F.L. (2012) Transcriptomic analysis of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta) and its microbiome. **BMC Genomics.** 13: 487.

Oliveira, L.S.; Tschoeke, D.A.; Oliveira, A.S.; Hill, L.J.; Paradas, W.C.; Salgado, L.T.; Thompson, C.C.; Pereira, R.C.; Thompson, F.L. (2015) New insights on the terpenome of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta). **Mar. Drugs** 13: 879-902.

Pacheco, F.C.; Villa-Pulgarin, J.A.; Mollinedo, F.; Martín, M.N.; Fernández, J.J.; Daranas, A.H. (2011) New polyether triterpenoids from *Laurencia viridis* and their biological evaluation. **Mar. Drugs** 9: 2220-2235.

Paul, V.J.; Fenical, W. (1984) Novel bioactive diterpenoid metabolites from tropical marine algae of the genus *Halimeda*. **Tetrahedron.** 40: 3053-3062.

Pereira, R.C.; Costa-Lotufu, L.V. (2012) Bioprospecting for bioactives from seaweeds: potential, obstacles and alternatives. **Braz. J. Pharmacol.** 24: 893-905.

Pomponi, S.A. (1999) The bioprocess-technological potential of the sea. **J. Biotechnol.** 70: 5-13.

Proksch, P.; Edrada-Ebel, R.; Ebel, R. (2003) Drugs from the sea – opportunities and obstacles. **Mar. Drugs.** 1: 5-17.

Qian, P.Y.; Xu, Y.; Fusetani, N. (2010) Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. **Biofouling.** 26: 223-234.

Quinn, R.J. (1988) Chemistry of aqueous marine extracts: isolation techniques. In: Scheuer, P.; Coll, J.C.; Elyalov, G.B.; Quinn, R.J. (eds.) **Bioorganic marine chemistry.** vol. 2. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1-41.

Riguera, R. (1997) Isolating bioactive compounds from marine organisms. **J. Mar. Biotech.** 5: 187-193.

Rittschof, D. (2000) Natural product antifoulants: one perspective on the challenges related to coatings development. **Biofouling.** 15: 119-127.

Saker, S.D.; Latif, Z.; Gray, A.I. (eds.) Methods in biotechnology. **Natural products isolation.** Vol. 20. Press Humana, Totowa, NJ.

San-Martin, A.; Negrete, R.; Roviroso, J. (1991) Insecticide and acaricide activities of polyhalogenated monoterpenes from Chilean *Plocamium cartilagineum*. **Phytochemistry.** 30: 2165-2169.

Sims, J.J.; Lin, G.H.Y.; Wing, R.M. (1974) Marine natural products, elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. **Tetrahedron Lett.** 39: 3487-3490.

Smit, A.J. (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **J. Appl. Phycol.** 16: 245-262.

Stengel, D.B.; Connan, S. (eds.). (2015) **Natural products from marine algae**. Methods and protocols. Springer.

Stengel, D.B.; Connan, S.; Popper, Z.A. (2011) Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnol. Adv.** 29: 483-501.

Tittensor, D.P.; Mora, C.; Jetz, W.; Lotze, H.K.; Ricard, D.; Berghe, E.V.; Worm, B. (2010) Global patterns and predictors of marine biodiversity across taxa. **Nature**. 466: 1098-1103.

Toppeu, G.; Aydogmus, Z.; Ilıre, S.; Gören, A.C.; Pezzuto, J.M.; Clement, J.A.; Kingston, D.G. (2003) Brominated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. **J. Nat. Prod.** 66: 1505-1508.

Tziveleka, L.-A.; Abatis, D.; Paulus, K.; Bauer, R.; Vigias, C.; Roussis, V. (2005) Marine polyprenylated hydroquinones, quinones, and chromenols with inhibitory effects on leukotriene formation. **Chem. Biol.** 2: 901-909.

Wright, A.E. (1998) Isolation of marine natural products. In: Cannell, R.J.P. (ed.). **Methods in Biotechnology**. vol. 4. Natural products isolation. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-408.

Wu, C.X.; Li, Z.G.; Li, H.W. (1990) Effect of berbamine on action potential in isolated human atrial tissues. **Asia Pac. J. Pharmacol.** 5: 191-193.



# PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

Darlon I. Bernardi<sup>a</sup>  
Ariane F. Bertonha<sup>a</sup>  
Jairo I. Quintana Bulla<sup>a</sup>  
Luciane A. C. Tonon<sup>a</sup>  
Vitor F. Freire<sup>a</sup>  
Juliana R. Gubiani<sup>a</sup>  
Laura P. Ióca<sup>a</sup>  
Karen J. Nicácio<sup>a</sup>  
Julie P. G. Rodriguez<sup>a</sup>  
Mirelle Takaki<sup>a</sup>  
Roberto G. S. Berlinck<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade de São Paulo

## RESUMO

Metabólitos secundários (produtos naturais) de organismos do ambiente marinho são moléculas extremamente diversificadas do ponto de vista estrutural e que muitas vezes apresentam potentes atividades biológicas. Ao longo dos últimos 60 anos, diversos metabólitos de organismos marinhos demonstraram ser modelos de fármacos extremamente promissores. O isolamento e identificação destes compostos são o primeiro passo para se conhecer este arsenal químico. Estratégias para a obtenção de produtos naturais de organismos marinhos são brevemente descritas neste capítulo.

# 1 | O QUE SÃO METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E COMO DESVENDAR SUA ESTRUTURA QUÍMICA

## 1.1 DEFINIÇÃO

A química de produtos naturais objetiva a descoberta e o estudo das funções de produtos finais do metabolismo secundário. Constituem o metabolismo primário substâncias presentes nas células de todos os organismos vivos – incluem-se aqui aminoácidos, açúcares, lipídeos, nucleosídeos, nucleotídeos e seus respectivos polímeros: proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos. Esses metabólitos participam em processos vitais para a sobrevivência do organismo. Já os metabólitos secundários (produtos naturais) são produzidos por vias biossintéticas derivadas do metabolismo primário. Essas substâncias exercem funções adaptativas para as espécies que as produzem e/ou acumulam. Diversos metabólitos secundários são pigmentos, hormônios, semioquímicos e defesas químicas. As principais classes de produtos do metabolismo secundário são policetídeos, terpenos, alcaloides, peptídeos não ribossomais e derivados do ácido chiquímico. O livro de Paul M. Dewick intitulado *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach* é uma excelente introdução à química dos produtos naturais.

Organismos vivos constituem as fontes dos produtos do metabolismo secundário. Bactérias, cianobactérias, fungos, dinoflagelados, invertebrados marinhos e terrestres, insetos, animais e plantas são produtores de uma enorme diversidade dessas substâncias, muitas das quais apresentam potentes atividades biológicas. Tais substâncias possuem alto valor agregado como modelos para o desenvolvimento de fármacos, agroquímicos, fragrâncias, flavorizantes, antioxidantes, além de outras várias aplicações. Entre os anos de 1981 e 2014, 1592 novas substâncias foram introduzidas no mercado farmacêutico, as quais são produtos naturais ou derivados semissintéticos de produtos naturais.

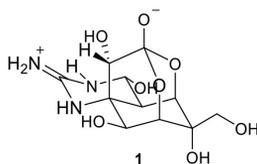
Embora cerca de 500 mil metabólitos secundários já tenham sido isolados e identificados, considera-se que esse número constitui ainda uma pequena fração dos produtos naturais a serem descobertos. Isso porque apenas cerca de 1% das bactérias, 3% dos fungos e menos de 20% das plantas tiveram seu metabolismo secundário parcialmente investigado. O acesso aos genomas de organismos vivos, bem como ferramentas de análise molecular versáteis e muito sensíveis, permitiu verificar que apenas uma pequena parte dos produtos naturais já foi descoberta. O surgimento de bibliotecas como *Dictionary of Natural Products*, *MarinLit*, *Molecular Networking*, *Antimarin*, *The Natural Products Atlas* auxilia a identificação de substâncias presentes em misturas complexas. A utilização de ensaios biológicos automatizados (*high-throughput screening*, HTS) permite avaliar as atividades biológicas de milhares de amostras em pouco tempo. Técnicas espectroscópicas sofisticadas, fundamentadas principalmente em espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, permitem a identificação de substâncias em quantidades de poucos microgramas. O uso conjunto dessas ferramentas permite o acesso ao metabolismo secundário de maneira muito mais detalhada e precisa. Dessa forma, a descoberta de moléculas úteis para a humanidade constitui uma tarefa a ser realizada ainda por

muitas gerações de pesquisadores.

## 1.2 HISTÓRICO

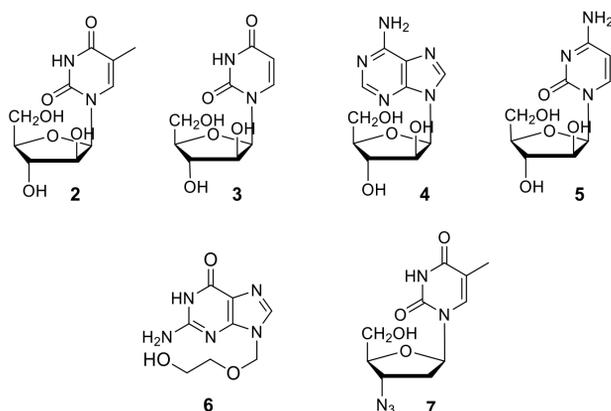
Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície terrestre e mais de 90% do volume habitável do planeta. Milhões de espécies de organismos vivos são marinhas, incluindo plantas, micro-organismos, invertebrados e vertebrados. Estima-se em cinco milhões as espécies de organismos marinhos. Muitos são sésseis, em um ambiente distinto do terrestre. A grande diversidade e altos níveis taxonômicos (filos e classes) dos organismos marinhos apresenta uma imensa diversidade de metabólitos secundários, com incorporação de elementos (p. ex., halogênios) e grupos funcionais (p. ex., sulfato, sulfonas, sulfetos, nitrila, isonitrila) não comumente encontrados em produtos naturais de espécies biológicas terrestres.

Os oceanos permaneceram inexplorados até depois da 2ª Guerra Mundial, devido às dificuldades de acesso ao ambiente marinho. Contudo, civilizações antigas, como a chinesa, já usavam algas marinhas como vermífugos e também possuíam vastos conhecimentos sobre peixes tóxicos, como baiacús da família dos tetraodontídeos, que concentram em seus tecidos a tetrodotoxina (1). A tetrodotoxina bloqueia canais de sódio e provoca morte por paralisia dos músculos respiratórios. Registros de organismos tóxicos como peixes, moluscos, equinodermas e águas vivas já foram encontrados em documentos das civilizações babilônicas, assírias, persas, indianas, helênicas e romanas.



Considera-se que os primeiros estudos de produtos naturais de origem marinha são aqueles que relatam o isolamento de esteroides de esponjas e de toxinas de peixes da família Tetraodontidae. A partir da 2ª Guerra Mundial os estudos sobre produtos naturais de origem marinha se intensificaram, em decorrência do desenvolvimento de equipamentos de mergulho autônomo. Além disso, avanços da instrumentação de isolamento e análise estrutural possibilitaram isolar e identificar compostos mais complexos e em quantidades cada vez menores.

O isolamento da espongotimidina (2) e espongouridina (3) a partir da esponja *Cryptotethya crypta* é considerado o ponto de partida da química de produtos naturais marinhos. O desenvolvimento de análogos sintéticos da espongotimidina e espongouridina levou à descoberta do antiviral Ara-A (4) e do anticancerígeno Ara-C (5). O Ara-A e o Ara-C foram os primeiros derivados de produtos naturais marinhos a atingir o mercado para uso clínico. O Ara-C é produzido sinteticamente e distribuído como Cytosar U<sup>®</sup>, utilizado para o tratamento de leucemia aguda não-linfocítica, leucemia crônica mielocítica e leucemia da meninge. O Ara-A é obtido de culturas de *Streptomyces antibioticus* e distribuído como Vira-A<sup>®</sup>, indicado para o tratamento de viroses causadas por *Herpes simplex* e *H. zoster*. Estes compostos originaram diversos agentes antivirais, dentre os quais os mais importantes são o acyclovir (6) e a azidotimidina (AZT) (7).

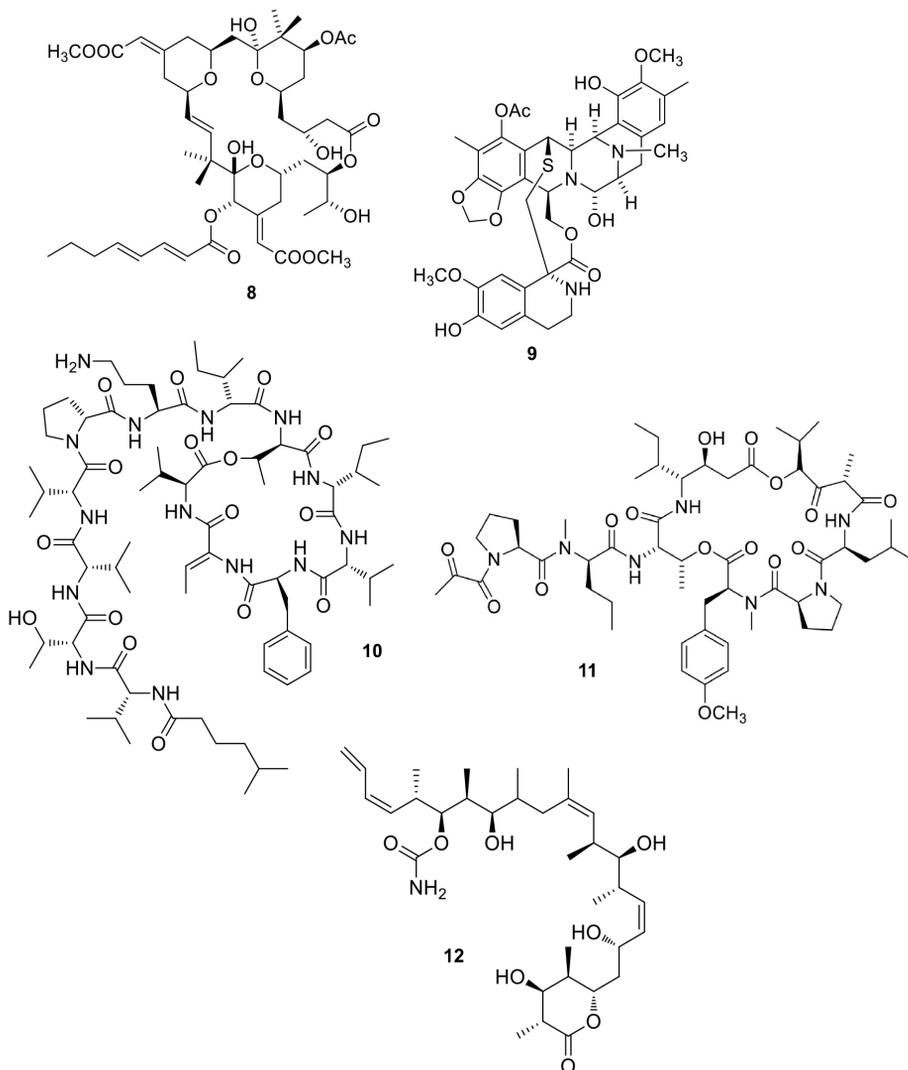


A briostatina-1 (**8**), isolada do briozoário *Bugula neritina*, inibe a enzima sinalizadora de células da proteína quinase C, comprometendo a proliferação de células tumorais, a promoção da diferenciação de células tumorais e induzindo a apoptose destas células. Posteriormente descobriu-se que a briostatina-1 é produzida por uma bactéria, *Candidatus Endobugula sertula*. A briostatina-1 foi licenciada pela Bristol-Mayers Squibb e encontra-se atualmente em fase II dos testes clínicos em humanos realizados pelo National Cancer Institute (NCI). Entretanto, a briostatina-1 só é eficiente se administrada em conjunto com outros medicamentos.

A ecteinascidina 743 (**9**), um alcaloide tetra-hidroisoquinolínico isolado do tunicado *Ecteinascidia turbinata*, apresentou potente atividade antitumoral. A ecteinascidina 743 foi licenciada pela Ortho Biotech (J&J) e encontra-se na fase III dos testes clínicos em humanos. O kahalalídeo F (**10**), um depsipeptídeo cíclico isolado do molusco marinho *Elysia rufescens* e de sua presa, a alga *Bryopsis* sp., também apresenta atividade antitumoral. O desenvolvimento do kahalalídeo F também situa-se na fase II de testes clínicos. Estima-se que o KF atue na membrana de lisossomos, alterando sua função e induzindo a morte celular por oncosse, relacionada às etapas iniciais da apoptose, na qual ocorre a perda do núcleo celular. Em fase I dos ensaios clínicos, o KF foi avaliado em câncer de próstata andrógeno-refratário e apresentou-se bastante tolerável e sem efeitos adversos sérios. Atualmente, o kahalalídeo F encontra-se na fase II de testes clínicos para o tratamento de carcinoma hepatocelular, NSCLC e melanoma maligno avançado, e está sendo avaliado para o tratamento de psoríase severa. A aplidina (**11**), isolada da ascídia *Aplidium albicans*, também é antitumoral e encontra-se na fase II de testes clínicos. O discodermolídeo (**12**) isolado da esponja *Discodermia dissoluta* é um potente agente imunossupressor e anticancerígeno. Foi licenciado pelo laboratório Novartis Pharma AG e encontra-se na fase I de testes clínicos.

Muitos outros compostos de origem marinha isolados de invertebrados, algas e micro-organismos apresentam diversas e potentes atividades biológicas, incluindo antibacteriana, anticoagulante, antifúngica, anti-inflamatória, antimalárica, tuberculostática e antiviral. Entre 2014 e 2015, foram isolados 2718 novos produtos naturais de organismos do ambiente marinho.

O surgimento de novas enfermidades associadas ao envelhecimento populacional e à adoção de novos padrões de vida e de consumo da sociedade moderna, como obesidade, doenças



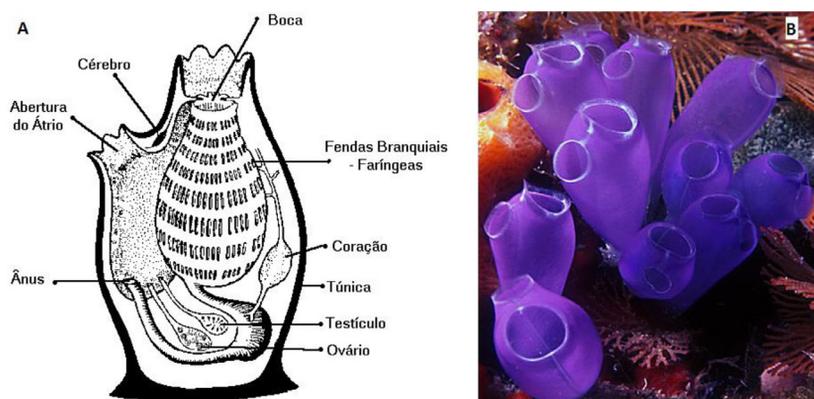
degenerativas e diferentes classes de câncer, constitui sérios problemas sociais e econômicos a serem enfrentados. Terapias de alto custo nem sempre são acessíveis a todas as classes sociais. Fármacos com severos efeitos colaterais são comumente empregados no tratamento de diferentes enfermidades. A descoberta de novos compostos bioativos mais eficazes e menos agressivos à saúde dos pacientes é cada vez mais necessária, bem como o desenvolvimento de metodologias de síntese orgânica que possibilitem a produção desses novos medicamentos e a compreensão dos mecanismos de ação biológica dessas substâncias.

### 1.3 ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA

#### 1.3.1 ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA

As ascídias são animais da classe Ascidiacea (subfilo Urochordata ou Tunicata), que pertencem ao filo Chordata, o maior filo dos deuterostômios, ou seja, de animais que possuem orifícios distintos e distantes entre si destinados à absorção e excreção de alimentos. São encontrados em diversos ambientes marinhos. A maioria é sésil e abundante nas regiões costeiras rasas. Podem ser encontradas em profundidade de até 50 metros.

Durante a fase adulta esses animais podem viver de forma solitária ou em colônias. Ambas são encontradas sobre substratos rochosos. As que vivem em colônias compartilham uma mesma túnica com múltiplos indivíduos. A unidade de uma ascídia é similar a um saco, em cuja extremidade superior se situa a boca (sifão oral) e outro lateral serve de cloaca (sifão atrial) (Figura 1). O corpo é protegido por uma camada gelatinosa ou coriácea chamada de túnica, um tecido orgânico responsável pela proteção e por processos de troca entre o corpo do animal e o ambiente. As túnicas são constituídas por polissacarídeos sulfatados, com propriedades químicas e físico-químicas características.



**Figura 1.** Ascídia. (A) Estrutura Interna de uma ascídia, corte longitudinal (adaptada de Ruppert; Barnes, 1994). (B) *Clavelina moluccensis* (fonte da imagem: <https://2017-tunicate-meeting.bio.nyu.edu/home/scientific-program/>).

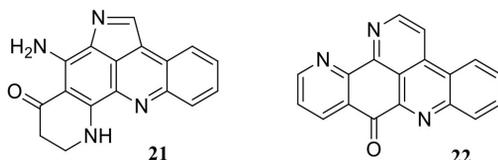
Metabólitos secundários típicos de ascídias são em geral derivados de aminoácidos. Compostos nitrogenados, como alcaloides e peptídeos, correspondem a cerca de 85% dos produtos do metabolismo secundário isolados de ascídias; os 15% restantes são provenientes da rota do acetato (policetídeos) e acetato-mevalonato (terpenoides).

A namenicina (**13**), isolada de *Polysyncrator lithostrotum* da classe das enediinas, apresenta atividade como antibiótico e antitumoral. A descoberta mais importante dos estudos de ascídias foi o isolamento de depsipeptídeos de *Trididemnum solidum*. A didemnina B (**14**) é antitumoral, antiviral e imunossupressora e o primeiro metabólito marinho a atingir a fase II de ensaios clínicos como antitumoral. As eudistominas foram isoladas de *Eudistoma olivaceum*, sendo potentes antivirais ativos contra *Herpes simplex* (vírus I e II). A eudistomina C (**15**) contém um anel oxatiazepina, sem precedentes em metabólitos secundários.

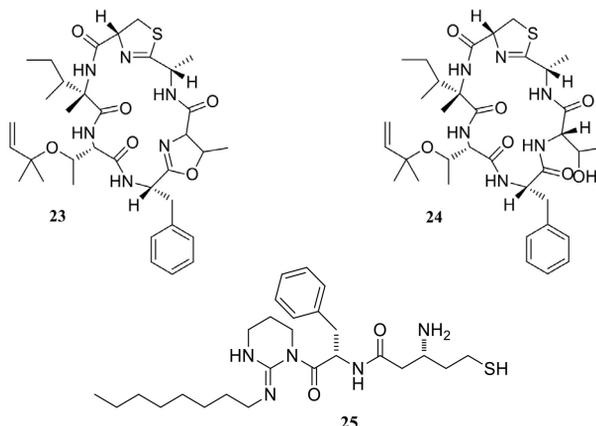
Ascídias do gênero *Clavelina* apresentam aminas cíclicas e acíclicas, como as clavepicinas A (**16**) e B (**17**), com atividade citotóxica, isoladas de *Clavelina picta*. A wakayina (**18**), de *Clavelina sp.*, foi o primeiro alcaloide pirroloiminoquinona isolado de uma ascídia. Apresenta potente



Alcaloides pirroloacridínicos são frequentemente isolados de ascídias dos gêneros *Cystodytes* e *Didemnum*, como a plakinidina D (**21**), de *Didemnum* sp. e *D. rubeum*, e a ascididemina (**22**) de *Didemnum* sp. Estes alcaloides frequentemente apresentam atividade citotóxica *in vitro* contra células tumorais.

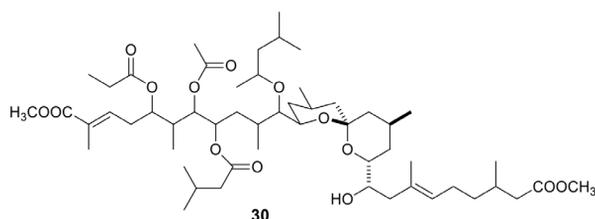
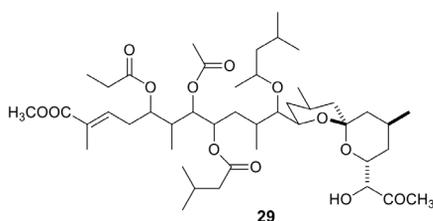
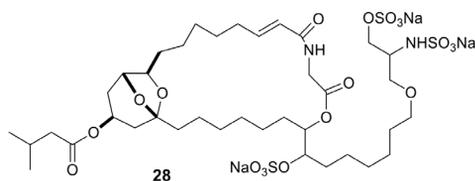
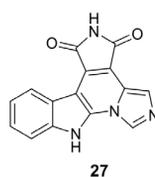
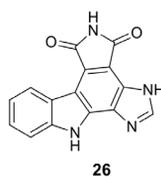


As comoramidas A (**23**) e B (**24**), peptídeos cíclicos citotóxicos, foram isoladas da ascídia *D. molle*. A caledonina (**25**) foi isolada da ascídia *D. rodriguesi* e apresentou citotoxicidade *in vitro* contra células KB.



A granulitimida (**26**) e a isogranulitimida (**27**) foram isoladas da ascídia *Didemnum granulatum*, coletada no Brasil. Estas substâncias apresentaram atividade inibidora do ponto de checagem G2 do ciclo celular. O trissulfato do ciclodidemniserinol (**28**), isolado da ascídia *D. guttatum*, apresentou inibição da enzima integrase HIV-1. Os didemnacetais A (**29**) e B (**30**), isolados da mesma ascídia, apresentaram inibição da enzima protease HIV-1. Ambas as classes de metabólitos são atrativos alvos para a quimioterapia antirretroviral.

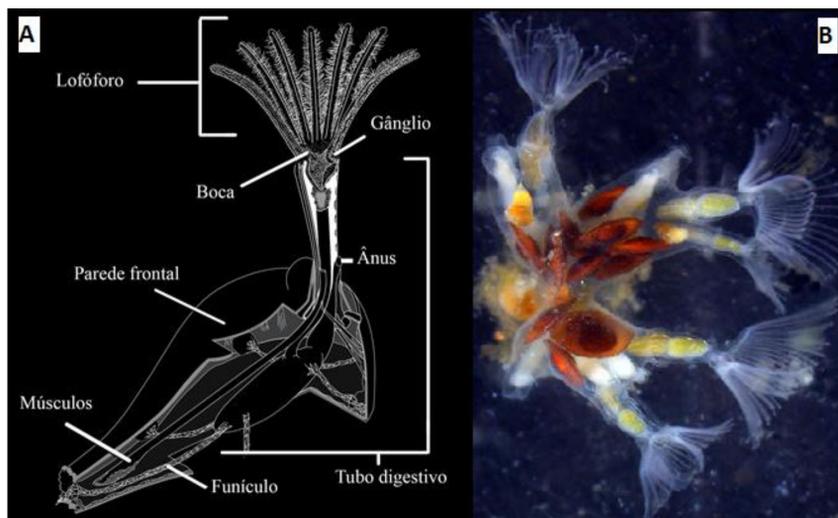
Dentre os metabólitos secundários isolados de ascídias, a ecteinascidina-743 (**9**) é dos mais importantes, uma vez que já se encontra no mercado e é comercializada para o tratamento de câncer de ovário e câncer de sarcoma de tecidos flácidos. Foi isolada pela primeira vez a partir da ascídia *Ecteinascidia turbinata* do Caribe. A Et-743 (**9**) é atualmente obtida por semissíntese a partir da cianosafracina B, produzida pela fermentação da bactéria *Pseudomonas fluorescens*. Estudos metagenômicos do DNA de *E. turbinata* evidenciaram origem microbiana da ET-743, permitindo o sequenciamento do genoma completo da bactéria que a produz, *Candidatus Endoecteinascidia frumentensis*.



### 1.3.2 BRIOZOÁRIOS

Briozoários compreendem um filo de animais aquáticos filtradores, preferencialmente marinhos, sésseis, quase exclusivamente coloniais, compostos por unidades chamadas de zooides (Figura 2). Esses organismos encontram-se em oceanos de todas as profundidades e latitudes. São, porém, mais comuns em águas rasas de mares tropicais. Habitam preferencialmente águas límpidas e alimentam-se de micro-organismos planctônicos (diatomáceas e radiolários). Possuem forma de taça em z com tentáculos ciliados (lofóforo) que capturam partículas alimentares em suspensão. Muitos produzem estruturas calcificadas (carbonato de cálcio) tubulares, mas outros apresentam certa mobilidade e não são mineralizados.

Bryozoa (do grego *bryon*, musgo; *zoon*, animal) refere-se à forma de algumas colônias que crescem sobre o substrato, formando uma cobertura uniforme como um tapete, de modo similar a algumas plantas e musgos. Esses animais têm importância ecológica na colonização do substrato e formação de novos habitats para outros invertebrados. São alimento para invertebrados marinhos, como lesmas-do-mar (Mollusca: Nudibranchia) e aranhas-do-mar (Pycnogonida). O filo Bryozoa é dividido em três classes: Phylactolaemata, Stenolaemata e Gymnolaemata, que somam aproximadamente 6.000 espécies recentes e 15.000 fósseis. Inter-relações filogené-



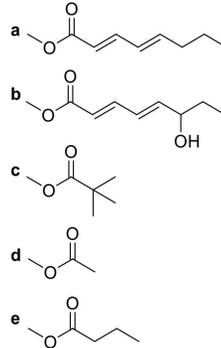
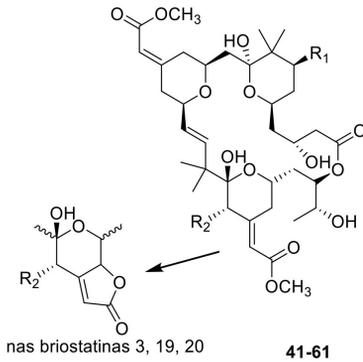
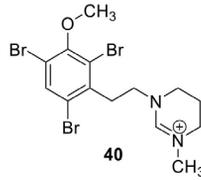
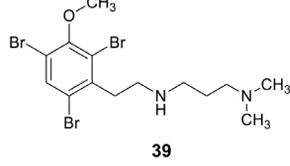
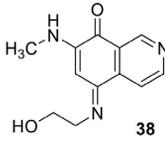
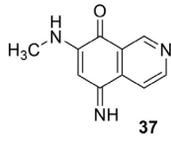
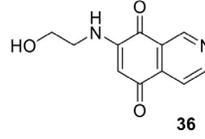
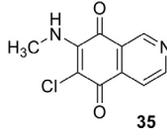
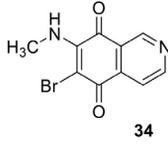
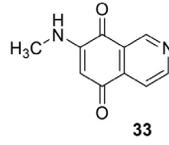
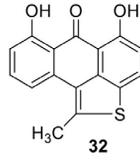
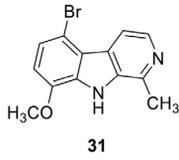
**Figura 2.** Briozoário. (A) Estrutura do zooide, lofóforo e tubo digestivo em “U”, músculos e funículo (adaptada de Boardman et al., 1983). (B) *Lophopus crystallinus* (fonte da imagem: <http://palaeos.com/metazoa/bryozoa/>).

ticas entre esses grupos permanecem controversas. Até o ano de 2007, apenas 32 espécies de briozoários tinham sido investigadas do ponto de vista químico, das quais foram isolados cerca de 200 metabólitos secundários. Desde então, pelo menos mais 28 novos compostos foram descritos a partir de briozoários.

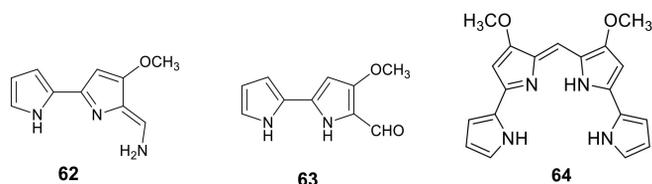
Um dos motivos pelos quais briozoários são pouco investigados do ponto de vista químico relaciona-se a dificuldades de sua classificação taxonômica. Briozoários já foram confundidos com plantas e muitas vezes são encontrados em coleções de herbários em museus. Representam um grupo biológico ainda pouco explorado para descoberta de produtos naturais.

Alcaloides e policetídeos constituem as duas principais classes de metabólitos isoladas de briozoários, que incluem as flustraminas, securaminas, tambjamins e briostatinas. O alcaloide 5-bromo-8-metóxi-1-metil- $\beta$ -carbolina (**31**), isolado de *Pterocella vesiculosa*, apresentou atividade citotóxica contra células leucêmicas P388, atividade antibiótica contra *Bacillus subtilis* e antifúngica contra *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*. O brioantratiofeno (**32**), de *Watersipora subtorquata*, apresentou atividade antiangiogênica. As caulibugulonas A-F (**33-38**), de *Caulibugula intermis*, apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais IC-2<sup>WT</sup>. As convolutaminas I (**39**) e J (**40**), isoladas de *Amathia tortusa*, apresentaram atividade antiparasítica contra *Trypanosoma brucei* em concentrações de IC<sub>50</sub> de 1,1 e 13,7  $\mu$ M.

A classe Gymnolaemata, ordem Cheilostomata, inclui o gênero *Bugula*, com mais de 50 espécies descritas, das quais onze no Brasil. *B. neritina* é a espécie de briozoário mais conhecida, pelo fato de ter sido a fonte original das briostatinas (**41-61**), com potente atividade antitumoral e potencial para o tratamento da doença de Alzheimer. *B. dentata* é fonte das tambjamins (**62-63**), que apresentam atividades citotóxicas, antimicrobianas e imunossupressoras. O pigmento azul (**64**), também isolado de *B. dentata*, possui atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.



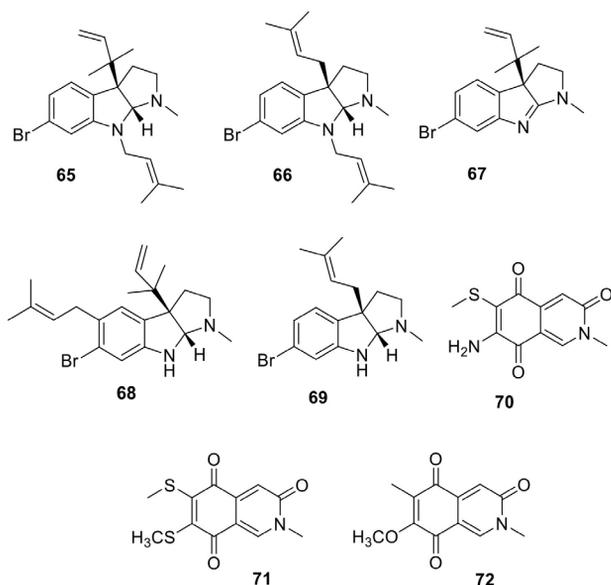
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
Briostatina	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
R <sub>1</sub>	OH	d	OH	d	c	c	e	d	e	d	c	d	e	e	c	d	c	c	c	c	c
R <sub>2</sub>	H	a	a	a	d	d	d	d	e	e	H	H	a	H	OH	b	H	H	H	e	H

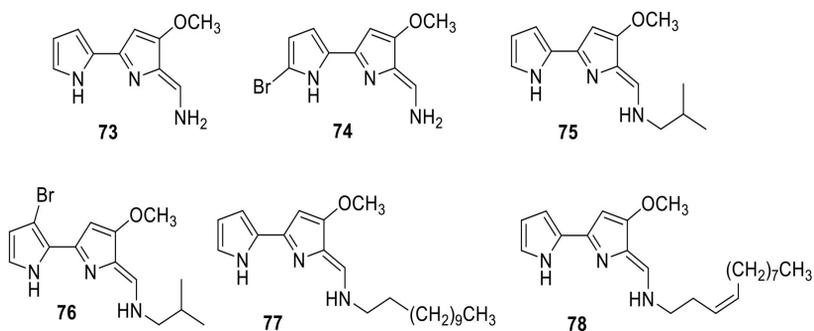


Uma questão-chave decorrente dos estudos de briozoários se refere à real origem de seus metabólitos secundários, se estes compostos seriam produzidos pelo briozoário ou por endossimbiontes microbianos. Há cerca de dez anos verificou-se que os agregados gênicos que codificam a biossíntese das briostatinas são encontrados em uma bactéria, designada *Candidatus Endobugula sertula*.

É possível se especular sobre a origem de outros metabólitos encontrados em briozoários, como as flustraminas A-E (65-69) isoladas de *Flustra foliacea*. As flustraminas são alcaloides fisostigminícos semelhantes àqueles encontrados no feijão de Calabar, *Fosostigma venenosum*. A flustramina E é semelhante ao pseudofirininoldo isolado do sapo australiano *Pseudophryne coriacea*. As perfragilinas A (70) e B (71) do briozoário *Biflustra perfragilis* se assemelham à mimosamicina (72), produzida pela bactéria *Streptomyces lavendulae*.

As tambjamins A-D (73-76) isoladas da lesma marinha *Tambja abdere* são certamente acumuladas após predação do briozoário *Sessibugula translucens*, que por sua vez abriga a bactéria *Pseudoalteromonas tunicata*. Uma linhagem de *Streptomyces* produz a tambjamina BE18591 (77). Fragmentos de DNA genômico relacionados ao agrupamento gênico da tambjamina YP1 (78) foram encontrados em *Pseudoalteromonas tunicata* e expressos em *Escherichia coli* por expressão heteróloga.

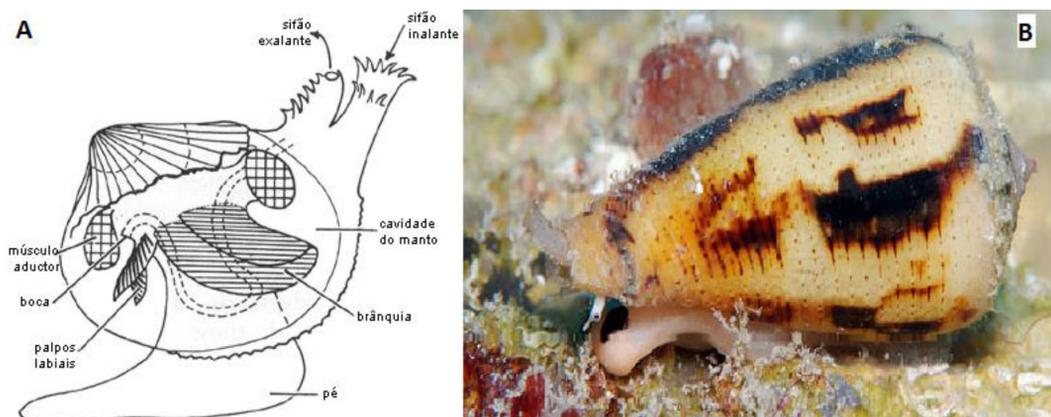




### 1.3.3 MOLUSCOS

O filo Mollusca é o segundo maior filo animal, abrangendo cerca 7% dos organismos do reino Animalia. Compreende cerca de 200.000 espécies, dentre as quais cerca de 52.000 são marinhas. Divide-se em oito classes: Gastropoda, Bivalvia, Scaphopoda, Cephalopoda, Polyplacophora, Monoplacophora, Caudofoveata e Solenogastres. Cerca de 90% da diversidade de moluscos é encontrada na classe Gastropoda (Figura 3).

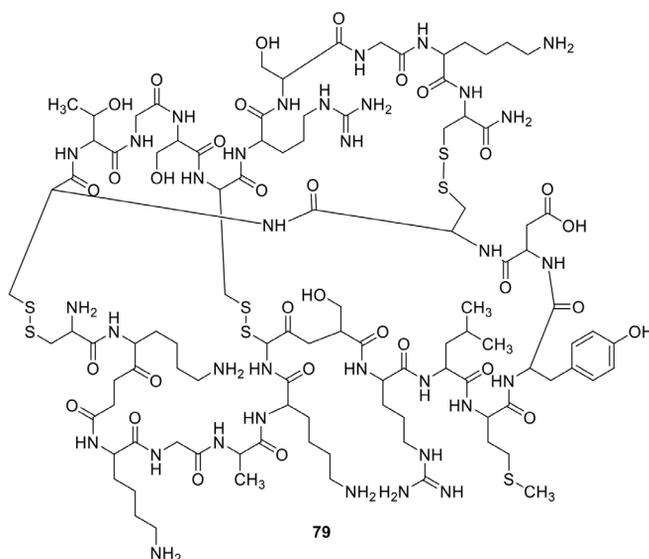
Moluscos apresentam grande variabilidade morfológica, distribuição ecológica e composição química. São encontrados em regiões tropicais e temperadas, em habitats nutricionalmente ricos, como sedimentos bentônicos e recifes de corais. Alimentam-se de invertebrados e plantas. Muitas vezes acumulam metabólitos secundários de suas presas para serem reutilizados contra seus próprios predadores potenciais ou como forma de comunicação. Mas também são capazes de biossintetizar *de novo* seus próprios metabólitos secundários.



**Figura 3.** Molusco. (A) Estrutura básica de um molusco (fonte da imagem: [www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos2/biomoluscos.php](http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos2/biomoluscos.php)). (B) *Conus magus* (fonte da imagem: <http://www.underwaterkwaj.com/shell/cone/Conus-magus.htm>).

Até 2009, pelo menos 977 metabólitos secundários foram isolados de 251 espécies de moluscos marinhos. Dentre os compostos isolados de moluscos que apresentaram atividade anticâncer, 18 estão em fase I, II ou III de desenvolvimento de fármacos. Até 2015, sete compostos de moluscos marinhos haviam sido aprovados para o uso clínico.

O primeiro fármaco oriundo de um molusco marinho foi o ziconotídeo ou  $\omega$ -conotoxina MVIIA (Prialt®, Elan Corporation) (**79**), um peptídeo analgésico constituído por 25 aminoácidos, isolado do venoma do molusco *Conus magus*, empregado no tratamento de dores crônicas graves associadas ao câncer, AIDS e neuropatias. Em modelos animais de dor nociceptiva, demonstrou ser um analgésico mil vezes mais ativo do que a morfina. Uma das vantagens do uso do ziconotídeo é não induzir tolerância após uso crônico, como os opioides, por exemplo, que levam à diminuição no número de receptores após tratamento continuado e à consequente dessensibilização do paciente.

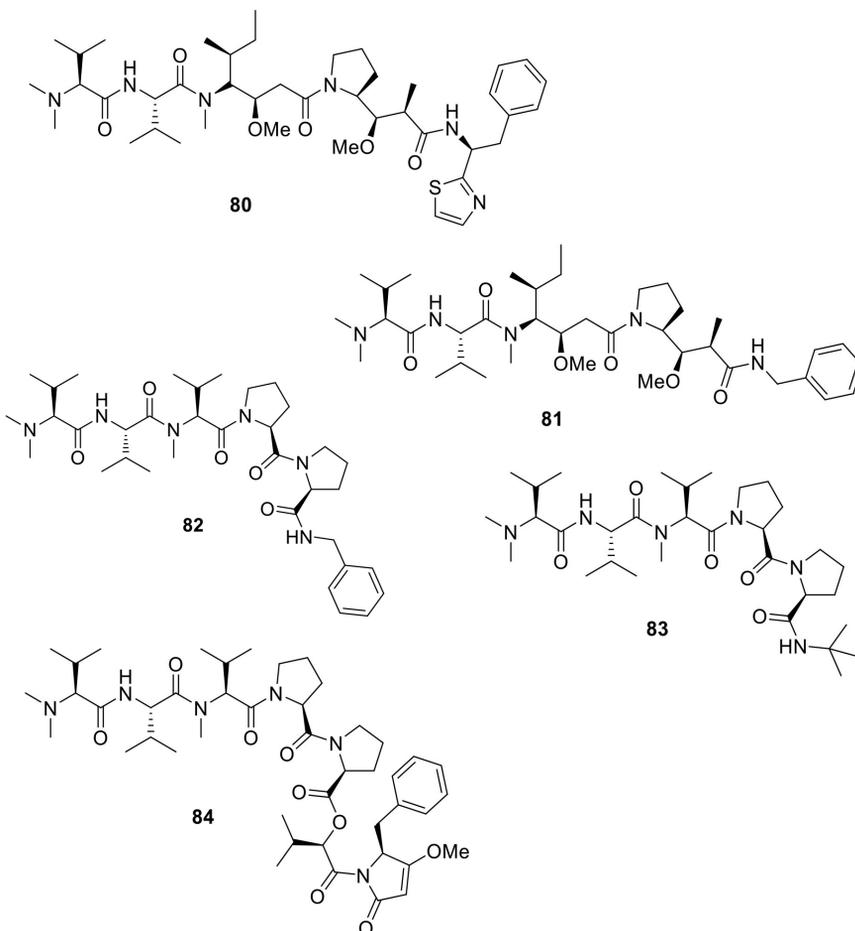


As toxinas de *Conus* apresentam diversas aplicações na medicina. Estima-se que cada espécie de *Conus* contenha até 200 diferentes peptídeos biologicamente ativos que se ligam em canais iônicos dependentes de voltagem ou ativados por ligantes externos. As  $\alpha$ -conotoxinas inibem competitivamente receptores nicotínicos com elevada seletividade. As  $\psi$ -conotoxinas atuam como inibidores não-competitivos nesse mesmo alvo. As  $\sigma$ -conotoxinas são antagonistas de receptores de serotonina 5-HT<sub>3</sub>. As  $\kappa$ -conopressinas são agonistas de receptores de vasopressina. As  $\omega$ -conotoxinas bloqueiam seletivamente diferentes subtipos de canais de cálcio. As  $\kappa$ -conotoxinas bloqueiam canais de potássio e as  $\mu$ -conotoxinas bloqueiam canais de sódio.

As dolastatinas são peptídeos isolados do molusco *Dolabella auricularia*. As dolastatinas ligam-se à tubulina e possuem atividade contra diversos tipos de células tumorais em concentrações pM. A dolastatina 10 (**80**) demonstrou ser o composto mais potente dentre todas as dolastatinas. Entretanto, estudos clínicos de fases I e II realizados pelo National Cancer Institu-

te, dos EUA, foram descontinuados devido à ausência de resultados significativos. Foram desenvolvidos três análogos sintéticos das dolastatinas que se encontram em investigações de fase clínica contra vários tipos de tumores. O TZT-1027 (ou soblidotina, ou auristatina, **81**), análogo da dolastatina 10, passou pela fase II para tratamento de câncer de não-pequenas células de pulmão (*non-small cell lung cancer*) e sarcoma de tecido mole em estado avançado ou metastático. O TZT-1027 foi considerado seguro e bem tolerado, mas não apresentou atividade antitumoral significativa.

LU-103793 (**82**) e ILX-651 (**83**) são análogos da dolastatina 15 (**84**) desenvolvidos pela BASF Pharma. Em testes clínicos, a cemadotina mostrou ser segura em fase I e melhorou a qualidade de vida de pacientes com câncer de pulmão em fase II, mas não demonstrou resultados objetivos contra os tumores. A sintadotina é uma dolastatina de terceira geração, que estabiliza microtúbulos por meio de mecanismo distinto das outras dolastatinas. Esse composto é ativo por via oral e possui uma janela terapêutica maior que a da cemadotina. Em testes clínicos de fase I, o ILX-651 promoveu a cura de um paciente com melanoma metastático e estabilização da doença em outros casos. Atualmente o ILX-651 encontra-se em estudos de fase II.

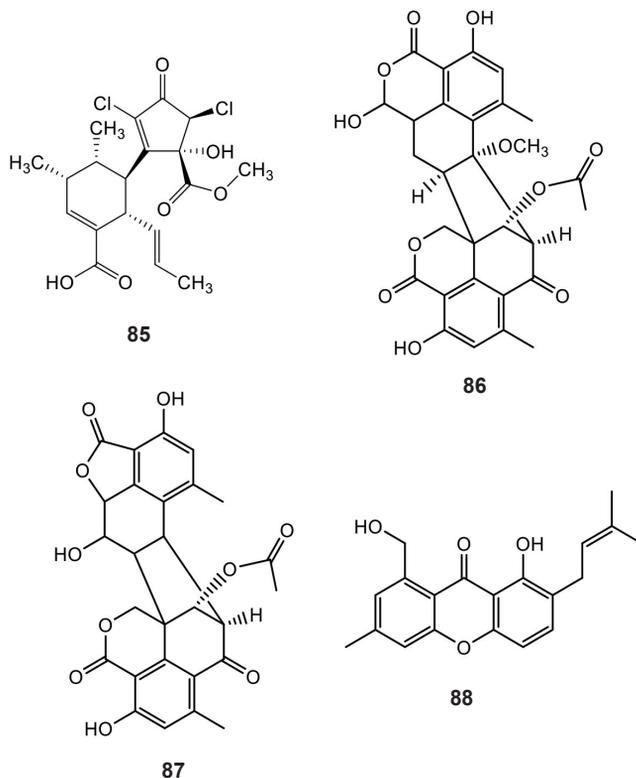


## 1.3.4 FUNGOS MARINHOS

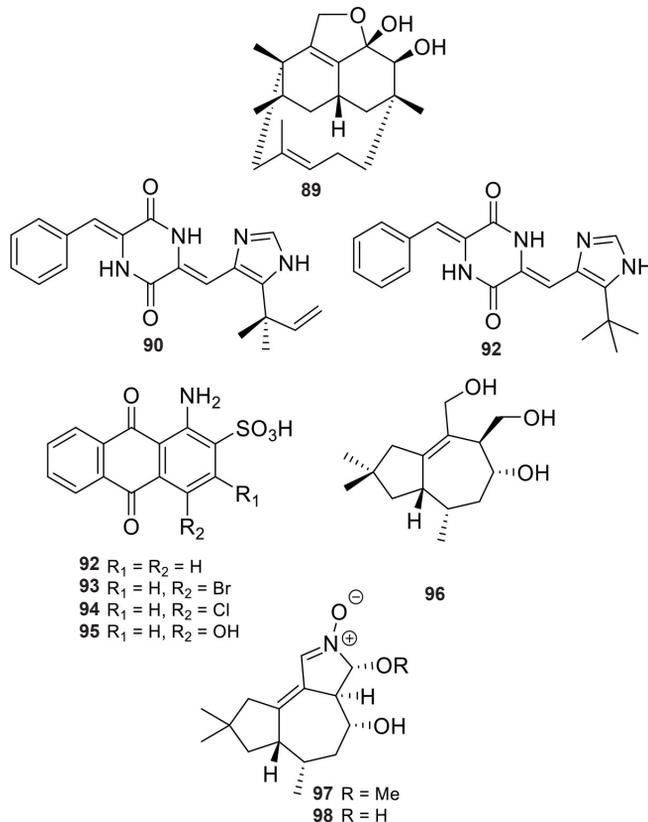
Fungos marinhos são divididos em duas categorias ecológicas: fungos marinhos obrigatórios, que crescem e se reproduzem exclusivamente no meio ambiente marinho, e fungos marinhos facultativos, que se desenvolvem em meio terrestre ou água doce mas adquiriram adaptações que lhes permitem crescer e esporular no meio marinho. Fungos oriundos do ambiente marinhos são aqueles isolados do do ambiente marinho não possuem natureza facultativa ou obrigatória determinada.

Policetídeos constituem o grupo de compostos mais comumente produzido em cultura por fungos do ambiente marinho (40%), além de alcaloides (20%), terpenos (15%), peptídeos (15%), policetídeos prenilados (7%), derivados do chiquimato (2%) e lípidos (1%).

O fungo derivado do ambiente marinho *Roussoella* sp. produz o roussoellatídeo (**85**). Os experimentos de biossíntese utilizando precursores marcados com  $^{13}\text{C}$  indicaram que a biossíntese de **85** envolve dois rearranjos do tipo Favorskii e uma reação Diels-Alder intermolecular. A talaromicidasona A (**86**), talaromicidasona B (**87**) e a talaroxantenona (**88**) foram isoladas do meio de cultura e micélio do fungo marinho *Talaromyces* sp. LF458. Os compostos **86** e **87** exibiram atividades antibacterianas com  $\text{IC}_{50}$  3,70 e 17,36  $\mu\text{M}$ , respectivamente, contra cepas de *Staphylococcus* patógenas humanas. Os compostos **86** e **88** exibiram atividade inibitória da acetilcolinesterase com  $\text{IC}_{50}$  7,49 e 1,61  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



Fomactinas são diterpenos produzidos exclusivamente por linhagens fúngicas marinhas, e são antagonistas do fator ativador de plaquetas (PAF). A fomactina A (**89**) representa o membro estruturalmente mais complexo dessa família de compostos. A halimida (**90**) produzida em cultura por *Aspergillus* sp. de origem marinha atua como um agente de polimerização da tubulina. A dicetopiperazina NPI-2358 (**91**) encontra-se em fase III de estudos clínicos como agente antitumoral. Fungos derivados do ambiente marinho podem apresentar diversas aplicações biotecnológicas, como na remediação e tratamento de águas residuais. O fungo *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 degrada o corante *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR), levando à formação de quatro antraquinonas (**92-95**). A investigação do meio de degradação de RBBR levou ao isolamento de três terpenos da classe dos tremulenos (**96-98**).

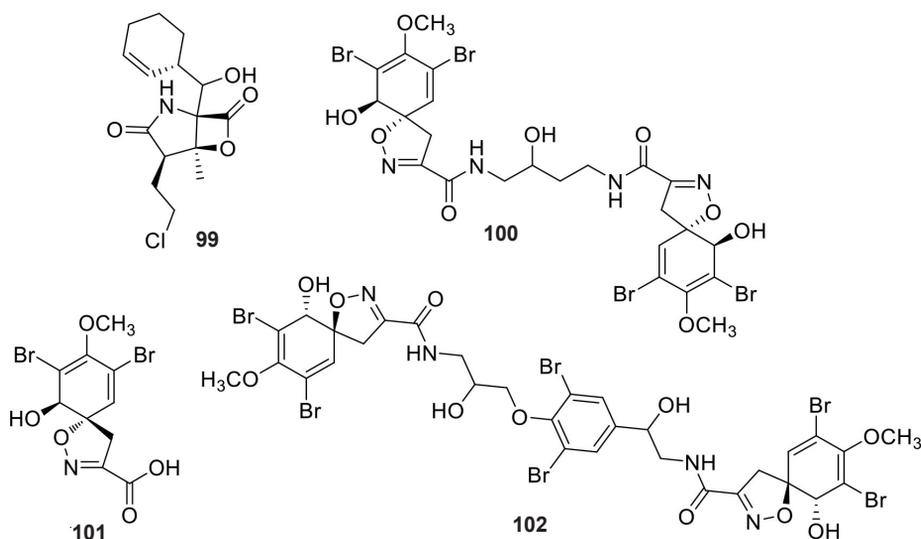


### 1.3.5 BACTÉRIAS MARINHAS

Cerca de 10<sup>6</sup> bactérias/mL podem ser encontrados na água do mar e 10<sup>9</sup> bactérias/mL em sedimentos do fundo do mar. Estudos genômicos conduzidos pelo grupo de Craig Venter revelaram mais de 1,2 milhão de novos genes de DNA microbiano a partir de uma amostra de 1.500 litros de água da superfície ao largo da costa das Bermudas, no Atlântico Norte. Desde o início

dos anos 90 observa-se um aumento no número de produtos naturais isolados a partir de meios de cultivo de bactérias marinhas. Entre 1997 e 2008, os 659 compostos produzidos por bactérias marinhas, isolados e identificados, foram encontrados em Bacteroides (34), Firmicutes (35), Proteobacteria (78), Cianobacteria (220) e Actinobacteria (256). Dentre os actinomicetos, bactérias dos gêneros *Streptomyces* (57%) e *Salinispora* (28%) mostraram ser as mais prolíficas.

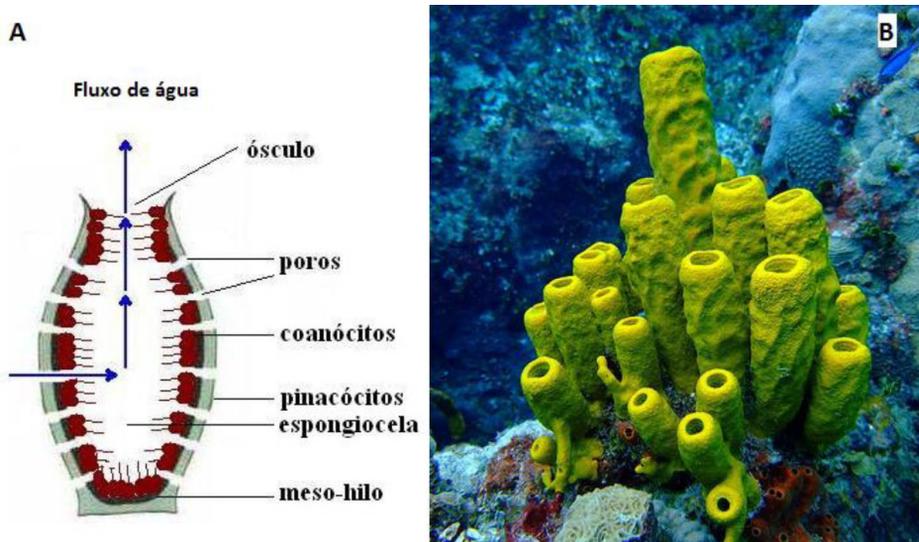
Dentre os 20 metabólitos secundários de origem marinha atualmente em ensaios clínicos, 16 são de origem microbiana. Dentre esses os mais importantes são a briostatina 1 (**8**), ecteinascidina-743 (**9**) e a salinosporamida A (**99**). Isolada de culturas de *Salinispora tropica*, a salinosporamida A (**99**) apresenta potente atividade inibitória do proteassomo 20S, um alvo terapêutico amplamente utilizado na quimioterapia de vários tipos de câncer. Embora a síntese total da salinosporamida A tenha sido realizada, para testes clínicos o composto é produzido por fermentação sob parâmetros otimizados. O cultivo em meio líquido de *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 resultou no isolamento da 11-hidroxiaerotonina (**100**), do ácido verongidoico (**101**) e da 3-fistularina (**102**). Esses metabólitos haviam sido previamente isolados apenas a partir de esponjas marinhas.



### 1.3.6 ESPONJAS MARINHAS

Pertencentes ao filo Porifera, esponjas constituem o grupo mais antigo de metazoários existente. Espongiários são animais exclusivamente aquáticos, marinhos ou de água doce, sésseis e que se alimentam por filtração da água, retirando micropartículas de alimentos ou matéria orgânica dissolvida. Segundo a organização World Porifera Database (WPD), atualmente existem 9.063 espécies descritas no filo Porifera, divididas em cinco classes: Calcarea, Demospongiae, Hexactinellida, Homoscleromorpha e Porifera incertae sedis. Dentre as cinco classes, destaca-se a classe Demospongiae, que apresenta mais de 80% de todas as espécies do filo Porifera.

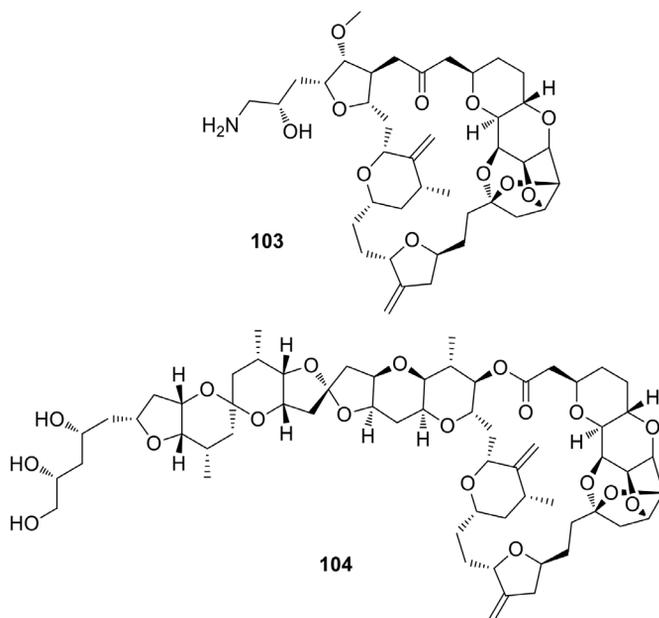
Esses organismos apresentam células especializadas para uma variedade de funções vitais. No entanto, não são organizadas em tecidos ou órgãos. A superfície externa do corpo das esponjas, denominada pinacoderme, possui células achatadas, em forma de T, conhecidas como pinacócitos. Essas câmaras possuem um revestimento de células portadoras de flagelos, as quais dão origem a correntes de água necessárias para a atividade de filtração. No ápice do corpo da esponja há uma abertura denominada ósculo (Figura 4). Internamente, possuem uma cavidade denominada átrio ou espongiocele. A água que circunda o corpo das esponjas penetra pelos poros, é direcionada até a espongiocele e encontra sua saída pelo ósculo. Pela filtração de água as esponjas obtêm oxigênio e alimento, e eliminam resíduos de seu metabolismo. O espaço entre os canais e as câmaras é preenchido com uma matriz de colágeno denominada mesoílo, que abriga células individuais e propicia suporte às fibras e estruturas inorgânicas do esqueleto.



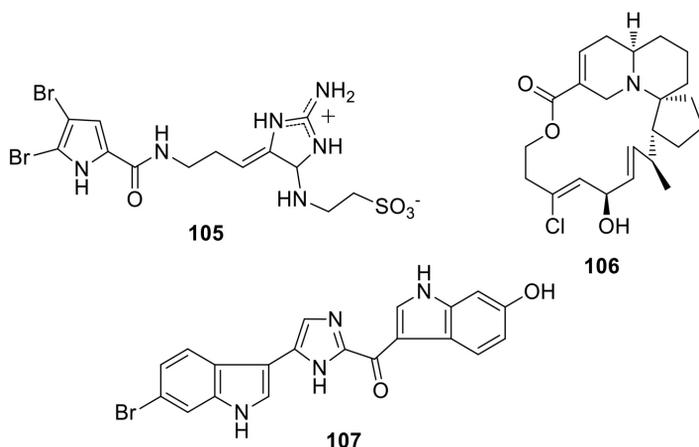
**Figura 4.** Esponja. (A) Esquema simplificado da estrutura de uma esponja (fonte da imagem: <http://www.ucmp.berkeley.edu/porifera/poriferamm.html>). (B) *Aplysina fistularis* (fonte da imagem: <https://br.pinterest.com/pin/680958406126989441>).

As formas das esponjas são variadas entre diferentes espécies, mas podem variar também entre indivíduos da mesma espécie, em resposta a fatores ambientais como luz, turbidez e temperatura. Por serem organismos filtradores, as esponjas têm diversos papéis ecológicos importantes – por exemplo, o de transportar nutrientes da coluna de água para as comunidades bentônicas. A organização corporal simples, juntamente com a relativa plasticidade de elementos celulares e a tolerância única a organismos simbiotes, confere às esponjas a capacidade de desenvolver “soluções evolutivas” para problemas ambientais.

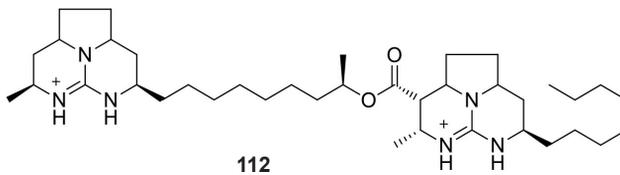
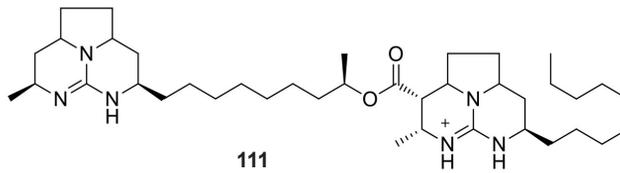
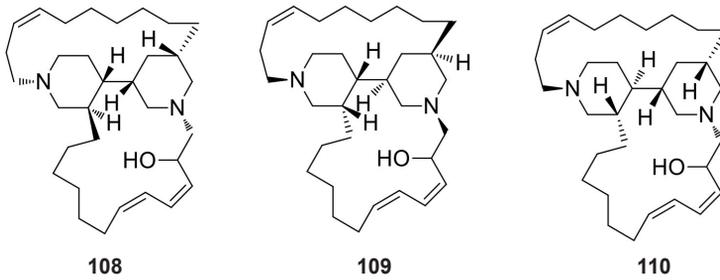
Dentre diversos compostos obtidos a partir de esponjas, a eribulina (Halaven®, 103) é um fármaco sintético que possui como modelo a estrutura do policetídeo halichondrina B (104), isolado da esponja *Halichondria okadae*. Esse fármaco interage com a tubulina, inibindo a divisão celular, sendo utilizado como agente antitumoral.



O alcaloide taurodispacamida A (**105**) foi isolado de *Agelas oroides*, e apresentou atividade imunossupressora, sendo inibidor da interleucina-2. A haliclorina (**106**), um azapolicetídeo cíclico, foi isolada da esponja *Halichondria okadai*, e apresenta atividade de inibição da VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular). Como antagonista do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, o alcaloide bromotopsentina (**107**) foi isolado da esponja *Spongosorites* sp.



A esponja *Arenosclera brasiliensis* forneceu as arenosclerinas A (**108**), B (**109**) e C (**110**), com atividades citotóxicas e antibióticas, enquanto a esponja *Monanchora arbuscula* forneceu os alcaloides guanidínicos batzelladina L (**111**) e nor-batzelladina L (**112**), ativos contra parasitas causadores de leishmaniose e doença de Chagas.



## 2 ABORDAGENS METODOLÓGICAS PARA A DESCOBERTA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ORGANISMOS MARINHOS

### 2.1 COLETA E PRESERVAÇÃO

Macro-organismos marinhos são em geral coletados por mergulho livre e autônomo (*scuba*). A identificação das amostras é realizada por especialistas para a posterior análise morfológica e genética. Micro-organismos oriundos do ambiente marinho são isolados a partir de macro-organismos e de sedimentos marinhos. Partes dos macro-organismos são depositados em placas de Petri em diferentes meios de cultura. Sedimentos marinhos são coletados do fundo do mar e alíquotas das amostras são transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura. Placas de cultivo utilizadas para isolamento dos micro-organismos são preparadas com meios de cultura diversos, visando alcançar a maior diversidade possível de micro-organismos. Após obtidos, são sub-aliquotados até a obtenção de culturas puras. Linhagens bacterianas são comumente preservadas em baixas temperaturas ou em frascos contendo meio de cultura e glicerol (20%). Já linhagens fúngicas são comumente armazenadas em geladeira ou dessecador.

## 2.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

### 2.2.1 EXTRAÇÃO

São três as abordagens principais para a extração de organismos marinhos. Na extração por maceração, a matriz biológica é deixada em solvente, de algumas horas a poucos dias. Após o período de extração, o extrato é filtrado, o solvente evaporado, seco e armazenado em geladeira. Agitação ou sonicação podem ser utilizadas para homogeneização do material a ser extraído. No caso de meios de cultura microbianos estes são comumente extraídos com solventes orgânicos imiscíveis com H<sub>2</sub>O.

## 2.3 ANÁLISE DE EXTRATOS

Macro- e micro-organismos produzem extratos complexos, que dependem da diversidade de seu metabolismo secundário e das propriedades físico-químicas dos metabólitos. A aplicação de técnicas de desrepliação é uma das etapas essenciais na descoberta de produtos naturais inéditos.

O termo “desrepliação” se refere à estratégia para minimizar o reisolamento de substâncias conhecidas, por meio de técnicas analíticas combinadas com informações de bancos de dados. Dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se: CLAE-EM, CLAE-DAD, CLAE-RMN e CG-EM (CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; EM: espectrometria de massas; DAD: detector arranjo de diodos; RMN: ressonância magnética nuclear; CG: cromatografia gasosa). A desrepliação permite obter o perfil químico do extrato bruto, a partir dos dados de absorção no ultravioleta-visível, de espectros de massas e/ou espectros de RMN. As informações obtidas são analisadas em conjunto com informações de bancos de dados (*Dictionary of Natural Products*, *Antimarin*, *MarinLit* e *Molecular Networking*), com o objetivo de evidenciar substâncias já conhecidas.

## 2.4 ABORDAGENS PARA O ISOLAMENTO DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

Uma vez selecionados os extratos a serem investigados, pode-se realizar partições líquido-líquido com diferentes misturas de solventes, de modo a obter extratos com diferentes polaridades. Frações aquosas são geralmente descartadas, mas podem ser submetidas à separação por cromatografia em coluna de fase reversa de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C<sub>18</sub>). Caso frações orgânicas sejam de interesse, usualmente são submetidas a separações por cromatografia em gel de Sephadex LH-20 ou em colunas de sílica-gel derivatizada com grupos amino, diol ou cianopropila. Separações e purificações subsequentes são usualmente realizadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

## 2.5 IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

A interpretação de dados espectroscópicos para a identificação de produtos isolados

de fontes naturais constitui a faceta mais intelectualizada na pesquisa de produtos naturais, e requer considerável nível de conhecimento de maneira a evitar enganos e erros, frequentemente observados na literatura.

O primeiro passo ao realizar a determinação estrutural de um composto é estabelecer sua fórmula molecular. Isso pode ser feito com a obtenção de espectros de massas de alta resolução. A contagem do número de hidrogênios pela integração dos sinais de espectros de RMN- $^1\text{H}$  conduz, em grande número de casos, a incertezas. Assim, deve-se realizar a contagem do número de hidrogênios estabelecendo a multiplicidade dos carbonos que constituem a molécula. Diversas técnicas de espectroscopia de RMN- $^{13}\text{C}$  podem ser aplicadas para esse fim, como APT (*attached proton test*) e DEPT (*distortionless enhancement by polarization transfer*). Esta última é a mais utilizada, porque sua dependência de valores de constantes de acoplamento  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  é baixa, e sua sensibilidade não é muito diminuída devido a possíveis inhomogeneidades de campo magnético do equipamento. Atribuem-se correlações diretas  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  por meio de experimentos de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , como HMBC e HSQC. Muito menos fácil é a determinação de hidrogênios ativos, presentes em grupos hidroxila, amina e tióis, implícitos ou não em outros grupos funcionais. A contagem de hidrogênios ativos por RMN- $^1\text{H}$  não é tão fácil devido muitas vezes à presença de traços de água na amostra e à frequente sobreposição de sinais desses hidrogênios.

Fragmentos de cadeias de carbonos que contêm hidrogênios diretamente ligados são estabelecidos por meio de técnicas de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQF-COSY, TOCSY e HSQC-TOCSY. Com esses dados em mãos, é possível conhecer os diversos fragmentos do composto analisado.

Com o intuito de conectar os diversos fragmentos obtidos por correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , deve-se estabelecer as conexões através de carbonos quaternários. Utiliza-se HMBC (*hetero-nuclear multiple bond connectivity*), que faz uso da detecção inversa para a verificação dos acoplamentos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância.

Dados sobre a estereoquímica dos centros assimétricos e de relações de estereoquímica entre os átomos de carbono podem ser estabelecidos por análises do espectro de RMN- $^1\text{H}$  e espectros de experiências de nOe (*nuclear Overhauser enhancement*). A observação de efeito nOe entre hidrogênios depende da distância interatômica, natureza de grupos funcionais na sua proximidade, cuidados na preparação da amostra. Não se pode afirmar que quando da ausência de efeito nOe os núcleos estão muito distantes entre si e não ocorre acoplamento dipolar. As técnicas de nOe, mono- ou bidimensionais, podem fornecer informações sobre a estrutura tridimensional dos compostos analisados, estabelecendo muitas vezes relações através de carbonos quaternários. Portanto, devem ser consideradas como técnicas complementares a experiências de RMN de correlação a longa distância.

### 3

## APLICAÇÕES DA BIODIVERSIDADE NA BIOTECNOLOGIA MARINHA

Produtos naturais e seus derivados representam 36% dos novos fármacos aprovados até 2014, destacando-se antibióticos e anticarcinogênicos, que correspondem a 73% e 57% das novas substâncias em uso. A investigação de organismos marinhos demonstrou que estes são uma fonte sem precedentes de produtos naturais bioativos. Dentre os exemplos bem-sucedidos de fármacos derivados do ambiente marinho, destacam-se a espongouridina e a espongotimidina, isoladas da esponja *Cryptotethya crypta*, que inspiraram a síntese de dois nucleosídeos, o antiviral ara-A (**4**, Vidarabina<sup>®</sup>) e o antitumoral ara-C (**5**, Citarabina<sup>®</sup>), a trabectedina (**9**, ET743, Yondelis<sup>®</sup>), utilizada no tratamento de sarcomas de tecidos moles, o ziconotídeo (**79**,  $\omega$ -conotoxina, Prialt<sup>®</sup>), que reduz a percepção à dor e não apresenta tolerância após seu uso crônico, a eribulina (**103**, Halaven<sup>®</sup>), utilizada como agente antitumoral, a didemnina B (**14**) que inspirou o desenvolvimento da aplidina (**11**, Plitidepsin<sup>®</sup>). Atualmente o composto **11** encontra-se em fase III de estudos clínicos para o tratamento de diferentes tipos de tumores.

## 4 | CONCLUSÕES

Embora os produtos naturais marinhos venham sendo explorados há mais de 50 anos de maneira contínua, acredita-se que ainda exista possibilidade de descobrir inúmeros metabólitos secundários bioativos a partir de diferentes grupos de organismos marinhos. Todavia, a recorrência do reisolamento de metabólitos conhecidos deve ser evitada, utilizando-se técnicas de desrepliação ou identificação rápida de metabólitos. Além disso, bioensaios muito utilizados ou que podem fornecer falsos positivos devem ser evitados ao máximo. Micro-organismos isolados do ambiente marinho frequentemente são do ambiente terrestre, por isso devem ser empregadas técnicas adequadas para a descoberta de micro-organismos marinhos.

As perspectivas para o desenvolvimento da química de produtos naturais marinhos no mundo, e no Brasil em particular, apontam para dificuldades crescentes para a descoberta de novos metabólitos bioativos, pelo fato de estes serem parte dos metabólitos cada vez mais minoritários dos organismos investigados. Esforços contínuos e cada vez mais intensos devem ser empregados por aqueles dispostos a enfrentar tais desafios.

## REFERÊNCIAS

Arimoto, H.; Hayakawa, I.; Kuramoto, M.; Uemura, D. (1998) Absolute stereochemistry of halichlorine; a potent inhibitor of VCAM-1 induction. **Tetrahedron Letters**. 39(8): 861-862.

Baker, D.D.; Chu, M.; Oza, U.; Rajgarhia, V. (2007) The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**. 24(6): 1225-1244.

Benkendorff, K. (2010) Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. **Biological Reviews**. 85: 757-775.

Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics**. 58(1): 1.

- Bell, J.J. (2008) The functional roles of marine sponges. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 79(3): 341-353.
- Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.G.; Prinsep, M.R. (2015) Marine natural products. **Natural Product Reports**. 32: 116-211.
- Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.G.; Prinsep, M.R. (2017) Marine Natural Products. **Natural Product Reports**. 34: 235-294.
- Boardman, R.S.; Cheetham, A.H.; Blake, D.B.; Utgaard, J.; Karklins, O.L.; Cook, P.L.; Wood, T.S. (1983) **Bryozoa**. Treatise on invertebrate palaeontology, part G. Geological Society of America and University of Kansas Press, Kansas.
- Castellani, A. (1967) Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 70(8): 181-184.
- Ciavatta, M.L.; Lefranc, F.; Carbone, M.; Mollo, E.; Gavagnin, M.; Betancourt, T.; Dasari, R.; Kornienko, A.; Kiss, R. (2017) Marine mollusk-derived agents with antiproliferative activity as promising anticancer agents to overcome chemotherapy resistance. **Medicinal Research Reviews**. 37(4): 702-801.
- Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. (2006) **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp.
- Constant, H.L.; Beecher, C.W.W. (1995) A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. **Natural Product Letters**. 6: 193-196.
- Crotti, A.E.M.; Vessecchi, R.; Lopes, J.L.C.; Lopes, N.P. (2006) Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**. 29(2): 287-292.
- Cuevas, C.; Perez, M.; Martín, M.J.; Chicharro, J.L.; Fernández-Rivas, C.; Flores, M.; Francesch, A.; Gallego, P.; Zarzuelo, M.; De La Calle, F.; García, J. (2000) Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafracin B. **Organic Letters**. 2(16): 2545-2548.
- Dass, C. (2007) **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. [s.l.] John Wiley & Sons.
- Donia, M.; Hamann, M.T. (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases**. 3(6): 338-348.
- Dorée, C. (1909) The occurrence and distribution of cholesterol and allied bodies in the animal kingdom. **Biochemical Journal**. 4(1-2): 72.
- Ducklow, H. (2000) Bacterial production and biomass in the oceans. In: **Microbial Ecology of the Oceans**, (D. L. Kirchman, Ed.). 85-120. Wiley, New York.
- Ducklow, H.W.; Kirchman, D.L.; Quinby, H.L.; Carlson, C.A.; Dam, H.G. (1993) Stocks and dynamics of bacterioplankton carbon during the spring bloom in the eastern North Atlantic Ocean. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**. 40(1): 245-263.
- Erba, E.; Bergamaschi, D.; Bassano, L.; Damia, G.; Ronzoni, S.; Faircloth, G.T.; D'Incalci, M. (2001) Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. **European Journal of Cancer**. 37(1): 97-105.
- Fattorusso, E.; Tagliatalata-Scafati, O. (2000) Two novel pyrrole-imidazole alkaloids from the Mediterranean sponge *Agelas oroides*. **Tetrahedron Letters**. 41(50): 9917-9922.
- Fekete, S.; Schappler, J.; Veuthey, J.L.; Guilleme, D. (2014) Current and future trends in UHPLC. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. 63: 2-13.
- Fenical, W.; Jensen, P.R. (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature Chemical Biology**. 2(12): 666.

Fenical, W.; Jensen, P.R.; Cheng, X.C. (2000) **U.S. Patent No. 6,069,146**. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Ferreira, E.L.; Williams, D.E.; Ióca, L.P.; Morais-Urano, R.P.; Santos, M.F.; Patrick, B.O.; Elias, L.M.; Lira, S.P.; Ferreira, A.G.; Passarini, M.R.Z.; Sette, L.D.; Andersen, R.J.; Berlinck, R.G.S. (2015) Structure and biogenesis of roussoellatide, a dichlorinated polyketide from the marine-derived fungus *Roussoella* sp. DLM33. **Organic Letters**. 17(21): 5152-5155.

Figueiredo Jr, A.G.; Brehme, I. (2000) Amostragem geológica na pesquisa mineral. **Brazilian Journal of Geophysics**. 18(3): 269-280.

Gerwick, W.H.; Fenner, A.M. (2013) Drug discovery from marine microbes. **Microbial Ecology**. 65(4): 800-806.

Groll, M.; McArthur, K.A.; Macherla, V.R.; Manam, R.R.; Potts, B.C. (2009) Snapshots of the fluorosalinoliposporamide/20S complex offer mechanistic insights for fine tuning proteasome inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**. 52(17): 5420-5428.

Häussermann, V. (2010) Protocol for sampling and preservation of marine organisms. In: **Marine Benthic Fauna of Chilean Patagonia**. Nature in Focus, Chile, p. 88-92.

Hegazy, M.E.F.; Mohamed, T.A.; Alhammady, M.A.; Shaheen, A.M.; Reda, E.H.; Elshamy, A.I.; Paré, P.W. (2015) Molecular architecture and biomedical leads of terpenes from red sea marine invertebrates. **Marine Drugs**. 13(5): 3154-3181.

Henze, M. (1909) Spongosterol, the cholesterol of *Suberites domuncula*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur **Physiologische Chemie**. 55: 427-432.

Hu, G.P.; Yuan, J.; Sun, L.; She, Z.G.; Wu, J.H.; Lan, X.J.; Zhu, X.; Lin, Y.C.; Chen, S.P. (2011) Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**. 9, 514-525.

Imhoff, J.F. (2016) Natural products from marine fungi – Still an underrepresented resource. **Marine Drugs**. 14(1): 19.

Ióca, L.P.; Romminger, S.; Santos, M.F.C.; Bandeira, K.F.; Rodrigues, F.T.; Kossuga, M.H.; Nicacio, K.J.; Ferreira, E.L.F.; Morais-Urano, R.P.; Passos, M.S.; Kohn, L.K.; Arns, C.W.; Sette, L.D.; Berlinck, R.G.S. (2016) A strategy for the rapid identification of fungal metabolites and the discovery of the antiviral activity of pyrenocine A and harzianopyridone. **Química Nova**. 39(6): 720-731.

Jensen, P.R.; Moore, B.S.; Fenical, W. (2015) The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. **Natural Product Reports**. 32(5): 738-751.

Katsuragawa, M. (2012) **Métodos e técnicas de estudo em oceanografia**. Material didático, Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo. Disponível em: <ftp://ftp.io.usp.br/lado/2100107/OcnBiologica/metodos\_bio.doc>. Acesso em: 03 ago. 2017.

Kelecom, A. (1999) Chemistry of marine natural products: Yesterday, today and tomorrow. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 71(2): 249-263.

Kijjoa, A.; Sawangwong, P. (2004) Drugs and cosmetics from the sea. **Marine Drugs**. 2(2), 73-82.

Kohlmeyer, J.; Kohlmeyer, E. (1979) **Marine mycology. The higher fungi**. Academic Press, New York.

König, G.M.; Wright, A.D. (1996) Marine natural products research: current directions and future potential. **Planta Medica**. 62(03): 193-211.

König, G.M.; Kehraus, S.; Seibert, S.F.; Abdel-Lateff, A.; Müller, D. (2006) Natural products from marine organisms and their associated microbes. **ChemBioChem**. 7(2): 229-238.

Kossuga, M.H.; Lira, S.P.D.; Nascimento, A.M.; Gambardella, M.T.P.; Berlinck, R.G.D.S.; Torres, Y.R.; Oliveira, G. (2007) Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascidia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*. **Química nova**, 30(5), 1194-1202.

Kossuga, M.H.; MacMillan, J.B.; Rogers, E.W.; Molinski, T.F.; Nascimento, G.G.; Rocha, R.M.; Berlinck, R. G. (2004) (2S,3R)-2-Aminododecan-3-ol, a new antifungal agent from the ascidian *Clavelina oblonga*. **Journal of Natural Products**, 67(11): 1879-1881.

Kossuga, M.H.; Romminger, S.; Xavier, C.; Milenetto, M.C.; Valle, M.Z.; Pimenta, E.F.; Morais, R. P.; Carvalho, E.; Mizuno, C.M.; Coradello, L.F.C.; Barroso, V.M.; Vacondio, B.; Javaroti, D.C.D.; Selegim, M.H.R.; Cavalcanti, B.C.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Lima, B.A.; Gonçalves R.; Bonugli-Santos, R.C.; Sette, L.D.; Berlinck, R.G.S. (2012) Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 22(2): 257-267.

Küster, E.; Williams, S.T. (1964) Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, 202: 928-929.

Lanças, F.M. (2009) A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, 5(1): 27-46.

Lu, Y.; Woo, S.K.; Krische, M.J. (2011) Total synthesis of bryostatin 7 via C-C bond-forming hydrogenation. **Journal of the American Chemical Society**, 133(35): 13876-13879.

Maltseva, A.L.; Kotenko, O.N.; Kutymov, V.A.; Matvienko, D.A.; Shavarda, A.L.; Winson, M.K.; Ostrovsky, A.N. (2017) Novel brominated metabolites from Bryozoa: a functional analysis. **Natural Product Research**, 31(16): 1840-1848.

Manam, R.R.; Macherla, V.R.; Tsueng, G.; Dring, C.W.; Weiss, J.; Neuteboom, S.T.; Potts, B.C. (2009) Antiprotealide is a natural product. **Journal of Natural Products**, 72(2): 295-297.

Martins, A.; Vieira, H.; Gaspar, H.; Santos, S. (2014) Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. **Marine Drugs**, 12: 1066-1101.

Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Hashimoto, K. (1986) Bioactive marine metabolites. VIII. Isolation of an antimicrobial blue pigment from the bryozoan *Bugula dentata*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 42(1): 84-84.

Mayer, A.M.; Rodríguez, A.D.; Berlinck, R.G.; Hamann, M.T. (2007) Marine pharmacology in 2003-4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 145(4): 553-581.

Mendola, D. (2000) **Aquacultural production of bryostatin 1 and ecteinascidin 743**. Karger: Basel, 120-133.

Michael, P.; Hansen, K.Ø.; Isaksson, J.; Andersen, J.H.; Hansen, E. (2017) A novel brominated alkaloid securidine A, isolated from the marine bryozoan *Securiflustra securifrons*. **Molecules**, 22(7): 1236.

Molinski, T.F. (2010) Microscale methodology for structure elucidation of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, 21: 819-826.

Montaser, R.; Luesch, H. (2011) Marine natural products: a new wave of drugs? **Future Medicinal Chemistry**, 12(3): 1475-1489.

Murray, A.P.; Faraoni, M.B.; Castro, M.J.; Alza, N.P.; Cavallaro, V. (2013) Natural AChE inhibitors from

- plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. **Current Neuropharmacology**. 11(4): 388-413.
- Murray, K.K.; Boyd, R.K.; Eberlin, M.N.; Langley, G.J.; Li, L.; Naito, Y. (2013) Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**. 85(7): 1515-1609.
- Nicacio, K.J.; Lôca, L.P.; Fróes, A.M.; Leomil, L.; Appolinario, L.R.; Thompson, C.C.; Ferreira, A.G.; Williams, D.E.; Andersen, R.; Eustaquio, A.S.; Berlinck, R.G.S. (2017) Cultures of the marine bacterium *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 produce bromotyrosine-derived alkaloids previously only isolated from marine sponges. **Journal of Natural Products**. 80(2), 235-240.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2004) Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. **Current Medicinal Chemistry**. 11: 1693-1713.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 and 2014. **Journal of Natural Products**. 79(3): 629-661.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2004) Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**. 67(8): 1216-1238.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2016) Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current "state of play". **Planta Medica**. 82(09/10): 775-789.
- Patiño, C.L.P.; Muniain, C.; Knott, M.E.; Puricelli, L.; Palermo, J.A. (2014) Bromopyrrole alkaloids isolated from the patagonian bryozoan *Aspidostoma giganteum*. **Journal of Natural Products**. 77(5): 1170-1178.
- Peraud, O.; Biggs, J.S.; Hughen, R.W.; Light, A.R.; Concepcion, G.P.; Olivera, B.M.; Schmidt, E.W. (2009) Microhabitats within venomous cone snails contain diverse actinobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 75(21): 6820-6826.
- Pereira, F. R. (2011) **Metabólitos secundários bioativos e mediadores de relação predador/presa de invertebrados marinhos**. (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Pereira, R.B.; Andrade, P.B.; Valentão, P. (2016) Chemical diversity and biological properties of secondary metabolites from sea hares of *Aplysia* genus. **Marine Drugs**. 14(2): 39-71.
- Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.D.S.; Lopes, N.P.; Epifanio, R.D.A. (2002) Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. 45-61.
- Phife, D.W.; Ramos, R.A.; Feng, M.; King, I.; Gunasekera, S.P.; Wright, A.; Coval, S.J. (1996) Marine sponge bis (indole) alkaloids that displace ligand binding to  $\alpha 1$  adrenergic receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 6(17): 2103-2106.
- Prakash, O.; Nimonkar, Y.; Shouche, Y. S. (2013) Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS Microbiology Letters**. 339(1): 1-9.
- Rateb, M.E.; Ebel, R. (2011) Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**. 28(2): 290-344.
- Rochfort, S.J.; Moore, S.; Craft, C.; Martin, N.H.; Van Wagoner, R.M.; Wright, J.L. (2009) Further studies on the chemistry of the flustra alkaloids from the bryozoan *Flustra foliacea*. **Journal of Natural Products**. 72(10): 1773-1781.
- Rodriguez, J.P.; Williams, D.E.; Sabater, I.D.; Bonugli-Santos, R.C.; Sette, L.D.; Andersen, R.J.; Berlinck, R.G. (2015) The marine-derived fungus *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 degrades the dye Remazol Brilliant Blue R producing anthraquinones and unique tremulane sesquiterpenes. **RSC Advances**. 5(81): 66360-66366.
- Ruppert, E.E.; Barnes, R.D. (1994) **Invertebrate zoology (No. 592 BAR)**. Fort Worth: Saunders College Publishing.
- Saleem, M.; Ali, M.S.; Hussain, S.; Jabbar, A.; Ashraf, M.; Lee, Y.S. (2007) Marine natural products of

fungal origin. **Natural Product Reports**. 24(5): 1142-1152.

Santos, M.F.; Harper, P.M.; Williams, D.E.; Mesquita, J.T.; Pinto, E.G.; da Costa-Silva, T.A.; Hadju, E.; Ferreira, A.G.; Santos, R.A.; Murphy, P.J.; Andersen, J.; Tempone, A.G.; Berlinck, R.G. (2015) Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora arbuscula*. **Journal of Natural Products**. 78(5): 1101-1112.

Sarker, S.D.; Latif, Z.; Gray, A.I. (Eds.). (2005) **Natural products isolation** (Vol. 20). Springer Science & Business Media.

Schofield, M.M.; Jain, S.; Porat, D.; Dick, G.J.; Sherman, D.H. (2015) Identification and analysis of the bacterial endosymbiont specialized for production of the chemotherapeutic natural product ET-743. **Environmental Microbiology**. 17(10): 3964-3975.

Sette, L.D. (2005) **Técnicas de preservação de microrganismos**. Material didático, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade de Campinas. Disponível em: <www.cria.org.br/eventos/confmt/presentations/Preservacao.ppt>. Acesso em: 01 ago. 2017.

Sharp, J.H.; Winson, M.K.; Porter, J.S. (2007) Bryozoan metabolites: an ecological perspective. **Natural Product Reports**. 24(4): 659-673.

Sipkema, D.; Franssen, M.C.; Osinga, R.; Tramper, J.; Wijffels, R.H. (2005) Marine sponges as pharmacy. **Marine Biotechnology**. 7(3): 142.

Skropeta, D.; Wei, L. (2014) Recent advances in deep-sea natural products. **Natural Product Reports**. 31(8): 999-1025.

Sudek, S.; Lopanik, N.B.; Waggoner, L.E.; Hildebrand, M.; Anderson, C.; Liu, H.; Haygood, M.G. (2007) Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "*Candidatus Endobugula sertula*", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. **Journal of Natural Products**. 70(1): 67-74.

Tahara, M. (1910) Über die Kernteilung bei Morus. **Shokubutsugaku Zasshi**. 24(287): 281-289.

Tang, Y.; Cole, K.P.; Buchanan, G.S.; Li, G.; Hsung, R.P. (2009) Total synthesis of phomactin A. **Organic Letters**. 11(7): 1591-1594.

Teixeira, V.L. (2010) **Caracterização do estado da arte em biotecnologia marinha no Brasil**. Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde; Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília. 134 pp.

Teixeira, V.L. (2009) Produtos naturais marinhos. In: Pereira, R.C.; Soares-Gomes, A. **Biologia marinha**. Ed. Interciência, Rio de Janeiro. pp. 443-472.

Tian, X. R., Gao, Y. Q., Tian, X. L., Li, J., Tang, H. F., Li, Y. S., Lin, H. W., Ma, Z. Q. (2017). New cytotoxic secondary metabolites from marine bryozoan *Cryptosula pallasiana*. **Marine Drugs**. 15(4), 120.

Torres, Y.R.; Berlinck, R.G.; Nascimento, G.G.; Fortier, S.C.; Pessoa, C.; de Moraes, M.O. (2002) Anti-bacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **Toxicon**. 40(7). 885-891.

Trindade-Silva, A.E.; Lim-Fong, G.E.; Sharp, K.H.; Haygood, M.G. (2010) Bryostatins: biological context and biotechnological prospects. **Current Opinion in Biotechnology**. 21(6): 834-842.

Vaishnav, P.; Demain, A.L. (2011) Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. 29(2), 223-229.

Van Soest, R.W.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Erpenbeck, D.; De Voogd, N.J.; Hooper, J.N. (2012) Global diversity of sponges (Porifera). **PLoS One**. 7(4): e35105.

Van Soest, R.W.; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.N.A.; Rützler, K.; de Voogd, N.J.; Alvarez de Glasby, B.;

Hajdu, E.; Pisera, A.B.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Klautau, M.; Picton, B.; Kelly, M.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Díaz, M.-C.; Cárdenas, P.; Carballo, J. L.; Rios Lopez, P. (2017). **World porifera database**. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/porifera> on 2017-08-16. Acesso em: 01-08-2017.

Venter, J.C.; Remington, K.; Heidelberg, J.F.; Halpern, A.L.; Rusch, D.; Eisen, J.A.; Fouts, D.E. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**. 304(5667): 66-74.

Vieira, L.M.; Almeida, A.C.S.; Fehlauer-Ale, K.H.; Migotto, A.E. (2015). Filo Bryozoa: novas perspectivas no estudo da biodiversidade marinha no Brasil. **Informativo Sociedade Brasileira de Zoologia**. 27(113): 4-6.

Wagenaar, M.M. (2008) Pre-fractionated microbial samples – the second generation natural products library at Wyeth. **Molecules**. 13(6): 1406-1426.

Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Porto, C. (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with GNPS. **Nature Biotechnology**. 34(8): 828.

Wender, P.A.; Baryza, J.L.; Brenner, S.E.; DeChristopher, B.A.; Loy, B.A.; Schrier, A.J.; Verma, V.A. (2011) Design, synthesis, and evaluation of potent bryostatin analogs that modulate PKC translocation selectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 108(17): 6721-6726.

Williams, P.G. (2009) Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. **Trends Biotechnology**. 27(1): 45-52.

Wolfender, J.L. (2009) HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**. 75(07): 719-734.

Wolfender, J.L.; Marti, G.; Thomas, A.; Bertrand, S. (2015) Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**. 1382, 136-164.

Wolfender, J.L.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K. (2003) Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectrometry: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**. 1000(1): 437-455.

Wu, B.; Ohlendorf, B.; Oesker, V.; Wiese, J.; Malien, S.; Schmaljohann, R.; Imhoff, J.F. (2015) Acetylcholinesterase inhibitors from a marine fungus *Talaromyces* sp. strain LF458. **Marine Biotechnology**. 17(1): 110-119.

Xiong, Z.Q.; Wang, J.F.; Hao, Y.Y.; Wang, Y. (2013) Recent advances in the discovery and development of marine microbial natural products. **Marine Drugs**. 11: 700-717.

Xu, Y.; Kersten, R.D.; Nam, S.J.; Lu, L.; Al-Suwailem, A. M.; Zheng, H.; Qian, P.Y. (2012) Bacterial biosynthesis and maturation of the didemnin anti-cancer agents. **Journal of the American Chemical Society**, 134(20), 8625-8632.

Zhang, L.; An, R.; Wang, J.; Sun, N.; Zhang, S.; Hu, J.; Kuai, J. (2005) Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. **Current Opinion in Microbiology**. 8(3): 276-281.





# ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM MARINHA

Carla Simone Vizzotto<sup>a</sup>  
Samuel D. Araújo Júnior<sup>a</sup>  
Ricardo Henrique Krüger<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade de Brasília

## RESUMO

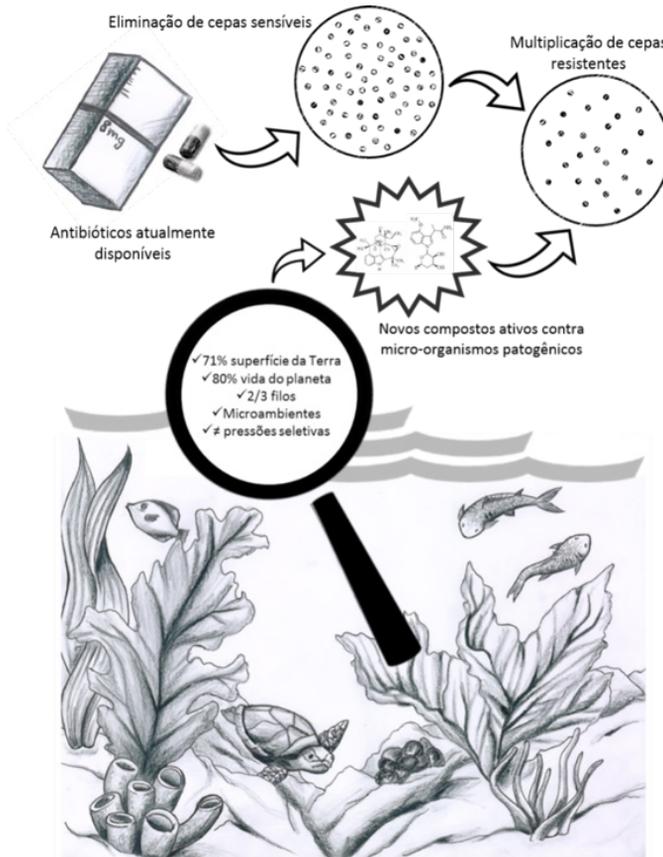
A descoberta de moléculas com atividade antimicrobiana e o desenvolvimento dos antibióticos revolucionaram a ciência e a medicina. Ao longo da evolução da ciência, descobriu-se que as formas de vida marinha são uma grande fonte para a busca de novos compostos com atividade antimicrobiana. Devido à atual necessidade de novos tipos de antimicrobianos para controlar patógenos multirresistentes e novos agentes infecciosos emergentes, a quimiodiversidade marinha é uma das alternativas mais promissoras para a busca de novos antibióticos.

# 1 | INTRODUÇÃO

A descoberta de moléculas com atividade antimicrobiana e o desenvolvimento dos antibióticos revolucionaram a ciência e a medicina. Entretanto, o amplo uso dessas drogas, associado à plasticidade metabólica dos micro-organismos e outros fatores, vem resultando no surgimento de cepas resistentes. A resistência microbiana aos antibióticos é um dos maiores problemas de saúde no mundo. A busca por novas moléculas, mecanismos de ação e terapias alternativas é uma necessidade urgente. O desenvolvimento de novos produtos bioativos demanda um longo processo, que muitas vezes se inicia na caracterização e descoberta de biodiversidade com potencial biotecnológico. Atualmente, o número de antibióticos isolados a partir de organismos terrestres é muito superior aos obtidos a partir de fontes marinhas, em contradição com as dimensões de oceanos a serem explorados. Produtos naturais derivados do ambiente marinho são estruturalmente diversos e diferem daqueles identificados no ambiente terrestre, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

O ambiente marinho exerce grande pressão seletiva sobre os organismos. Os indivíduos estão sujeitos a condições variadas de pressão, salinidade, estresse osmótico, intensidade luminosa, radiação ultravioleta, concentração de oxigênio e outras. Além das características físico-químicas, as complexas relações ecológicas estabelecidas exigem dos seres a capacidade de resistir à herbivoria, predação, competição por espaço ou recursos e resistência aos micro-organismos patogênicos. Todas essas condições levam à produção de uma constelação de biomoléculas que permitem a sobrevivência nesse meio. Nesse cenário, as formas de vida marinha são uma grande fonte para a busca de novos compostos com atividade antimicrobiana (Figura 1).

A investigação de novas moléculas no ambiente marinho permeia diferentes filos. Algas, corais, esponjas, moluscos e outros animais marinhos são fonte para pesquisas de novos componentes que podem ser sintetizados quimicamente. Bactérias e fungos são alvos muito visados, pois apresentam grande diversidade e podem ser cultivados com relativa facilidade em reatores. Muitas vezes não é possível definir a verdadeira origem do produto, se é produzido pelo hospedeiro a partir do qual foi descrito ou pela microbiota associada. O avanço das técnicas analíticas tem contribuído para a resolução dessa questão, aliando as análises farmacológicas e bioquímicas dos compostos à identificação das suas vias genéticas de expressão. Ao longo deste capítulo serão apresentados exemplos de moléculas de origem marinha que já foram testadas contra diversos micro-organismos. Os compostos estão ordenados de acordo com as fontes a partir das quais foram obtidos e, sempre que houver necessidade, haverá destaque no texto sobre a associação com a microbiota para a síntese. A tabela 1 apresenta um resumo de moléculas testadas contra micro-organismos.



**Figura 1.** Prospecção de novos compostos antibióticos a partir da biodiversidade marinha. O mar é fonte importante para a busca de novos compostos antimicrobianos, principalmente contra o crescente número de cepas multirresistentes. O ambiente marinho cobre mais de 70% da superfície terrestre, abriga 80% da vida do planeta e cerca de 2/3 dos organismos em cada filo de seres vivos são predominantemente marinhos. Esses números, somados à diversidade de microambientes e às diferentes pressões seletivas, tais como pressão, salinidade, concentração de oxigênio, entre outras; resultam na produção de grande diversidade de biomoléculas ativas contra micro-organismos. Ilustração de Clarissa Krüger, com adaptações.

## 2 | VERTEBRADOS

Em vertebrados marinhos, como os peixes e répteis, existem descritas moléculas de natureza proteica com potencial antibiótico, muitas delas já bem conhecidas em mamíferos ou no ambiente terrestre, e que agora vêm sendo descobertas e pesquisadas no ambiente marinho. Seguem alguns exemplos. A lecitina tetramérica manose-específica 180-kDa, proveniente de ovário de *Rachycentron canadum*, apresentou atividade contra *Escherichia coli* com 50% de inibição com 250µg. Algumas lecitinas terrestres apresentam atividade antiviral, mas tal fato ainda não é consolidado para lecitinas isoladas no ambiente marinho. As catelicidinas são antimicrobianos que regulam a imunidade inata em mamíferos, mas o conhecimento sobre a atividade desse grupo em peixes ainda é limitado. Em salmão do Atlântico as catelicidina 1 e 2 tiveram participação direta no combate à *E. coli* e *Vibrio anguillarum*. Algumas proteínas como a proteína C-reativa e IRF1 (*interferon regulatory factor 1*) tiveram sua expressão aumentada em *Cynoglossus semilaevis* após infecção por bactérias como *V. anguillarum*. A proteína C-reativa recombinante de *C. semilaevis* apresentou interação com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O pep-

tídeo C-Hepcidina<sup>3</sup> recombinante de *Epinephelus coioides* apresentou atividade contra *Pseudomonas stutzeri* e *Staphylococcus aureus*. Infecção bacteriana induziu a expressão de lisozima tipo-C em *Scophthalmus maximus* e a expressão da proteína recombinante apresentou atividade contra Gram-positivas e Gram-negativas. Em ovos da tartaruga marinha *Caretta caretta* identificou-se a presença de um peptídeo catiônico com estrutura terciária análoga às beta-defensinas de vertebrados. Essa proteína apresentou potente efeito inibidor contra *E. coli* e *Salmonella typhimurium*.

## 3 | INVERTEBRADOS

Os animais invertebrados marinhos, como esponjas e corais, são uma fonte muito rica para a busca de compostos naturais de estrutura única, pois abrigam uma diversidade e variedade de micro-organismos associados. Um grande número de moléculas tem sido descrito nos últimos anos. Toda essa diversidade pode estar relacionada com a associação desses animais a micro-organismos, formando um microbioma específico e característico. Micro-organismos e hospedeiro formam um sistema chamado de holobionte e a simbiose entre eles resulta na produção de uma variedade muito grande de compostos, que permite a comunicação química e garante benefícios a ambos.

Dois alcenos sulfatados, (5Z)-dec-5-en-1-ylsulfato e (3E)dec-3-en-1-yl sulfato, foram isolados do pepino-do-mar *Apostichopus japonicus* e possuem atividade contra *E. coli*.

O extrato metanólico do molusco *Melo melo* demonstrou atividade contra *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Klebsiella pneumoniae*. Os princípios ativos responsáveis por tal atividade ainda não estão elucidados.

Em artrópodos, os fatores antilipopolissacarídicos são proteínas bastante descritas e com ação contra várias Gram-positivas e Gram-negativas. A quitosana, componente do exoesqueleto de artrópodos, possui característica catiônica, capaz de interagir com a superfície aniônica de Gram-negativos, como *E. coli*. A associação da quitosana com componentes como amônia, piridina e piperazina pode aumentar sua carga positiva e favorecer a interação com superfícies carregadas negativamente. Suas propriedades antimicrobianas também têm sido alvo de pesquisas.

### 3.1 CNIDÁRIOS/CORAIS

Corais são organismos abundantes nos oceanos em zonas costeiras e águas profundas e possuem grande importância. Participam na transferência de matéria e energia na cadeia trófica, apresentam alta diversidade genética, são fontes de compostos bioativos e formam arrecifes, os quais servem de habitat para diferentes organismos. Arrecifes de corais são ecossistemas extremamente importantes para a economia de diversos países, por meio da pesca e do turismo. Além disso, são conhecidos pela sua extraordinária beleza natural, alta produtividade

e por abrigarem comunidades diversas e abundantes de micro-organismos.

O primeiro estudo de atividade antimicrobiana de corais foi realizado por Burkholder e Burkholder, em 1958, em octocorais gorgonianos do Caribe. Naquele estudo foram testados pedaços dos corais de diversas espécies, colocados em placas contendo ágar onde foram semeadas bactérias marinhas, isoladas da mesma região de onde foram coletados os corais. Os ensaios também foram realizados contra micro-organismos patógenos humanos. Foi observada a formação de halos de inibição em torno dos fragmentos dos corais, assim como em discos de papel contendo extratos dos corais. As seguintes espécies de corais apresentaram atividade antimicrobiana: *Antillogorgia turgida*, *A. americana*, *Rhipidogorgia flabellum*, *Briareum asbestinum*, *Plexaura homo malla*, *Plexaurella dichotoma* e *Plexauroopsis crassa*. Em 1994, outro estudo também testou a atividade antimicrobiana de octocorais encontrados nas ilhas do Panamá. Todos os extratos testados apresentaram atividade contra bactérias de origem marinha e não marinha. Posteriormente, Jensen e colaboradores (1996) fizeram um estudo mais abrangente com corais gorgonianos do Caribe e identificaram a atividade de extratos de 39 espécies de corais contra 15 cepas de bactérias marinhas testadas, dentre elas patógenos oportunistas e outras cepas isoladas dos próprios corais. Foi evidenciado que os extratos orgânicos da maioria dos corais do Caribe não possuíam atividade antimicrobiana potente e de amplo espectro contra as bactérias do próprio coral. Foi concluído, de acordo com os autores, que a inibição do crescimento bacteriano não seria função ecológica primária daqueles corais. No entanto, foi demonstrado que a maioria dos corais possuía capacidade para inibir o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas.

Até aquele momento, a riqueza e diversidade da atividade antimicrobiana identificada em corais gorgonianos foi demonstrada em outros grupos de corais. Um estudo de 1995 demonstrou atividade antimicrobiana em duas espécies de corais moles antárticos contra bactérias marinhas isoladas dos habitats dos respectivos corais. Anteriormente, em 1977, foi realizado um estudo abrangente de extratos de 100 corais escleractíneos australianos (representando 44 gêneros e 13 famílias), contra um total de 7 bactérias (6 bactérias marinhas isoladas das águas australianas e 1 patógeno humano). Todas as espécies dos corais testadas inibiram o crescimento da cianobactéria marinha *Synechococcus* sp., enquanto apenas 8 daquelas espécies de corais inibiram o crescimento de bactérias heterotróficas marinhas. No entanto, ainda nenhum desses estudos havia relacionado as atividades antimicrobianas encontradas sendo provenientes do próprio coral ou se estavam relacionadas aos outros organismos simbióticos.

Alguns compostos antimicrobianos também foram isolados de corais. São exemplos os diterpenos, sinulariolida e flexibilida, isolados do coral mole australiano *Sinularia flexibilis*. Uma bactéria endofítica de pigmento amarelado, *Pseudoalteromonas flavipulchra*, foi isolada do coral *Montipora aequituberculata*. Ensaio de antibiograma demonstraram que essa bactéria possuía uma potente atividade contra MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente) mediada pela geração de peróxido de hidrogênio, por meio da ativação da L-aminoácido oxidase. Eunicinas foram isoladas dos corais moles *Eunice asperula*, *E. toumeforti* e *E. mammosa*, demonstrando atividades contra *Pseudomonas* e *S. aureus*. Frações de sesquiterpenos, compostos comumente encontrados como agentes de defesa em plantas e insetos, foram encontradas em frações de *Pseudopterogorgia rigida*, possuindo ação antibiótica contra *S. aureus*. Essas

frações continham fenóis, hidroquinonas e quininas em sua composição.

O primeiro exemplo de atividade antimicrobiana em corais do Mar Vermelho foi mostrado para o coral *Parerythropodium fulvum*. Essa espécie de coral tem a característica de se reproduzir realizando a cobertura superficial dos embriões em uma camada de muco. Dessa maneira, foi possível testar extratos de vários estágios reprodutivos e de desenvolvimento desse coral. Os extratos foram testados contra um painel de 12 bactérias isoladas do hábitat do coral. Os resultados demonstraram que não houve diferença de atividade em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento do coral. Grande atividade foi encontrada particularmente contra *Vibrios* sp., isolados dos tecidos necróticos do coral. No entanto, não foi evidenciada atividade antimicrobiana contra outras bactérias associadas ao coral ou de tecidos saudáveis ou da superfície mucoide. Dessa maneira, os autores concluíram que a atividade antimicrobiana de *P. fulvum* é específica e não de amplo espectro. Essa especificidade pode ser importante para permitir que certos grupos de bactérias vivam em simbiose com o coral como hospedeiro, mantendo a defesa química contra possíveis patógenos.

As populações de corais caribenhos *Acropora palmata* diminuíram naquela região, devido ao estresse ambiental, branqueamento e outras doenças. As principais fontes de mortalidade incluíam micróbios invasivos que ficavam presos na camada superficial de muco e que se multiplicavam em condições de estresse do coral. No estudo de Ritchie em 2006 foi testado o muco de *A. palmata* saudável contra patógenos potencialmente invasivos, demonstrando inibição do crescimento em até 10 vezes, comparado com os antimicrobianos clássicos utilizados como controle. Entre as bactérias isoladas e cultivadas a partir do muco do coral, 20% apresentaram atividade antimicrobiana contra uma ou mais cepas testadas, incluindo patógenos da doença “varíola branca”. Esses resultados sugeriam que a camada de muco do coral promoveria condições adequadas para o desenvolvimento de comunidades microbianas benéficas associadas aos corais, implicando uma contribuição microbiana para a atividade antimicrobiana descrita para o muco. Essa hipótese foi confirmada quando o mesmo estudo testou o muco de corais branqueados (doentes) contra os mesmos patógenos testados anteriormente e não foi evidenciada a inibição do crescimento.

Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Shnit-Orland e Kushmaro em 2008 e 2009, que realizaram o isolamento de bactérias da comunidade microbiana de diversos corais. Nesses estudos foram isolados e identificados mais de 200 micro-organismos da camada de muco dos corais avaliados, sendo que pelo menos 20% desses micro-organismos apresentaram atividade antimicrobiana contra micro-organismos indicadores. Os micro-organismos isolados de corais duros apresentaram mais atividade em comparação com os micro-organismos isolados de corais moles. Bactérias dos gêneros *Vibrios* e *Pseudoalteromonas* apresentaram alta atividade contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos. Esses resultados, de acordo com os autores, demonstravam que a existência de micro-organismos com atividade antimicrobiana na superfície do coral possivelmente atua como uma primeira linha de defesa para proteger o coral hospedeiro contra patógenos.

Dessa forma, o coral e os organismos associados (tanto procariotos, quanto eucariotos) e as interações entre eles formam uma estrutura holobionte. De acordo com *Coral Probiotic Hypothesis*, corais vivem em relação simbiótica com uma população microbiana diversificada e

metabolicamente ativa. No entanto o papel exato desses micro-organismos no coral holobionte ainda está para ser determinado. De acordo com estudos de diversidade e distribuição de bactérias associadas a corais, a comunidade microbiana encontrada na superfície de um coral pode desempenhar um papel no seu mecanismo de defesa, possivelmente por ocupação de espaço, plasticidade genômica e produção de metabólitos antimicrobianos.

### 3.2 ESPONJAS

As esponjas marinhas estão entre os maiores produtores de metabólitos ativos do reino animal. Esse grupo produz uma ampla variedade de substâncias com atividade antibacteriana, incluindo terpenoides, alcaloides, metabólitos nitrogenados, peptídeos, ácidos acetilênicos, glicolipídeos, derivados de purinas, lecitinas e macrólidos. O extrato acetato metílico das esponjas *Agelas oroides* e *Axinella damicornis*, coletadas no Mediterrâneo, inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenese* resistente à gentamicina e *Enterococcus faecalis*. A Ageloxima B, isolada de *Agelas mauritiana*, é um alcaloide diterpeno com atividade contra MRSA. A extração de *Suberea ianthelliformis* com diclorometano revelou um metabólito derivado de bromotirosina chamado ianthelliformisamine A, que inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*. (IC50 de 6.8µM, MIC=35µM). O Halistanol trissulfato (24ε,25-dimethylcholestane-2β,3α,6α-triol trissodiumsulfate) obtido a partir de *Petromica citrina* possui um mecanismo de ação que promove a perturbação na membrana citoplasmática e consequente indução da lise celular em *S. aureus* (MIC 512µg/ml), além de exibir toxicidade moderada contra *Staphylococcus epidermidis*, *E. faecalis*, *Mycobacterium fortuitum* e *Neisseria gonorrhoeae*. A espécie endêmica brasileira *Arenosclera brasiliensis* produz os alcaloides Arenosclerinas A-C e Haliclonacyclamina E, que apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas comuns e resistentes de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, porém não tiveram atividade contra cepas de *E. coli* e *Candida albicans*. As Arenosclerinas A-C e Haliclonacyclamina E estão entre as substâncias antibacterianas mais promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos. Além dessas, aparecem também a Agelasina D, Cribrostatina 3 e 6, Manzaminas, Petrosamina B e Psammaplina A. A verdadeira via biossintética da maioria desses produtos ainda é desconhecida. As esponjas possuem cerca de 40-60% da sua biomassa constituída por micro-organismos e em alguns casos os compostos são sintetizados pela microbiota associada à esponja.

## 4 | ALGAS

As algas formam um grupo taxonômico artificial que inclui organismos autotróficos clorofilados, unicelulares ou multicelulares de organização relativamente simples. Alguns com postos com atividade antimicrobiana já foram identificados dentre os metabólitos secundários de várias classes como Phaeophyceae (algas marrons), Rhodophyceae (algas vermelhas), Chlorophyceae (algas verdes), Chrysophyceae (algas douradas) e Bacillariophyceae (diatomáceas).

Esses compostos estão relacionados ao fenômeno de alelopatia das espécies. Suas funções ecológicas não estão completamente elucidadas, mas de maneira geral eles conferem alguma vantagem à alga em competição com outros indivíduos. Estudo sobre a interação de três algas *Dictyota dichotoma*, *Rhodomenia pseudopalmata* e *Ulva rigida* com *Ostreopsis cf. ovata* identificou a inibição significativa do dinoflagelado produtor de toxinas. A futura elucidação dos compostos responsáveis pela ação possui potencial aplicação para a prevenção de florações (multiplicação exacerbada) e produção de antibióticos.

A cloretina obtida a partir da extração de *Chlorella vulgaris* com clorofórmio e benzeno foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus subtilis*. Sua produção em escala comercial não progrediu, mas impulsionou as pesquisas com outras algas planctônicas.

Os fluorotaninos podem representar até 15% do peso seco de algas marrons. Sua atividade antibacteriana foi relacionada à inibição da fosforilação oxidativa e sua habilidade em ligar a proteínas bacterianas da membrana e enzimas, causando a lise celular. Atividade do fluoroglucinol contra espécies de *Vibrio* foram relatadas quando a estrutura terciária da molécula apresentava grupos metil, acetil ou vinil. Fluorotaninos de baixo peso molecular obtidos a partir de *Sargassum thunbergii* foram capazes de provocar danos na membrana e parede celular de *V. parahaemolyticus*, alterando a permeabilidade da membrana e causando vazamento citoplasmático. Extratos da alga marrom *Eisenia bicyclis* foram testados contra cepas resistentes de *Propionibacterium* apresentando concentração mínima inibitória de 32 µg/mL. O "phlorofucofuroeckol" (fluorotanino com um grupo álcool como substituinte) foi capaz de reverter a resistência de *Propionibacterium* à eritromicina e lincomicina. Em pesquisa similar, O "phlorofucofuroeckol" proveniente de *Eisenia bicyclis* provocou a supressão dos genes *mecl*, *mecR1* e *mecA* em *S. aureus*. Esses três genes estão relacionados ao mecanismo de resistência a metiliclinas em bactérias.

Ácidos graxos livres provenientes de algas têm sido reportados como inibidores da cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa na membrana celular de bactérias. Ácidos graxos de cadeia longa da alga verde *Planktochlorella nurekis* provocaram significativa inibição de *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Salmonella enterica* var. *Enteritidis*, *Salmonella enterica* var. *Infantis* em concentrações entre 0,75–6mg/mL.

Polissacarídeos extraídos em solução aquosa (a quente ou a frio) da alga vermelha *Pterocladia capillacea* e alga marrom *Dictyopteris membranacea* inibiram o crescimento de Gram-positivas, *Bacillus cereus* e *S. aureus*, e de Gram-negativas, *Pseudomonas fluorescens* e *E. coli*. A laminarina extraída das algas marrons irlandesas *Ascophyllum nodosum* e *Laminaria hyperborea* foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e *S. typhimurium*.

Os terpenos são outro grupo funcional de moléculas que podem ser produzidas por algas marinhas. O macrolídeo diterpeno-benzoato isolado da alga vermelha *Callophycus serratus* foi capaz de inibir o crescimento de MRSA e *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina. O Sphaerodactylomelol extraído da alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*. As xantofilas como a luteína e a astaxantina são terpenos que apresentam oxigênio em sua fórmula e possuem a função de

pigmento auxiliar na captação de luz em algas e plantas. A função como antioxidantes é extensamente descrita, mas eles também podem ser eficazes como antibacterianos. Extratos de fucoxantina obtida a partir da alga marrom *Turbinaria triquetra*, alga verde *Ulva lactuca* e alga vermelha *Laurencia obtusa* foram capazes de provocar halos de inibição em placas de crescimento de *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Uma nova classe de moléculas chamada de Chrysophaetinas, obtida a partir da extração de *Chrysophaeum taylori* usando hexano, clorofórmio e metanol, teve alto poder de inibição do crescimento de MRSA, *E. faecium* resistente à vancomicina e *S. aureus* multirresistente. Seu mecanismo de ação ainda não está elucidado, mas é possível que as Chrysophaetinas impeçam a síntese da proteína FtsZ (*filamenting temperature-sensitive mutant Z*), necessária para a divisão celular bacteriana, sendo um grupo altamente promissor na busca por novos antibióticos.

## 5 | MICROBIOMAS

Os micro-organismos marinhos podem estar livres na coluna d'água, nos sedimentos, aderidos a substratos ou em simbiose com macro-organismos, com destaque para os invertebrados e macroalgas. Os microbiomas marinhos são especialmente atrativos para a prospecção de novos produtos, pois são capazes de produzir um vasto repertório de metabólitos secundários, o que permite sua adaptação a diversas condições ambientais. Grande parte desses compostos são atribuídos a vias metabólicas de peptídeos não-ribossomais e policetídeos ou moléculas mistas, que são sintetizados pelas enzimas modulares sintases de peptídeos não-ribossomais (NRPS) e policetídeo sintases (PKS-I), ou por vias mistas (NRPS/PKS). Essas enzimas são formadas por módulos, cada um deles com uma cadeia de aproximadamente 1000 aminoácidos, e cada módulo é responsável pela incorporação de um aminoácido na cadeia do peptídeo não-ribossomal ou também por alguma modificação química na molécula, por exemplo a sua ciclização. Os compostos híbridos podem ser formados pela união dos produtos desses dois conjuntos de enzimas ao final de cada processo ou podem ser sintetizados simultaneamente. Também existem evidências da participação dessas enzimas na modificação de peptídeos ribossomais clássicos. Na prática são conjuntos de unidades gigantescas formando moléculas muito pequenas. A hipótese mais aceita para a manutenção evolutiva desse processo é de que, apesar do seu altíssimo custo energético, ele confere vantagens para a célula. Dessa maneira a célula bacteriana apresentaria um repertório grande de enzimas e moléculas, sendo capaz de se adaptar rapidamente a variações nas condições ambientais.

As técnicas de cultivo tradicional limitam o conhecimento sobre o metabolismo desses micro-organismos, uma vez que a maioria deles não pode ser cultivada em laboratório nas condições usuais. Nesse sentido, as técnicas independentes de cultivo, como o sequenciamento de DNA de nova geração, contribuem fortemente para o conhecimento da microbiologia marinha.

## 5.1 FUNGOS

Os fungos são micro-organismos eucarióticos, heterotróficos e normalmente decompositores. Além de sua importante participação na ciclagem de nutrientes, possuem papel relevante na produção de metabólitos secundários, com as mais diversas atividades biológicas. As propriedades antimicrobianas de compostos produzidos por fungos são amplamente conhecidas e revolucionaram a medicina: foram a origem do primeiro e famoso composto antibiótico, a penicilina. Assim como outros táxons, o conhecimento sobre o ambiente terrestre é muito maior que o marinho. Porém, nas últimas décadas, as pesquisas sobre fungos provenientes do mar vêm comprovando o potencial desses organismos na bioprospecção de novas moléculas.

Fungos marinhos produtores de antimicrobianos já foram isolados de diversos microambientes. Além da coluna d'água, fundo, sedimento e outras superfícies, também são encontrados associados com animais, vegetais e algas. Algas, esponjas e vegetação de manguezais são as fontes mais reportadas no isolamento de cepas produtoras de compostos antibióticos. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os que mais aparecem em pesquisas que reportam fungos marinhos produtores de antibacterianos e antifúngicos.

A Cefalosporina C é um antibiótico beta-lactâmico obtido a partir do fungo *Acremonium chrysogenum*. Já é produzido em escala comercial e seu uso é amplamente difundido, atuando contra bactérias Gram-positivas e negativas. Em 2013, estudo com amostras de água coletadas na costa da cidade de Mahabalipuram, Índia, isolou 39 cepas de fungos. Duas delas, identificadas como *Penicillium chrysogenum* e *Acremonium chrysogenum*, tiveram atividade contra vários alvos, tanto bactérias Gram-positivas quanto negativas. A análise estrutural dos compostos provavelmente responsáveis pela ação revelou a presença de uma amina alifática e um anel imidazol, indicando uma estrutura similar à Cefalosporina C.

Os compostos antimicrobianos isolados a partir de fungos possuem estrutura diversificada e pertencem a variadas classes químicas: esteroides, terpenoides, peptídeos, alcaloides, piridinas, piperazinas, quinonas, antraquinonas etc. Além de estruturas diferenciadas, também é possível observar diferentes modos de ação, como, por exemplo, a inibição da formação de biofilmes, ferramenta que pode ser utilizada no controle de infecções ou processos de sanitização. Três componentes, ophiobolin K, 6-epi-ophiobolin K e 6-epi-ophiobolin G, produzidos pelo fungo *Emericella varicolor*, foram capazes de inibir a formação de biofilme em *Mycobacterium smegmatis*. Esse fungo foi isolado a partir de sedimento marinho coletado a 70 metros de profundidade no golfo Gokasyo, Japão, comprovando a diversidade que o mar pode oferecer, devido às diferentes condições ambientais existentes.

Um dos principais aspectos que tornam os fungos marinhos alvos importantes na busca por novos produtos antibióticos é a sua relativa facilidade de isolamento e cultivo. No ambiente natural eles estão sujeitos a pressões seletivas diferentes e respondem de maneiras variadas a essas condições. Assim, características de cultivo podem ser alteradas, colocando o fungo em uma condição de estresse e induzindo a produção de moléculas bioativas. *Penicillium citrinum*, *Saccharolobium strictum*, *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus* sp., isolados dos parques marinhos Pulau Redang e Pulau Payar, Malásia, foram testados em duas condições de cultivo: fermentação em meio sólido e meio líquido. Os extratos obtidos a partir do meio sólido apresen-

taram atividade antimicrobiana significativamente maior do que os extratos obtidos a partir do cultivo em meio líquido. A exposição do fungo *Aspergillus flocculosus* PT05-1, proveniente de sedimento (província Fujian, China), a meio de cultura hipersalino resultou no isolamento de três novos compostos, sendo que um deles apresentou atividade contra *Enterobacter aerogenes*.

As modernas ferramentas de análise molecular indicam que ainda há um potencial gigantesco a ser explorado. Os fungos de ambiente marinho possuem grande diversidade genômica para a produção de metabólitos secundários. O grande número de trabalhos experimentais disponíveis na literatura vem comprovando que os organismos do reino Fungi são grande fonte para a busca por novos componentes antibióticos.

## 5.2 BACTÉRIAS

As bactérias marinhas estão distribuídas nos mais diversos locais, como sedimentos, animais, superfícies inanimadas e espaços internos de invertebrados. Existe uma variedade de compostos bioativos com diversas funções isoladas de bactérias, com atividade citotóxica, antimicrotúbulo, anticancerígena, fotoprotetora, antiproliferativa, antitumoral, assim como propriedades anti-incrustantes e antimicrobianas. Esses metabólitos secundários possuem atividades antivirais, antifúngicas e antibacterianas e estão inclusos em várias classes de metabólitos, tais como policetídeos ribossomais e não-ribossomais, terpenos e peptídeos. Dessa forma, serão apresentados alguns exemplos de atividades e compostos antibacterianos identificados e/ou isolados provenientes de bactérias marinhas.

A primeira substância antibiótica isolada e identificada a partir de uma bactéria marinha foi 2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphenyl)-3,4,5-tribromopyrrole, em 1966, por Burkholder e colaboradores. A substância era produzida pela bactéria marinha *Pseudomonas bromoutilis*, que foi isolada da *Thalassia* (tartaruga), em Porto Rico. Foi demonstrada alta atividade contra bactérias Gram-positivas, dentre elas *S. aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *S. pyogenes*. Esses micro-organismos foram inibidos com concentrações do antibiótico de 0,0063 µg/ml em cultura líquida. No entanto, o composto não mostrou eficácia terapêutica quando administrado em ratos.

Um novo antibiótico, aplasmomicina, foi obtido em 1976 de uma cepa de *Streptomyces griseus*, isolado do sedimento do mar, em Sagami Bay, no Japão. Esse antibiótico, com ação contra bactérias Gram-positivas e plasmódios *in vivo*, forma cristais incolores semelhantes a agulhas e tem fórmula  $C_{41}H_{60}O_{14}Na$ . Com base em suas propriedades físicas e químicas, a aplasmomicina foi considerada um novo antibiótico. Loloatinas A a D, uma família de antibióticos decapeptídeos cíclicos, foram isolados de culturas de bactérias marinhas tropicais provenientes dos recifes de corais de Papua Nova Guiné. As Loloatinas A e B exibiram atividade antimicrobiana *in vitro* contra MRSA, VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina), assim como *Streptococcus pneumoniae* multirresistente.

Várias outras cepas foram isoladas do ambiente marinho com atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas mais comuns, tais como MRSA. Uma bactéria marinha, *Marinomonas mediterranea*, foi isolada do mar Mediterrâneo na costa de Múrcia. *M. mediterranea*

mostrou atividade antibacteriana contra cepas nosocomiais, como *Pseudomonas* sp. resistente à ceftazidima e MRSA. *Pseudomonas* foi isolado da Índia em 2009 e mostrou atividade antimicrobiana contra muitos micróbios patogênicos. *Pseudoalteromonas phenolica* foi isolada em 2003 e mostrou atividade antibacteriana contra MRSA. Radjasa e colaboradores, em 2007, isolaram uma bactéria associada a corais, nomeada TAB4, que foi identificada como *Pseudoalteromonas luteoviolacea* e que mostrou efeito inibitório contra bactérias tanto patogênicas quanto dos próprios corais.

Os compostos fenólicos como o 4,4,6-tribromo-2,2'-bifenol, o CMED 290 foram isolados de bactérias marinhas *Pseudoalteromonas* sp., que apresentaram atividade antimicrobiana significativa contra o MRSA. Da bactéria marinha *Pseudoalteromonas phenolica*, isolou-se o ácido 2,2',3-tribromo-bifenil-4,4'-dicarboxílico. Esse composto apresentou propriedades antibacterianas para MRSA com valores de MIC (*minimum inhibitory concentration*) entre 1 e 4 µg/ml. O composto também foi altamente eficaz contra *Bacillus subtilis* e *Enterococcus serolicida*, mas não mostrou atividade contra bactérias Gram-negativas e fungos. Esses resultados demonstraram que esse composto de bromofenol tem atividade *in vitro* elevada contra *S. aureus* e pode ser útil como um composto de chumbo no desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas.

Cetina e colaboradores, em 2010, isolaram cepas de bactérias heterotróficas produtoras de pigmentos e que também possuíam atividade antimicrobiana, indicando uma provável associação entre os pigmentos e a toxicidade. Foram identificadas várias enzimas biossintéticas envolvidas na síntese de inibidores da síntese de pigmentos. Em 2011, Lu e colaboradores descobriram que a dicetopiperazina e os macrolídeos são dois metabólitos secundários importantes para a triagem de princípios bioativos de micro-organismos marinhos. Peptídeos cíclicos pequenos, como as dicetopiperazinas (DKPs), já foram isolados de micro-organismos marinhos e desempenham funções de sinalização celular, como, por exemplo, as L,L-dicetopiperazinas envolvidas como sensores de *quorum sensing*, importantes na comunicação célula-a-célula e na expressão de genes em resposta à densidade celular. Três compostos fenólicos, uma 7-metilcoumarina e dois flavanoides (rhamanzin e circimaritina), foram identificados e isolados de um *Streptomyces* sp. marinho e foi demonstrado que possuíam atividade antimicrobiana. Outros compostos fenólicos com atividades antimicrobianas também foram isolados, como as amonificinas A e B, produzidas por *Thermovibrio amonifis*, uma bactéria hidrotermal marinha. Em 2010 foram identificadas duas maribasinas cíclicas A e B, lipopeptídeos a partir da fermentação de *Bacillus marinus* B-9987, isolado do litoral de Bohai, na costa da China. Esses compostos exibiram atividade antifúngica de amplo espectro contra fitopatógenos pelo bioensaio antifúngico. Dos sedimentos de profundidade, a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10 produziu dois lipopeptídeos antifúngicos diferentes que foram purificados por fracionamento guiado por bioatividade. Ambos os compostos foram relatados como tendo atividades inibitórias significativas contra cinco patógenos fúngicos de plantas diferentes no ensaio de difusão em disco de papel-ágar.

Do isolado bacteriano marinho *Brevibacillus laterosporus* PNG276 de Papua Nova Guiné foi isolada a tauramamida, um novo lipopeptídeo. A tauramamida é um éster etílico, tiopeptídeo e depsipeptídeo e apresenta inibição efetiva contra *Enterococcus* sp. Esse composto foi isolado

por fracionamento guiado por bioensaio. De maneira semelhante, o extrato orgânico do *Nocardiosis* sp. TP-1161 marinho também apresentou atividade antimicrobiana. O composto, após identificado e purificado, revelou um novo antibiótico tiopeptídeo com uma porção aminoce-tona incomum. Outros compostos, identificados a partir da bactéria marinha *Photobacterium* MBIC06485, unarmicina A e C, novos depsi-peptídeos, inibiram o crescimento de duas cepas de *Pseudovibrio*.

As mixobactérias marinhas são micro-organismos raros resistentes à cultura. Um grande número de cepas foi estudado e identificado por grupos de pesquisa na Ásia. A mixobac-téria halofílica *Paraliomyxa miuraensis* foi descoberta no Japão e produz policetídeos conheci-dos como miuraenamidas A e B. As relações de atividade antimicrobiana desses compostos demonstraram uma significativa estrutura macrocíclica, bem como a fração  $\beta$ -metoxiacrilato. A partir de uma bactéria do gênero *Rapidithrix*, foram isoladas as ariakemicinas A e B, polipeptí-deos híbridos lineares (policetídeos não-ribossomais). As ariakemicinas inibiram seletivamente o crescimento de bactérias Gram-positivas. Em 2014, um estudo obteve 493 isolados marinhos de vários ambientes e amostras, dos quais 63 (12,8%) apresentaram atividade antibacteriana contra um conjunto de patógenos de interesse clínico (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Ente-rococcus faecalis*). Posteriormente, em 2015, foram relatadas atividades antimicrobianas das bactérias *Cellulomonas* e *Proteus* sp. isoladas da esponja marinha *Erylus deficiens*.

São diversos os estudos que relacionam o potencial promissor de bactérias marinhas em relação à produção de compostos com atividades antimicrobianas, de diversas classes e espectros de ação contra os mais diversos micro-organismos. Apesar de a maioria dos com-postos bioativos ainda serem provenientes de origem microbiana terrestre, o ambiente mari-nho possui um arsenal diverso de bactérias com propriedades capazes de auxiliar no combate e controle da propagação de agentes patogênicos variados.

### 5.3 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias têm sido identificadas como uma rica fonte de compostos bioativos. Apesar de serem chamadas de algas, são micro-organismos procariontes Gram-negativos au-totróficos, pertencentes ao domínio Bacteria. Seu potencial biotecnológico é bastante variável. Já foram identificadas várias funções para compostos produzidos por cianobactérias, dentre elas atividades antimicrobianas, antifúngicas e antivirais. O grupo é comumente associado a *blooms* tóxicos em reservatórios, causando prejuízos a animais e humanos. Esse talvez seja o motivo para o número elevado de pesquisas com cianobactérias de água doce, em comparação com o ambiente marinho.

Cianobactérias são parte significativa do microbioma associado à doença de corais denominada *black band disease* (BBD) e seu papel na manifestação da doença é alvo de muitas investigações. Dez cepas de cianobactérias associadas a BBD e 10 cepas oriundas de outras fontes marinhas foram testadas contra bactérias heterotróficas oriundas da comunidade mi-crobiana de corais com BBD, da superfície de corais saudáveis e bactérias patogênicas de corais. Em co-cultivo, 15 cepas de cianobactérias inibiram ao menos uma cepa de bactéria heterotró-

Fica. Para os ensaios com extratos lipofílicos dos cultivos, 18 cepas inibiram o crescimento de ao menos uma bactéria. Duas das três bactérias patogênicas testadas apresentaram sensibilidade a extratos lipofílicos das cianobactérias. Uma das conclusões no trabalho é que as cianobactérias associadas à BBD alteram a microbiota natural do coral sadio e favorecem a microbiota associada à BBD, diminuindo a competição. Estudos dessa dimensão indicam a diversidade de comunicação química que pode ser explorada e utilizada como ferramenta para a bioprospecção. Além disso, reforçam a importância de compreender os fenômenos bioquímicos dessas comunidades microbianas, não apenas para a busca de recursos aplicados à saúde humana, mas também como forma de elucidar e mitigar desequilíbrios ambientais.

Biondi e colaboradores, em 2008, realizaram uma varredura de atividades biológicas para cepas isoladas a partir de tapetes microbianos bentônicos de lagos antárticos. Das 48 cianobactérias isoladas, 17 apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, fungo filamentosos *Aspergillus fumigatus* e a levedura *Cryptococcus neoformans*.

Estípes de *Synechocystis* e *Synechococcus* foram extraídas com diferentes solventes – hexano, diclorometano, metanol e água – e testadas para a inibição do crescimento de Gram-positivas, Gram-negativas e *C. albicans*. Nove cepas inibiram o crescimento das Gram-positivas *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosum* e *Cellulomonas uda*, sendo que extratos de solventes diferentes apresentaram variadas taxas de inibição, indicando que os compostos ativos possuem polaridades diferentes.

*Lyngbya majuscula* é uma das espécies marinhas que apresentou testes positivos para atividade antimicrobiana. Vários depsipeptídeos cíclicos (pitipeptólides A–F) foram purificados e inibiram o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*. Extratos metanólicos dessa mesma espécie foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*. Já da espécie *Anabaena constricta* foi isolado um antibacteriano alcaloide indol bromado, identificado como ‘6-bromo-3-hydroxymethyl-indole-2-one’ que possui atividade contra *B. cereus*. A partir de *Nodularia harveyana* e *Nostoc insulare* foram isolados dois compostos, norharmane (9H-pirido(3,4-b)indole) e 4,4'-dihydroxybiphenyl, que foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. subtilis*, com MIC entre 16 e 160 µg/mL.

As novas tecnologias de sequenciamento de DNA vêm ampliando a compreensão sobre o potencial biotecnológico das cianobactérias. Shih e colaboradores, em 2012, realizaram o pirosequenciamento de 54 genomas de cianobactérias, ampliando a disponibilidade de dados genômicos e revelando aspectos da base molecular para a diversidade ecofisiológica desses organismos. Aproximadamente 7% das proteínas identificadas não possuíam semelhança com qualquer proteína conhecida e 70% dos genomas de cianobactérias codificam grupos de genes NRPS ou PKS, associados à produção de metabólitos secundários. Em estudo posterior, Calteau e colaboradores (2014) dedicaram-se a estudar especificamente essas duas vias em 126 genomas de cianobactérias marinhas, de água doce e outros ambientes. O resultado foi ainda mais surpreendente. Foram identificados 452 clusters gênicos de NRPS, PKS e híbridos NRPS/PKS, formando 286 famílias diferentes de vias biossintéticas. Apenas 20% desses clusters gênicos puderam ser associados a vias de produtos naturais de classes conhecidas, indicando que as cianobactérias ainda possuem muito potencial de bioprospecção para ser explorado.

A diversidade de cianobactérias marinhas e os estudos apresentados até o momento ratificam o potencial do grupo na prospecção de compostos com atividades antimicrobianas. O número de compostos isolados de cianobactérias de água doce e de ambiente terrestre é muito maior do que aqueles provenientes do ambiente marinho, indicando que esse nicho ainda é muito pouco explorado. Assim, cianobactérias marinhas configuram-se como um ponto-chave na guerra travada contra bactérias e outros micro-organismos patogênicos. O alinhamento entre estudos de biodiversidade, análises *in silico* e esforços de bancada são o caminho para a descoberta de antimicrobianos a partir de cianobactérias marinhas.

**Tabela 1.** Compostos antimicrobianos isolados a partir de fontes marinhas.

	ORGANISMO ORIGEM	COMPOSTO	MICRO-ORGANISMO ALVO
Vertebrados	<i>Rachycentron canadum</i>	Lecitinas	<i>E. coli</i>
	<i>Salmo salar</i>	Catelicidina 1 e 2	<i>E. coli</i> e <i>V. anguillarum</i>
	<i>Epinephelus coioides</i>	Hepicidina EC-proHep3	<i>C. glutamicum</i> , <i>M. lysodeikticus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. stutzeri</i>
	<i>Scophthalmus maximus</i>	Lisozima rSmLysC	<i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. iniae</i> , <i>E. tarda</i>
	<i>Caretta caretta</i>	TEWP	<i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i>
Invertebrados	<i>Apostichopus japonicus</i>	(5Z)-dec-5-en-1-yl sulfato	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pocillopora damicornis</i>	Damicornina	<i>M. luteus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. stationis</i> , <i>M. maritypicum</i> , <i>F. oxysporum</i>
	<i>Parerythropodium fulvum</i>	Diterpenos, sinulariolida e flexibilida	<i>Vibrios sp.</i> e outras bactérias isoladas do coral
	<i>Eunicea aspérula</i> , <i>Eunicea toumeforti</i>	Asperdiol	<i>Klebsiella sp.</i> e <i>Pseudomonas sp.</i>
	<i>E. mammosa</i>	Eunicina	<i>S. aureus</i> e <i>C. feseri</i>
	<i>Pterogorgia guadalupensis</i>	Lactonas	<i>S. aureus</i> e <i>M. smegmatis</i>
	<i>Agelas mauritiana</i>	Ageloxima B	MRSA, <i>L. donovani</i> , <i>C. neoformans</i>
	<i>Suberea ianthelliformis</i>	Ianthelliformisamines A-C	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>Petromica citrina</i>	Halistanol trisulfato	<i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
	<i>Arenosclera brasiliensis</i>	Arenosclerinas A-C	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
	<i>Arenosclera brasiliensis</i>	Haliclonaclamina E	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
	Algas	<i>Chlorella vulgaris</i>	Clorellina
<i>Sargassum thunbergii</i>		Florotaninos(LMPs)	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Eisenia bicyclis</i>		Florofucofuroeckol	MRSA
<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Laminaria hyperborea</i>		Laminarinas	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i>

	ORGANISMO ORIGEM	COMPOSTO	MICRO-ORGANISMO ALVO
Algas	<i>Callophycus serratus</i>	Macrolídeos diterpeno-benzoato	MRSA, <i>E. faecium</i>
	<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	Sphaerodactylomelol	<i>S. aureus</i>
	<i>Chrysophaeum taylora</i>	Chrysophaetinas	MRSA, <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i>
Fungos	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Cefalosporina C	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
	<i>Emericella variegata</i>	Ophiobolinas	<i>M. smegmatis</i>
	<i>Aspergillus flocculosus</i> PT05-1	Ergosteroides	<i>E. aerogenes</i>
Bactérias	<i>Bacillus silvestris</i>	Bacilistatinas	<i>S. pneumoniae</i>
	<i>Nocardia</i> sp.	Tiopeptídeo Nocardia	<i>E. faecium</i>
	<i>Phaebacter</i> sp.	Indigoidina	<i>V. fischeri</i>
	<i>Photobacterium</i> sp.	Unnamicina A e C	<i>Pseudovibrio</i> sp.
	<i>Photobacterium</i> sp.	Ngercheumicinas	Cepas Gram-negativas
	<i>Photobacterium</i> sp.	Solonamidina A e B	MRSA
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Ciclo-peptídeo	<i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. anguillarum</i>
	<i>Rapidithrix</i> sp.	Ariakemicina A	<i>Brevibacterium</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>
	<i>Streptomyces</i> sp.	Anthracimicina	<i>B. anthracis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. pneumoniae</i> ,
	<i>S. aureus</i> , MSSA, MRSA, VRSA		
	<i>Streptomyces</i> sp.	Fijimycina A-C e etamycina	MRSA
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	4,4,6-tribromo-2,2'-bifenol	MRSA
	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i>	2,2', 3-tribromo-bifenil-4,4'-dicarboxílico	MRSA, <i>B. subtilis</i> e <i>E. serolicida</i>
	<i>Chondromyces pediculatus</i>	Pedeina A	<i>R. glutinis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i>
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	C(15)-surfactina	<i>C. albicans</i>
	<i>B. majavensis</i>	Mojavensina A	Fungos fitopatogênicos
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Anti-CA ciclo lipopeptidase	<i>C. tropicalis</i> , <i>Metschnikowia bicuspidata</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	
Cianobactérias	<i>Lyngbya majuscula</i>	Pitipeptolides A-F	<i>M. tuberculosis</i>
	<i>Anabaena constricta</i>	6-bromo-3-hidroximetil-indole-2-one	<i>B. cereus</i>
	<i>Nodularia harveyana</i>	Norharmone (9H-pirido(3,4-b)indole)	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
	<i>Nostoc insulare</i>	4,4'-dihidroxybifenil	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>

## 6 | PERSPECTIVAS

O número de pesquisas relacionando moléculas de origem marinha ativas contra micro-organismos cresceu muito nas últimas décadas. As publicações revelam que a relevância e diversidade dos mares se reflete na diversidade bioquímica das moléculas. O potencial marinho tem se tornado uma realidade na busca por novas ferramentas na guerra contra a resistência microbiana.

Peptídeos antimicrobianos são abundantemente encontrados em animais, vertebrados e invertebrados, e são considerados a primeira linha de defesa contra micro-organismos. Os peptídeos antimicrobianos possuem em comum a característica de serem catiônicos e anfífilos, capazes de se associarem à membrana fosfolipídica e causar a morte celular. O mecanismo de ação regulado pelas interações físicas (eletrostáticas e hidrofóbicas) com a membrana é um fator positivo, que pode dificultar a ocorrência de resistência bacteriana. Os peptídeos antimicrobianos são discutidos em detalhes em capítulo à parte. Essa classe de moléculas é uma das frentes mais promissoras nas pesquisas contra resistência a antibióticos.

A evolução das ferramentas analíticas tem impulsionado as pesquisas e gerado excelentes resultados. A redução de custos e o acesso às novas tecnologias de sequenciamento de DNA vêm permitindo o acesso à biodiversidade marinha de maneira mais rápida. Os esforços de bancada para a realização de triagens e caracterização de novas moléculas é essencial e indispensável. Porém, as tecnologias de NGS (*next-generation sequencing*) de DNA permitem agora uma varredura mais orientada, evitando o desperdício de tempo e recursos. Além disso, o conhecimento de detalhes de cada via de expressão, associado à evolução de técnicas de manipulação molecular, permite a possibilidade de produção heteróloga de compostos. A possibilidade de produzir antibióticos em grande escala, utilizando organismos facilmente cultiváveis e em condições controladas, é uma das fronteiras promissoras para a produção em grande escala dos componentes, em vez da simples extração das fontes ou cultivos de baixo rendimento. Ainda, o advento de novas estratégias de triagem funcional é crucial para a detecção e isolamento de novas atividades antimicrobianas. As metodologias clássicas de bioprospecção das atividades, como a antibiose em placas ou culturas líquidas, estão se tornando cada vez mais ineficazes, pois, sozinhas, apresentam baixa resolução e sensibilidade, indicando a necessidade de métodos de triagem mais robustos para limites inferiores de detecção. É a capacidade para detectar, isolar e caracterizar os genes expressos de um isolado ou extrato que determina o sucesso de qualquer avaliação baseada em triagem funcional.

O ambiente marinho apresenta grande variedade de gêneros e espécies de organismos ainda desconhecidos, que possuem função essencial na fisiologia daquele ambiente. Essa biodiversidade representa enorme riqueza em termos de vias e processos metabólicos que podem ser direcionados para a bioprospecção de compostos com atividade antimicrobiana de interesse biotecnológico, principalmente os de interesse farmacêutico. Ainda, devido à atual necessidade de novos tipos de antimicrobianos para controlar patógenos multirresistentes e novos agentes infecciosos emergentes, a quimiodiversidade marinha é uma das alternativas mais promissoras

para a busca de compostos naturais. Dessa forma, o estudo desses ambientes resultará na compreensão e investigação sistemática do reservatório genético de produtos bioativos de origem marinha. Essa sistemática, juntamente com a exploração contínua da diversidade marinha, terá potencial para gerar novos compostos químicos e drogas bioativas, assim como acelerar a descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

Abed, R.M.M.; Dobretsov, S.; Sudesh, K. (2008) Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**. 106(1).

Amoutzias, G.D.; Chaliotis, A.; Mossialos, D. (2016) Discovery strategies of bioactive compounds synthesized by nonribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases derived from marine microorganisms. **Marine Drugs**. 14(4).

Andrianasolo, E.H.; Haramaty, L.; Rosario-Passapera, R.; Bidle, K.; White, E.; Vetriani, C.; Falkowski, P.; Lutz, R. (2009) Ammonificins A and B, hydroxyethylamine chroman derivatives from a cultured marine hydrothermal vent bacterium, *Thermovibrio ammonificans*. **Journal of Natural Products**. 72(6): 1216-1219.

Bajpai, V.K. (2016) Antimicrobial secondary metabolites from marine fungi: A mini review. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**. 45(9): 1067-1075.

Biondi, N.; Tredici, M.R.; Taton, A.; Wilmotte, A.; Hodgson, D.A.; Losi, D.; Marinelli, F. (2008) Cyanobacteria from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactivities. **Journal of Applied Microbiology**. 105:105-115.

Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Munro, M.H.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R. Produtos naturais marinhos. **Natural Product Reports**. 28(2): 196-268, 2011.

Calteau, A.; Fewer, D.P.; Latifi, A.; Coursin, T.; Laurent, T.; Jokela, J.; Kerfeld, C.A.; Sivonen, K.; Piel, J.; Gugger, M. (2014) Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. *BMC Genomics*, v.15(977), 2014.

Cetina, A.; Matos, A.; Garma, G.; Barba, H.; Vázquez, R.; Zepeda-Rodríguez, A.; Jay, D.; Monteón, V.; Lopez-A, R. (2010) Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from Gulf of Mexico. **Revista Peruana de Biología**. 17(2): 231-236.

Charyulu, E.M.; Sekaran, G.; Rajakumar, G. S.; Gnanamani, A. (2009) Antimicrobial activity of secondary metabolite from marine isolate, *Pseudomonas* sp. against Gram positive and negative bacteria including MRSA. **Indian Journal of Experimental Biology**. 47(12): 964-968.

Chen, L.; Wang, N.; Wang, X.; Hu, J.; Wang, S. (2010) Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. **Bioresource Technology**. 101(22): 8822-8827.

Doshi, G.M.; Aggarwal, G.V.; Martis, E.A.; Shanbhag, P.P. (2011) Novel antibiotics from marine sources. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**. 4(1):3.

Dufourcq, R.; Chalkiadakis, E.; Fauchon, M.; Deslandes, E.; Kerjean, V.; Chanteau, S.; Petit, E.; Guezennec, J.; Dupont-Rouzeyrol, M. (2014) Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential antibacterial activity from a marine coastal environment from New Caledonia. **Letters in Applied Microbiology**. 58(2): 102-108.

- El-Gendy, M.M.; Shaaban, M.; El-Bondkly, A.M.; Shaaban, K. (2008) Bioactive benzopyrone derivatives from new recombinant fusant of marine *Streptomyces*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 150(1): 85-96.
- Elissawy, A.M.; El-Shazly, M.; Ebada, S.S.; Singab, A.B.; Proksch, P. (2015) Bioactive terpenes from marine-derived fungi. **Marine Drugs**.13: 1966-1992.
- Engelhardt, K.; Degnes, K.F.; Kemmler, M.; Bredholt, H.; Fjærvik, E.; Klinkenberg, G.; Sletta, H.; Ellingsen, T.E.; Zotchev, S.B. (2010) Production of a new thiopeptide antibiotic, TP-1161, by a marine *Nocardioopsis* species. **Applied and Environmental Microbiology**. 76(15): 4969-4976.
- Fehér, D.; Barlow, R.; Mcatee, J.; Hemscheidt, T.K. (2010) Highly brominated antimicrobial metabolites from a marine *Pseudoalteromonas* sp. **Journal of Natural Products**. 73(11): 1963-1966, 2010.
- Gantar, M.; Kaczmarek, L.T.; Stanic, D.; Miller, A. W.; Richardson, L.L. (2011) Antibacterial activity of marine and black band disease cyanobacteria against coral-associated bacteria. **Marine Drugs**. 9:2089-2105.
- Giordano, D.; Coppola, D.; Russo, R.; Denaro, R.; Giuliano, L.; Lauro, F.M.; Di Prisco, G.; Verde, C. (2015) Marine microbial secondary metabolites: pathways, evolution and physiological roles. **Advances in Microbial Physiology**. 66: 357-428.
- Graça, A.P.; Viana, F.; Bondoso, J.; Correia, M.I.; Gomes, L.; Humanes, M.; Reis, A.; Xavier, J.R.; Gaspar, H.; Lage, O.M. (2015) The antimicrobial activity of heterotrophic bacteria isolated from the marine sponge *Erylus deficiens* (Astrophorida, Geodiidae). **Frontiers in Microbiology**. 6:389.
- Holmström, C.; Kjelleberg, S. (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. **FEMS Microbiology Ecology**. 30(4): 285-293.
- Isnansetyo, A., Kamei, Y. (2003) *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov., a novel marine bacterium that produces phenolic anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* substances. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 53(2): 583-588.
- Lu, X.; Liu, X.; Long, C.; Wang, G.; Gao, Y.; Liu, J.; Jiao, B. (2011) A preliminary study of the microbial resources and their biological activities of the East China Sea. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 806485.
- Lucas-Elio, P.; Hernandez, P.; Sanchez-Amat, A.; Solano, F. (2005) Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. 1721(1): 193-203.
- Manimegalai, K.; Asha Devi, N.K.; Padmavathy, S. (2013) Marine fungi as a source of secondary metabolites of antibiotics. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research**. 4 (3): 275-282, 2013.
- Martins, R.F.; Ramos, M.F. Herfindal, L.; Sousa, J.A.; Skærven, K.; Vasconcelos, V.M. (2008) Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria - *Synechocystis* and *Synechococcus*. **Marine Drugs**. 6(1): 1-11.
- Mayer, A.M.; Rodríguez, A.D.; Berlinck, R.G.; Fusetani, N. (2011) Farmacologia marinha em 2007-8: compostos marinhos com atividades antibacterianas, anticoagulantes, antifúngicas, anti-inflamatórias, antimaláricas, antiprotozoárias, antituberculose e antivirais; afetando o sistema imunológico e nervoso e outros mecanismos de ação diversos. **Bioquímica Comparativa e Fisiologia Parte C: Toxicologia e Farmacologia**. 153(2): 191-222.
- Ng, T.B.; Cheung, R.C.F.; Wong, J.H.W.; Bekhit, A.A.; Bekhit, A.E. (2015) Antibacterial products of marine organisms. **Applied Microbiology Biotechnology**. 99: 4145-4173.

Nicolas, P.; Mor, A. (1995) Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. **Annual Reviews of Microbiology**. 49:277-304.

Nikapitiya, C. (2012) Bioactive secondary metabolites from marine microbes for drug discovery. Capitulo em: Potential marine microbes for natural product drug discovery. **Advances in Food and Nutrition Research**, 65.

Noor Ifatul, H.M.D.; Lee, H.Y.; Nazamid, S.; Wan Norhana, M.N.; Mahyudin, N.A. (2016) *In vitro* antibacterial activity of marine-derived fungi isolated from Pulau Redang and Pulau Payar Marine Parks, Malaysia against selected food-borne pathogens. **International Food Research Journal**. 23(6): 2681-2688.

Ojika, M.; Inukai, Y.; Kito, Y.; Hirata, M.; Iizuka, T.; Fudou, R. (2008) Miuraenamides: antimicrobial cyclic depsipeptides isolated from a rare and slightly halophilic myxobacterium. **Chemistry-An Asian Journal**. 3(1): 126-133.

Oku, N.; Adachi, K.; Matsuda, S.; Kasai, H.; Takatsuki, A.; Shizuri, Y. (2008) Ariakemicins A and B, novel polyketide-peptide antibiotics from a marine gliding bacterium of the genus *Rapidithrix*. **Organic Letters**. 10(12): 2481-2484.

Oku, N.; Kawabata, K.; Adachi, K.; Katsuta, A.; Shizuri, Y. (2008) Unnarmicins A and C, new antibacterial depsipeptides produced by marine bacterium *Photobacterium* sp. MBIC06485. **Journal of Antibiotics**. 61(1): 11-17.

Omran, N.E.E.; Allam, N.G. (2012) Screening of microbial contamination and antimicrobial activity of sea cucumber *Holothuria polii*. **Toxicology and Industrial Health**. 29(10): 944-954.

Radjasa, O.K.; Martens, T.; Grossart, H.P.; Brinkhoff, T.; Sabdono, A.; Simon, M. (2007) Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB4. 2 associated with coral *Acropora* sp. **Journal of Biological Sciences**. 7(2): 239-246.

Santos-Gandelman, J.F.; Giambiagi-Demarval, M.; Oelemann Laport, M.S. (2014) Biotechnological potential of sponge-associated bacteria. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 15: 143-155.

Shannon, E.; Abu-Ghannam, N. (2016) Review antibacterial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications. **Marine Drugs**. 14(81).

Shih, P.M.; Wu, D.; Latifi, A.; Axen, S.D.; Fewer, D.P.; Talla, E.; Calteau, A.; Cai, F.; Marsac, N.T.; Rippka, R.; Herdman, M.; Sivonen, K.; Coursin, T.; Laurent, T.; Goodwin, L.; Nolan, M.; Davenport, K. W.; Han, C.S.; Rubin, E.M.; Eisen, J.A.; Woyke, T.; Gugger, M.; Kerfeld, C.A. (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. **PNAS**. 110(3): 1053-1058.

Tarman, K.; Lindequist, U.; Wende, K.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L.A. (2011) Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of Indonesian marine habitats. **Marine Drugs**. 19: 294-306.

Terfehr, D.; Dahlmann, T.A.; Specht, T.; Zadra, I.; Kürnsteiner, H.; Kück, U. (2014) Genome sequence and annotation of *Acremonium chrysogenum*, producer of the  $\beta$ -lactam antibiotic cephalosporin C. **Genome Announcement**. 2(5).

Torres, Y.R.; Berlink, R.G.S.; Nascimento, G.G.F.; Fortier, S.C.; Pessoa, C.; Moraes, M.O. (2002) Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **Toxicon**. 40(7): 885-891.

Uzair, B.; Tabassum, S.; Rasheed, M.; Rehman, S.F. (2012) Exploring marine cyanobacteria for lead compounds of pharmaceutical importance. **The Scientific World Journal**.

Villa, F.A.; Gerwick, L. (2010) Descoberta de medicamentos para produtos naturais marinhos: Leads

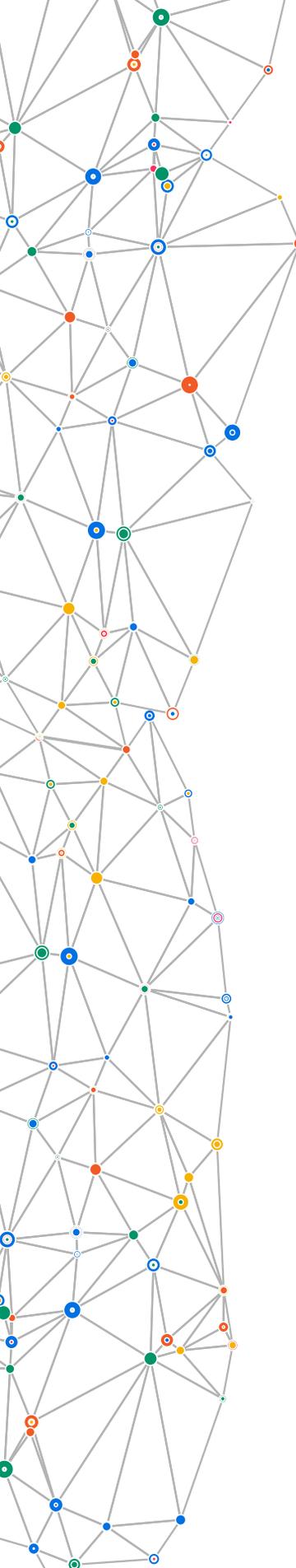
para tratamento de inflamação, câncer, infecções e distúrbios neurológicos. **Immunofarmacologia e Imunotoxicologia**. 32(2): 228-237.

Xu, L.; Meng, W.; Cao, C.; Wang, J.; Shan, W.; Wang, Q. Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. **Marine Drugs**. 13: 3479-3513.

Zhang, D.J.; Liu, R.F.; Li, Y.G.; Tao, L.M.; Tian, L. (2010) Two new antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 58(12): 1630-1634.

Zheng, J.; Wang, Y.; Wang, J.; Liu, P.; Li, J.; Zhu, W. Antimicrobial ergosteroids and pyrrole derivatives from halotolerant *Aspergillus flocculosus* PT05-1 cultured in a hypersaline medium. **Extremophiles**. 17(6): 963-971.





# BIOTECNOLOGIA MARINHA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTICÂNCER

Paula C. Jimenez<sup>a</sup>

Diego V. Wilke<sup>b</sup>

Otília Deusdênia L. Pessoa<sup>b</sup>

Gláucia M. Machado-Santelli<sup>c</sup>

Letícia V. Costa-Lotuf<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de São Paulo

<sup>b</sup> Universidade Federal do Ceará

<sup>c</sup> Universidade de São Paulo

## RESUMO

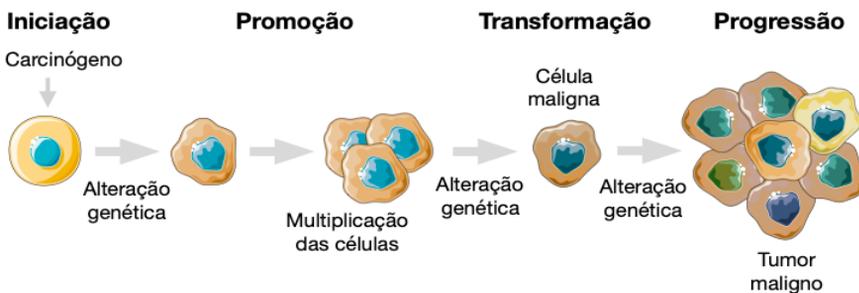
Neste capítulo, discutiremos a contribuição da biotecnologia marinha para o desenvolvimento de fármacos anticâncer, substâncias capazes de matar as células tumorais ou alterar a sua capacidade proliferativa. Existem oito fármacos de origem marinha aprovados para uso clínico, sendo quatro deles utilizados no tratamento do câncer: citarabina, trabectedina, eribulina e bretuximabe vedotina. O desenvolvimento desses medicamentos trouxe ensinamentos muito valiosos para contornar os problemas mais comumente encontrados, como a toxicidade e o suprimento dessas substâncias. A história desses fármacos, juntamente à de duas outras substâncias que se encontram em diferentes fases de ensaios clínicos, a plitidepsina e a salinosporamida A, será aqui discutida com o objetivo de ilustrar, com exemplos de sucesso, as etapas envolvidas no processo, bem como o potencial de inovação associado ao desenvolvimento de um novo medicamento a partir de recursos marinhos. Na segunda parte do capítulo, discutiremos os aspectos técnicos relacionados à pesquisa visando à obtenção de produtos naturais marinhos com atividade anticâncer, abordando a coleta do material biológico, técnicas de obtenção e cultivo de micro-organismos marinhos, métodos de extração, isolamento e identificação química de substâncias bioativas, bem como diferentes abordagens para avaliação da atividade biológica.

# 1 | O QUE SÃO FÁRMACOS ANTICÂNCER

## 1.1 DEFINIÇÃO

Antes de definirmos fármacos anticâncer, devemos fazer algumas considerações sobre a doença. Câncer, ou neoplasia maligna, é o nome dado a um grupo de doenças caracterizado pela proliferação celular anormal, em que as células adquirem independência dos mecanismos normais de sinalização responsáveis pela manutenção da homeostase tecidual. O processo de carcinogênese, em geral, dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Classicamente, esse processo é definido por três estágios (Figura 1):

- **Iniciação:** Neste primeiro estágio, as células sofrem o efeito de agentes carcinogênicos (agente oncoiniciador) que alteram alguns de seus genes, podendo levar à imortalização celular. Os agentes carcinogênicos a que estamos expostos dependem do ambiente e estilo de vida e podem ser químicos, físicos ou biológicos.
- **Promoção:** As células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna de forma lenta e gradual. Essa fase pode ser revertida se a ação do agente promotor for suprimida.
- **Progressão:** O tumor maligno entra em fase irreversível de crescimento, adquirindo a capacidade de invasão dos tecidos vizinhos e metastização. Nesse estágio, surgem ainda as primeiras manifestações clínicas da doença.

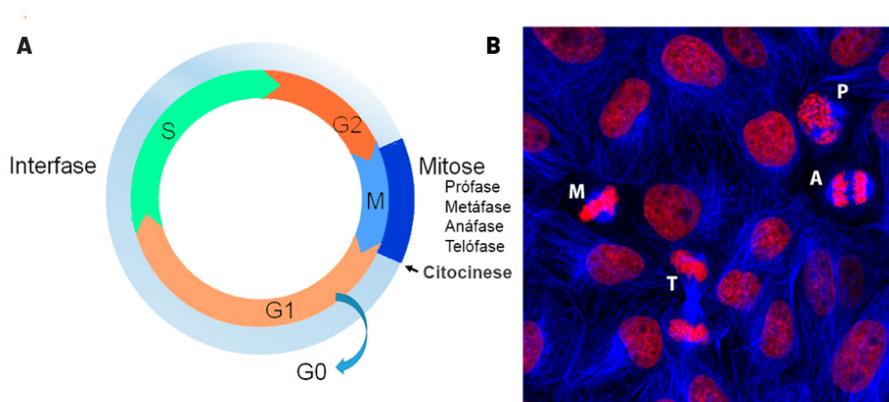


**Figura 1.** Desenho esquemático ilustrando os estágios do processo de carcinogênese.

O câncer é, portanto, uma doença genética e não hereditária, uma vez que é consequência de alterações do DNA ou mutações somáticas que conferem vantagens proliferativas às

células. As formas esporádicas representam a maioria dos casos (>90%), havendo uma minoria de incidência familiar. Dois tipos de genes estão envolvidos no processo de transformação de uma célula normal em maligna. No controle positivo do processo estão os proto-oncogenes, que podem ser transformados em oncogenes por mutações pontuais, translocação ou amplificação. Contrapondo-se a eles, os supressores de tumor exercem um controle negativo sobre a proliferação celular desregulada e têm de ser inativados.

Nesse contexto, o principal foco na busca de substâncias com potencial ação anticâncer tem sido o ciclo celular (Figura 2) que, por sua vez, exibe mecanismos de controle positivos e negativos. Seguem-se a este os processos de invasão e migração celular, associados, portanto, a fases mais avançadas da doença.



**Figura 2.** A) Esquema representativo do ciclo celular: círculo externo indicando interfase e mitose; círculo interno mostrando a sequência das fases G1 (Gap 1), S (Síntese), G2 (Gap 2) e M (Mitose). B) Imagem obtida ao microscópio confocal de varredura a laser de cultura de células epiteliais (linhagem MDCK) que tiveram os microtúbulos evidenciados por imunofluorescência (azul) e o DNA corado por iodeto de propídeo (vermelho). As letras indicam as fases da mitose entre as células interfásicas: prófase (P), metáfase (M), anáfase (A) e telófase (T).

É interessante lembrarmos que, no início do século passado, as primeiras tentativas de tratamento do câncer tiveram como base o uso de elementos radioativos, e que esta foi a origem da radioterapia. Durante a 1ª Guerra Mundial, experimentos com o gás mostarda, na tentativa de desenvolver armas químicas, mostraram que esse composto causava supressão celular na medula óssea. Por isso, foi proposto seu uso na terapia de leucemias e linfomas, dando origem à quimioterapia.

Fármacos antineoplásicos ou anticâncer são, portanto, em primeira instância, agentes capazes de matar as células tumorais ou alterar a sua capacidade proliferativa. O objetivo da terapia é a cura ou a remissão prolongada da doença. A terapia adjuvante complementa a remoção cirúrgica ou a radioterapia do tumor, e é usada para eliminar possíveis células malignas residuais, como micrometástases, por exemplo.

De acordo com o mecanismo de ação, podemos classificar os compostos anticâncer em dois grupos: citotóxicos e alvo-específicos. Os compostos anticâncer podem ter efeito cito-

tóxico independente do ciclo celular ou ter ação ciclo-específica, agindo maiormente durante uma fase particular do ciclo celular, como na fase de replicação do DNA (fase S) ou em mitose (fase M). Dentre os compostos citotóxicos, podemos citar agentes alquilantes; os derivados de platina, como a cisplatina, carboplatina e outros; os chamados “venenos do fuso” que atuam na dinâmica dos microtúbulos, como os alcaloides da vinca e taxanos; antimetabólitos; inibidores da topoisomerase-2, como o etoposídeo; inibidores da síntese de DNA como a hidroxiureia; e, ainda, alguns antibióticos.

Agentes alvo-específicos são, de um modo geral, mais recentes e incluem moléculas que reconhecem vias de sinalização relevantes no processo de câncer. Os alvos típicos são proteínas superexpressas ou mutadas e que caracterizam, muitas vezes, uma população de células tumorais. Essa estratégia terapêutica reduz a toxicidade inespecífica, característica dos agentes antineoplásicos citotóxicos. Esses fármacos incluem os inibidores dos receptores de estrógeno (ex. tamoxifeno), inibidores de tirosina quinase (ex. imatinibe, nilotinibe), inibidores do receptor de EGF (gefitinibe, erlotinibe), inibidores de angiogênese (bevacizumabe), entre muitos outros.

Dentre os fármacos anticâncer, cerca de 80% estão relacionados a um produto natural obtido de plantas, micro-organismos e, mais recentemente, organismos marinhos. Quando consideramos os chamados agentes biológicos, que incluem anticorpos monoclonais e vacinas, esse percentual cai para cerca de 60%, mostrando a crescente contribuição desses fármacos na terapia do câncer (Newman; Cragg, 2016).

## 1.2 HISTÓRICO

Os produtos naturais, i. e., substâncias produzidas naturalmente pelos seres vivos, são a base do tratamento farmacológico das doenças humanas desde as civilizações mais antigas. O testemunho mais remoto dessa prática data, provavelmente, de 2600 a.C., na Mesopotâmia, onde são citadas algumas plantas e seu uso contra determinadas moléstias, registrado em escrita cuneiforme em tábuas de barro. A medicina egípcia tem como seu documento mais conhecido e citado o Papiro de Ebers, de 1500 a.C., que cataloga aproximadamente 700 fórmulas terapêuticas, incluindo, em sua maioria, plantas. Na China e na Índia, a documentação de uma prática seguramente mais antiga que esse registro é datada, inicialmente, em 1100 a.C. e 1000 a.C., respectivamente, nos tratados *Wu Shi Er Bing Fang* e *Sushruta Samhita* e *Charaka Samhita* (revisado por Cragg; Newman, 2005).

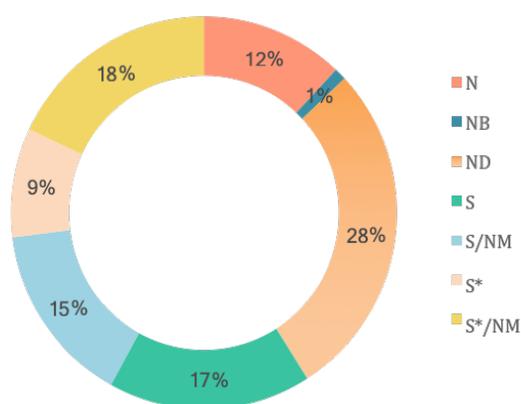
Os gregos, por sua vez, deram imprescindíveis subsídios à medicina tradicional, cujas obras mais relevantes são *História das Plantas*, por Theophrastus, 300 a.C., e *De Materia Medica*, por Dioscorides, em aproximadamente 100 d.C. Nesse contexto, o boticário Galeno, que praticou e ensinou farmácia e medicina em Roma, c. 200 d.C., era conhecido por suas complexas formulações herbáceas, que foram difundidas pela Europa em quase 30 publicações. Nas Américas, os colonizadores resgataram valiosos conhecimentos tradicionais para a prática terapêutica nas comunidades indígenas nativas e os registraram, produzindo diversos tratados de etnofarmacologia (revisado por Spainhour, 2005).

A exploração de produtos naturais por suas propriedades farmacológicas é uma prática

comum até os tempos modernos e tem papel fundamental na descoberta de novos medicamentos. A grande diversidade química distribuída em milhões de organismos não é meramente ocasional, e reflete o impacto da evolução na seleção e conservação de estratégias de sucesso para sobrevivência e prevalência das espécies (Farnsworth, 1985; Cragg et al., 1997). Em termos de funcionalidade, os produtos naturais ocupam posição privilegiada, com atributos estruturais propícios à interação com moléculas biológicas de relevância em vários processos celulares, tornando-se extremamente promissores para aplicação farmacológica (Feher; Schmidt, 2003; Grabowski; Schneider, 2007; Harvey, 2008).

Os produtos naturais com aplicação farmacológica são geralmente classificados como metabólitos secundários, ou seja, moléculas que são produzidas por vias condicionais e ativadas em contextos ou situações particulares, mas não essenciais à vida (Clardy; Walsh, 2004). Nesse conjunto, a citotoxicidade aparece entre as atividades de maior ocorrência. Essa atividade biológica guarda íntima relação com a função dessas moléculas nos organismos produtores, geralmente utilizadas como defesa química, reduzindo a predação ou aumentando o sucesso na acirrada competição por espaço no ambiente. Esses atributos de “toxicidade” são importantes quando pensamos na aplicação na terapia anti-infecciosa e anticâncer, em que o objetivo primordial passa a ser a eliminação do agente infeccioso e das células tumorais, respectivamente. De fato, é justamente na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para essas doenças que os fármacos relacionados a fontes naturais se destacam.

No caso particular da terapia do câncer, os produtos naturais correspondem à maior fatia dos medicamentos incluídos no arsenal de tratamento desde 1981 até 2014, como destacado na Figura 3. Dos 136 fármacos introduzidos na clínica durante esse período<sup>1</sup>, 113 deles podem ter sua procedência relacionada com uma substância encontrada na natureza, portanto cerca de 83% dos quimioterápicos usados no tratamento do câncer têm, em alguma instância, origem natural, incluindo protótipos, derivados sintéticos ou semissintéticos, mimicos de função ou o composto original em si (Newman; Cragg, 2016).



**Figura 3.** Distribuição por origem de todos os fármacos anticâncer identificados no período de 1981 a 2014. “N”: produto natural em si; “NB”: fitomedicamento de composição definida; “ND”: derivado semissintético de produto natural; “S”: totalmente sintético, normalmente encontrado de modo randômico ou modificado a partir de um agente preexistente; “S\*”: originado por síntese total, mas com o grupo farmacofórico de produto natural; “NM”: mímico funcional de um produto natural. Fonte: Newman; Cragg, 2016.

<sup>1</sup> Neste diagnóstico, não foram consideradas as vacinas nem macromoléculas de alto peso molecular obtidas de um organismo ou linhagem celular.

Neste contexto, é adequado ressaltar que foram os tradicionais grupos de plantas e, em menor grau, os micro-organismos do solo que forneceram quase a totalidade das moléculas que estão em uso clínico. Contudo, o ambiente marinho já desponta como um recurso promissor para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais. Mares e oceanos cobrem mais de 70% da superfície terrestre e abrigam representantes de quase todos os grupos de organismos vivos. Até poucas décadas atrás, esse ecossistema desviou-se da atenção dos cientistas de produtos naturais, principalmente devido ao difícil acesso às suas profundidades. Com o avanço das técnicas e o advento de equipamentos seguros de mergulho, por volta da década de 50 e, mais sistematicamente, na década de 70, os produtos naturais marinhos alinharam-se, por certo, à história da farmacologia (Fenical, 1997).

### 1.3 ALGUNS EXEMPLOS DE ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA

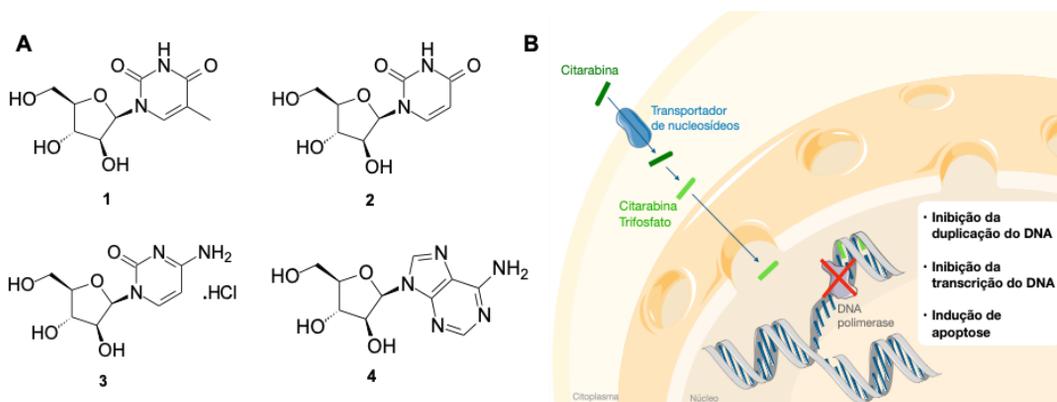
Neste tópico, serão abordados os quatro fármacos marinhos já aprovados para tratamento clínico do câncer, a saber, citarabina, trabectedina, eribulina e bretuximabe vedotina. Vale ressaltar que, em 2017, todos esses medicamentos foram licenciados pela ANVISA e autorizados para prescrição e uso no Brasil. Mais além, dois outros exemplos considerados fundamentais também serão explorados neste tópico, como a molécula plitidepsina, que já cumpriu todas as etapas de ensaios clínicos com sucesso e aguarda autorização das agências europeia e americana para comercialização, e a salinosporamida A, um composto obtido de uma bactéria marinha que se encontra ainda fase de desenvolvimento, mas já se mostra muito promissor farmacologicamente, além de indicar o potencial dos micro-organismos marinhos como fonte dos próximos medicamentos anticâncer.

#### 1.3.1 CITARABINA

O pesquisador Werner Bergmann, da Universidade de Yale, e um conjunto de colaboradores, ao longo dos anos 40 e 50, principalmente, publicaram diversos artigos numa série que chamaram de “Contribuições ao estudo de produtos marinhos” (Lester; Bergmann, 1941; Bergmann; Stansbury, 1944; Bergmann; Feeney, 1951; Bergmann; Burke, 1955; 1956; Bergmann; Stempien Jr, 1957). O mais notório desses trabalhos foi o que resultou no isolamento dos arabinonucleosídeos espongotimidina (**1**) e espongouridina (**2**) (Figura 4A) da esponja caribenha de águas rasas *Cryptotethya crypta* (hoje renomeada como *Tectitethya crypta*), de 1951 (Bergmann; Feeney, 1951). A descoberta de tais nucleosídeos teve dois importantes desdobramentos científicos: o primeiro foi a quebra do paradigma vigente de que um nucleosídeo só teria função biológica se tivesse ribose ou deoxirribose em sua estrutura; o segundo foi a inauguração do conceito farmacológico dos antimetabólitos no contexto da quimioterapia anticâncer, com a síntese do análogo dos arabinonucleosídeos naturais, a citosina arabinose (**3**), e o desenvolvimento da citarabina (Ara-C).

Um fármaco antimetabólito é aquele que tem estrutura suficientemente similar à de um metabólito produzido naturalmente pelo organismo para ser reconhecido como tal, mas não

tem a capacidade de manter a sua função, interferindo, conseqüentemente, no metabolismo celular normal (Katzung; Trevor, 2014). Nesse contexto, como os seus protótipos naturais, o mecanismo de ação da citarabina baseia-se na sua rápida conversão ao respectivo arabinonucleosídeo trifosfatado através de fosforilações sequenciais. A citarabina trifosfatada passa a ser, então, um substrato da DNA-polimerase e é, subseqüentemente, incorporada ao DNA no lugar de uma citidina. Entretanto, devido à ocorrência de arabinose em lugar da deoxirribose, a citarabina trifosfatada, agora ligada ao DNA, impede a formação da ligação fosfodiéster entre as duas pentoses e, conseqüentemente, a extensão da fita, interrompendo, assim, o processo de síntese de DNA (Köning; Wright, 1996; Schwartzmann et al., 2001)(Figura 4B).



**Figura 4.** A) Estruturas da espongotimidina (1) e esponouridina (2), nucleosídeos isolados da esponja *Cryptotethya crypta* e de seus derivados sintéticos citarabina (3) e vidarabina (4). B) Desenho ilustrativo do mecanismo de ação da citarabina em células tumorais.

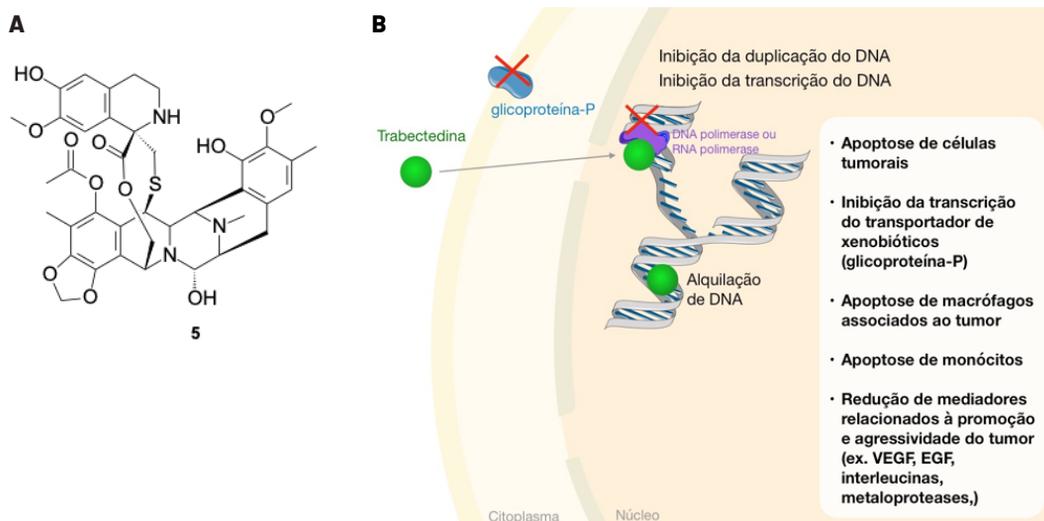
A citarabina foi aprovada para uso clínico em 1969 e segue, ainda hoje, amplamente empregada no tratamento de diversos tipos de leucemias, como leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica e linfoma não-Hodgkin. Ainda que essa molécula seja um análogo sintético e não o produto natural em si, a citarabina é historicamente relatada como o primeiro exemplo de um fármaco marinho comercialmente disponível.

Entretanto, é importante ressaltar que o princípio de empregar um nucleosídeo não-funcional para inibir a elongação da fita de DNA, consagrado pelos arabinonucleosídeos de *C. crypta*, é utilizado como estratégia em outros tratamentos quimioterápicos. Outro desses análogos, a adenina arabinose, foi desenvolvido no fármaco antiviral vidarabina (4) (Ara-A), utilizado clinicamente desde 1976 para tratamento de *Herpes simplex* e *Varicella zoster*, entre outras infecções virais. Finalmente, merece destaque, nesse contexto, o antiviral azidotimidina (AZT ou zidovudina), o primeiro tratamento disponível para a AIDS e parte da lista modelo de medicamentos essenciais da OMS. Essa molécula, um análogo de timidina com uma cauda de N ligada à pentose, foi sintetizada em 1964 com pretensões anticâncer que não se concretizaram. Entretanto, quando do alastramento da epidemia da AIDS em meados da década de 80 e da corrida por um composto anti-HIV, a AZT mostrou-se extremamente eficaz em bloquear a enzima viral transcriptase reversa, crucial para a replicação do retrovírus HIV (Fischl et al., 1987).

### 1.3.2 TRABECTEDINA

A atividade anticâncer de extratos obtidos da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata* já era conhecida desde os anos 60 (Sigel et al., 1969), mas o isolamento e a elucidação estrutural de seu princípio ativo deram-se mais de 20 anos depois, por Rinehart e colaboradores, em 1990. ET-743 (**5**), também chamada de ecteinascidina 743 ou trabectedina (Figura 5A), foi identificada como o mais abundante entre os seis alcaloides estruturalmente relacionados produzidos pela ascídia.

O estudo de seu modo de ação reconheceu essa molécula como um alquilante de DNA, sendo que seu mecanismo difere da maioria dos agentes alquilantes típicos (Figura 5B). A trabectedina liga-se aos resíduos de guanina arranjados em sequências específicas nas fendas menores da dupla hélice, causando uma dobra nas fitas de DNA (Pomier et al., 1996; Zewail-Foote; Hurley, 1999). Esse dobramento tem diversas consequências celulares, sendo evidente, nesse contexto, o bloqueio da transcrição através da inibição da atividade da RNA polimerase II (Erba et al., 2001; Garcia-Rocha; Bonay; Avila, 1996; Bonfanti et al., 1999). A inibição da transcrição do gene MDR1 é um dos efeitos mais relevantes, sendo esse gene responsável pela produção de glicoproteína-P, que atua no processo de desintoxicação celular (Jin et al., 2000; Kankazi et al., 2002). Mais além, a transcrição e consequente produção de chaperonas como as HSPs (proteínas de choque térmico) também são afetadas (Minuzzo et al., 2000; Feuerhahn et al., 2011). A via TC-NER (reparo por excisão de nucleotídeos acoplados à transcrição), que atua no reparo de lesões ao DNA detectadas durante o processo de transcrição, também parece ser comprometida pelo efeito da trabectedina, tendo sido demonstrado, inclusive, que células TC-NER deficientes são resistentes ao efeito dessa substância (Erba et al., 2001; Zewail-Foote et al., 2001).



**Figura 5.** A) Estrutura da trabectedina (**5**, ecteinascidina 753, ET-743) isolada da ascídia *Ecteinascidia turbinata*. B) Desenho ilustrativo do mecanismo de ação da trabectedina em células tumorais.

Merecem destaque, ainda, os recentes achados acerca dos efeitos da trabectedina sobre o microambiente tumoral (MAT). O MAT contém células não-tumorais, como macrófagos, que estão em ativa comunicação com as células tumorais. Esses macrófagos liberam mediadores inflamatórios, além de fatores de crescimento e neo-angiogênicos que facilitam a disseminação das células tumorais. Enquanto as células do MAT são normalmente quiescentes e possuem pouca sensibilidade à maioria dos tratamentos quimioterápicos, a trabectedina mostrou-se capaz de reduzir a resposta inflamatória tumoral, além de ativar caspase 8 e induzir a morte por apoptose desses macrófagos (D'Incalci et al., 2014).

A trabectedina foi obtida por síntese total pela primeira vez em 1996, por Corey e colaboradores, a partir de um processo extremamente complexo e com baixo rendimento do produto final (Corey; Gin; Kania, 1996). Alguns anos depois, o mesmo grupo conseguiu simplificar o processo e melhorar o seu rendimento, entretanto a síntese química não se mostrou eficaz em fornecer trabectedina em quantidades suficientes para suprir a demanda da clínica. O cultivo da ascídia em fazendas marinhas (ou maricultura) foi também considerado como opção para contornar as questões ligadas ao suprimento da molécula. Todavia, a ocorrência de trabectedina nos extratos da ascídia *Ecteinascidia turbinata* era inconstante, mas geralmente reduzida quando comparada aos organismos encontrados sob circunstâncias ecológicas naturais, visto que 1 ton de ascídia cultivada era suficiente para o isolamento de apenas 1g da molécula (Cuevas; Francesch, 2009). O suprimento de trabectedina para garantir a comercialização do produto e seu uso clínico adveio do desenvolvimento de um processo de semissíntese a partir do intermediário cianossafracina B, um antibiótico obtido em larga escala da bactéria marinha *Pseudomonas fluorescens* (Cuevas et al., 2000).

A trabectedina, sob o registro de Yondelis<sup>®</sup>, foi desenvolvida pela PharmaMar, uma indústria farmacêutica que atua exclusivamente na pesquisa e desenvolvimento de fármacos a partir de organismos marinhos. Vale destacar que esta foi a primeira molécula natural marinha a ser aprovada para uso clínico na quimioterapia do câncer, além de ter sido o primeiro medicamento em 20 anos validado para o tratamento de sarcoma de tecidos moles. Yondelis<sup>®</sup> recebeu autorização da EMEA para a comercialização em 2007. A FDA, entretanto, aprovou o uso do Yondelis<sup>®</sup> apenas em 2015.

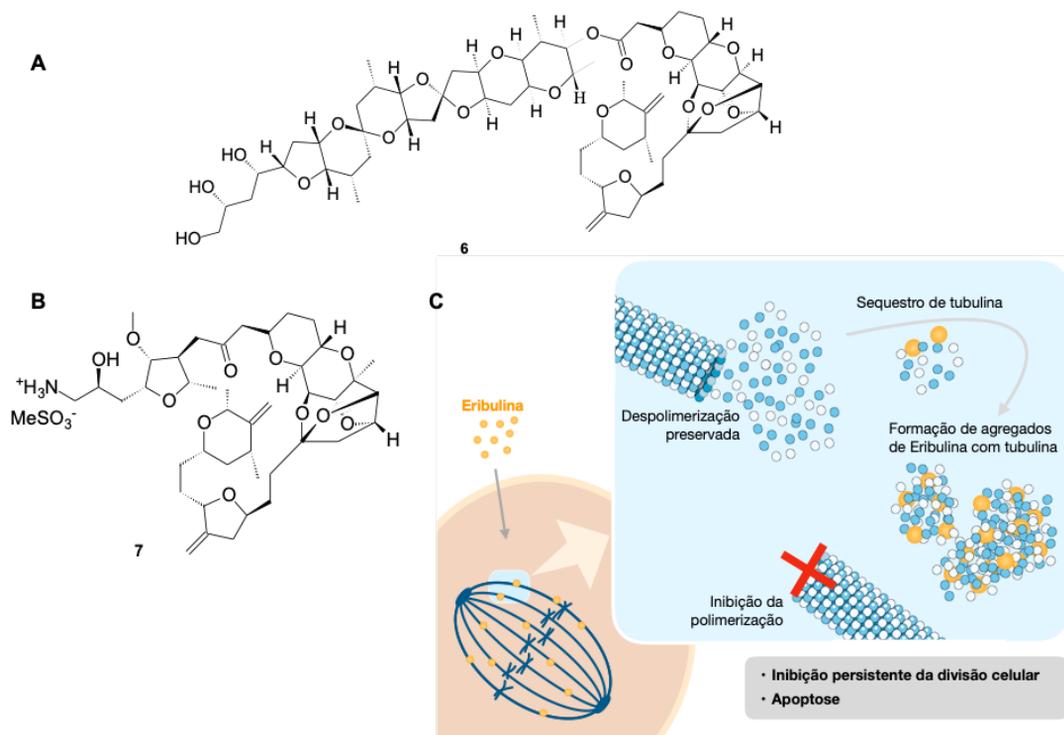
### 1.3.3 HALICONDRINA B

As halicondrinas são uma série de poliéteres macrocíclicos com pronunciada atividade anticâncer tanto *in vitro* como *in vivo* isolados por Hirata e Uemura em 1986 da esponja *Halicondria okadai*, coletada na costa do Japão, na península de Miura, ao sul de Tóquio. Entre elas, a halicondrina B (**6**) (Figura 6A), uma molécula de alto peso molecular (aproximadamente 1.110g/mol), serviu de protótipo para o seu análogo eribulina (**7**), na forma de sal de mesilato (Figura 6B).

A rota de síntese total da halicondrina B foi determinada por Aicher e seus colaboradores, em 1992. Ao longo desse processo, estudos da relação entre estrutura e atividade biológica demonstraram que era o anel macrocíclico e não necessariamente a cauda lateral, a porção da molécula responsável por sua atividade anticâncer (Yu, Kishi; Littlefield, 2005). Desse modo, o

mesilato de eribulina, que manteve quase exclusivamente o anel macrocíclico, reduzindo praticamente pela metade o seu peso molecular (para 729,90g/mol), é, até hoje, o medicamento mais complexo obtido por síntese total (Yu, Zheng; Seletsky, 2013).

O mesilato de eribulina é, como a molécula natural, um potente antimitótico, atuando como inibidor da dinâmica dos microtúbulos e Cl50 na ordem de nM *in vitro*. Seu alvo de ação específico é a tubulina, onde se liga em regiões específicas dessa proteína, impedindo a sua polimerização e consequente inibição da extensão dos microtúbulos (Figura 6C). Dessa forma, a célula permanece em bloqueio irreversível em mitose e a prolongação desse estado induz, enfim, à morte por apoptose (Jordan et al., 2005). A eribulina foi desenvolvida pela Eisai, uma indústria farmacêutica japonesa que tem também sede nos EUA, além de ter considerável suporte do Instituto Nacional do Câncer americano (NCI) durante esse processo. Em 2010, batizado como Halaven, foi aprovado pela FDA para tratar câncer de mama metastático em estágio avançado e, em 2016, como segunda linha de tratamento para a terapia de lipossarcoma (Newman; Cragg, 2016).

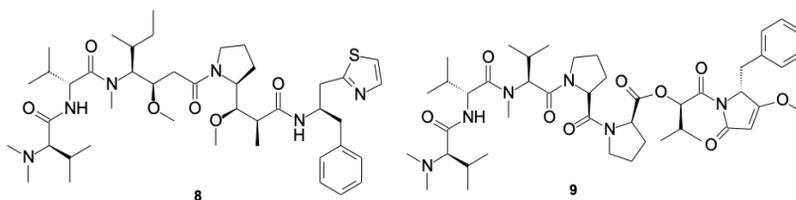


**Figura 6.** A) Estruturas da halicondrina (6) isolada da esponja *Halichondria okadaei* e de seu derivado sintético mesilato de eribulina (7). B) Desenho ilustrativo do mecanismo de ação da eribulina em células tumorais.

### 1.3.4 DOLASTATINAS

Em 1972, extratos obtidos do molusco gastrópode *Dolabella auricularia*, encontrado no Oceano Índico, destacaram-se por sua pronunciada atividade anticâncer. Contudo, apenas 15 anos depois, os peptídeos chamados dolastatinas foram identificados como os princípios ativos

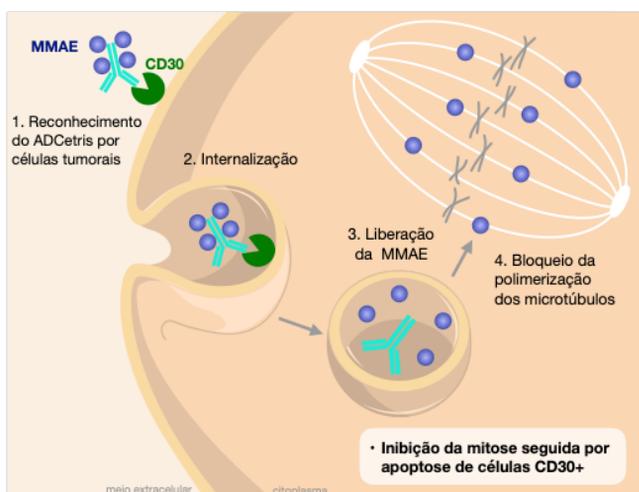
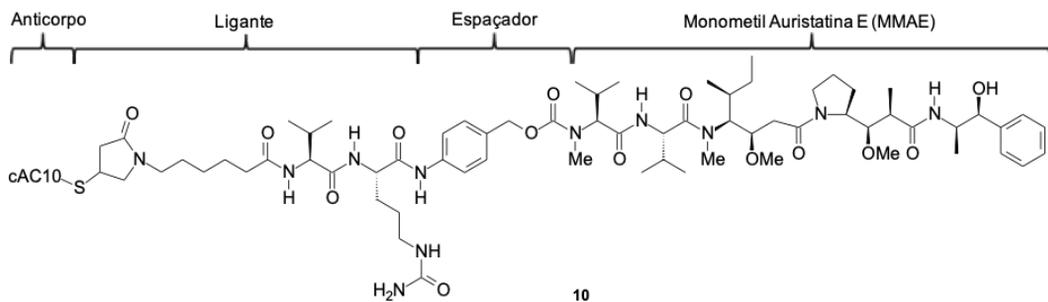
desses extratos, dentre os quais sobressaíram as dolastatinas 10 (**8**) e 15 (**9**) (Figura 7) por suas potentes atividades antiproliferativas contra diversas linhagens de células tumorais (Pettit et al., 1987). Mais além, foi constatado que a tubulina é o principal alvo de ação desses peptídeos e, portanto, o bloqueio da polimerização dos microtúbulos e, conseqüentemente, da divisão celular, é o mecanismo pelo qual as dolastatinas inibem a proliferação dessas células (Pettit, 1997).



**Figura 7.** Estruturas das dolastatinas 10 (**8**) e 15 (**9**) isoladas do molusco *Dolabella auricularia*.

Apesar da extraordinária atividade *in vitro* das dolastatinas – a dolastatina 10, p. ex., demonstrou CI50 na ordem de pM contra um painel de células tumorais –, nenhum desses peptídeos, tampouco seus derivados sintéticos, como auristatina (soblidotina), cematodina e sintatodina, progrediu nos ensaios clínicos para além da fase II (Vaishampayan et al., 2000; Perez et al., 2005). Entretanto, a monometilauristatina E (MMAE ou vedotina), um dos derivados da auristatina, entrou, com sucesso, na composição do complexo anticorpo-droga (CAD) brentuximabe vedotina (**10**) (Figura 8), desenvolvido pela empresa norte-americana Seattle Genetics e nomeado comercialmente de ADCetris® (Doronina et al., 2003; Senter; Sievers, 2012). Os CADs são formulações compostas de um anticorpo monoclonal covalentemente ligado ao agente farmacológico (Storz, 2015). No caso específico da brentuximabe vedotina, o anticorpo é dirigido à proteína de membrana CD30, também reconhecida com um marcador tumoral para alguns tipos de linfomas. Assim, o princípio ativo vedotina é seletivamente direcionado às células que expressam CD30, sendo que células tumorais o fazem em maiores quantidades. O reconhecimento do anticorpo brentuximabe pela proteína CD30 leva à internalização do CAD e, dentro da célula, por clivagem proteolítica, libera do complexo a vedotina. Por sua vez, a vedotina livre alcança o seu alvo de ação, bloqueia a divisão celular e induz, finalmente, a morte celular (Senter; Sievers, 2012) (Figura 8).

O ADCetris® foi aprovado em 2012 para o tratamento de linfoma de Hodgkin, um tipo de câncer que se distingue pela alta expressão de CD30. Entretanto, a MMAE está sendo usada na composição de outros CAD, sendo o anticorpo do complexo direcionado a outras proteínas de membrana, mas que por ora ainda se encontram em fase de testes clínicos. A glembatumabe vedotina (CDX-011) reconhece células com expressão da glicoproteína transmembrana NBM, e está sendo testada em pacientes com melanoma em estágio avançado, como também com câncer de mama metastático. Pinatuzumabe vedotina e polatuzumabe vedotina, cujos anticorpos são direcionados, respectivamente, às proteínas CD22 e CD79b, estão sendo testados para o tratamento de leucemias e linfomas (revisado por Newman; Cragg, 2017).



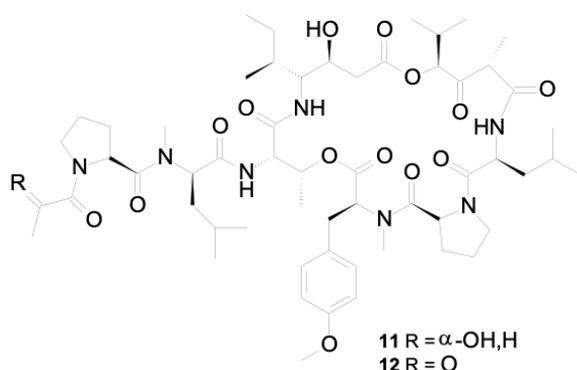
**Figura 8.** A) Estrutura da brentuximabe vedotina 10 (10) desenvolvida pela empresa norte-americana Seattle Genetics e nomeada comercialmente de ADCetris®. B) Desenho ilustrativo do mecanismo de ação do ADCetris® em células tumorais que expressam o antígeno CD30.

### 1.3.5 PLITIDEPSINA

Durante expedição de coleta ao Caribe, em 1978, observou-se que extratos da ascídia *Trididemnum solidum* apresentaram potente atividade citotóxica, imunomoduladora e antimicrobiana. A posterior investigação química desses extratos levou ao isolamento da série de depsipeptídeos cíclicos denominados didemninas (Rinehart et al., 1981, 1988; Li; Joullie, 1992; Sakai et al., 1996), das quais a didemnina B (11) (Figura 9) mostrou-se a mais interessante. Em estudos *in vitro* e *in vivo*, a didemnina B demonstrou potente atividade citotóxica, com a  $IC_{50}$  na ordem de nanomolar, e notória atividade contra leucemias e melanomas (Rinehart et al., 1981; Faulkner, 2000). A didemnina B iniciou os ensaios clínicos em 1986, sendo, então, o primeiro composto marinho em sua forma natural a entrar para testes clínicos. Variados esquemas de tratamento foram propostos para diversos tumores, mas a didemnina B mostrou ser tóxica demais para avançar nos ensaios clínicos, que foram interrompidos na fase II, em meados da década de 90 (Vera; Joullie, 2002).

Não tardou, surgiu a plitidepsina (12), um depsipeptídeo cíclico análogo da didemnina B e naturalmente obtido da ascídia mediterrânea *Aplidium albicans*, trazendo resultados instigantes (Rinehart, 2000). Também conhecida por aplidina ou deidrodidemnina B, por se diferenciar apenas pela oxidação de um radical em sua cadeia lateral, essa molécula demonstrou ser a mais

ativa num estudo relacionando estrutura e atividade antiviral e citotóxica de uma série de 42 didemninas análogas naturais ou sintéticas (Sakai et al., 1996). Seu mecanismo de ação principal está relacionado à inibição da síntese proteica e consequente indução de morte celular por apoptose. Entretanto, após muitos anos de investigação, foi determinado que a plitidepsina liga-se especificamente à proteína eEF1A2 (Losada et al., 2016), o fator de alongamento eucariótico-1 alfa-2, que acompanha o complexo tRNA e respectivo aminoácido e atua na formação da ligação peptídica. A inibição de eEF1A2 interrompe a síntese de novas proteínas, induzindo ao bloqueio da divisão e, logo, à morte celular.



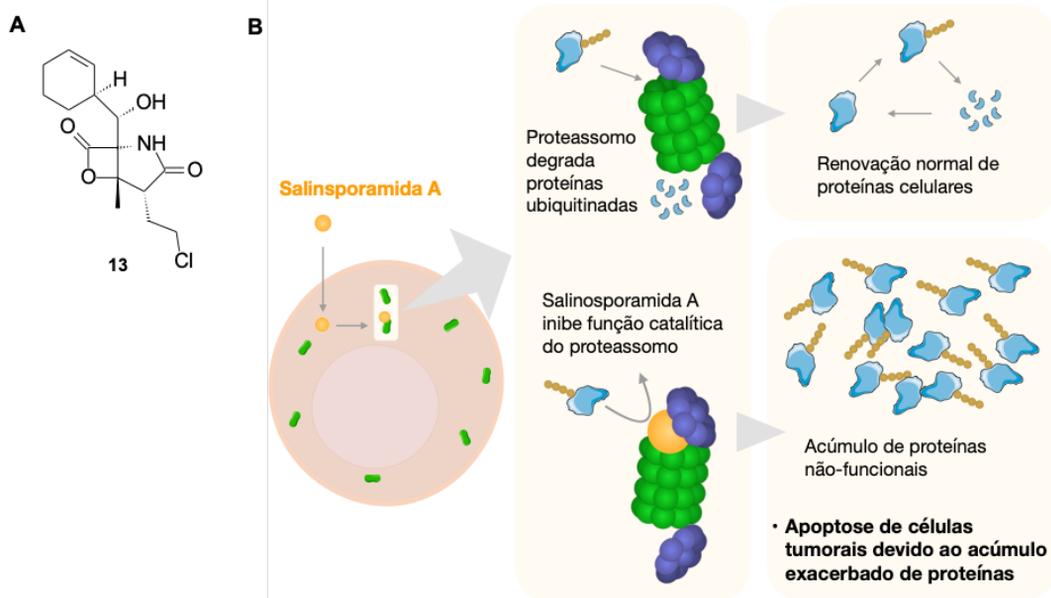
**Figura 9.** Estruturas da didemnina B (11) isolada da ascídia *Trididemnum solidum*, e da plitidepsina (12) isolada de *Aplidium albicans*.

A plitidepsina, sob o registro de Aplidin<sup>®</sup>, ingressou nos testes clínicos em 1999, beneficiando-se transversalmente das informações geradas nos ensaios com a didemnina B. Convenientemente, as poucas diferenças estruturais entre as duas moléculas, bem como ajustes nos esquemas de tratamento, transformaram substancialmente o seu perfil toxicológico (Newman; Cragg, 2004; 2006) e o Aplidin<sup>®</sup>, que já fora designado medicamento órfão pela EMEA e FDA, finalizou a fase III dos ensaios clínicos para tratamento de mieloma múltiplo, com indicações de resultados positivos. A PharmaMar, que atuou integralmente no processo de pesquisa e desenvolvimento desse produto, já submeteu o pedido de autorização para comercialização desse medicamento e deve, em breve, lançar o seu segundo fármaco marinho no mercado.

### 1.3.6 SALINOSPORAMIDA A

Os micro-organismos marinhos passaram a ser investigados como fonte de novos fármacos anticâncer, ainda que timidamente, a partir do final da década de 80. Nas primeiras tentativas de cultivo, contrariando as expectativas de que os micro-organismos que ocorriam no meio marinho seriam adaptados às altas salinidades típicas desse ambiente, foi entendido que alguns micro-organismos dali requeriam sal em elevadas concentrações para o seu crescimento, destacando, portanto, a existência de micro-organismos estritamente marinhos (Jensen; Dwight; Fenical, 1991). Dentre eles, uma actinobactéria classificada como *Salinispora tropica*, recuperada do sedimento coletado nas Bahamas em expedição realizada por Jensen e Fenical em 1989, produziu um extrato orgânico altamente citotóxico contra células tumorais *in vitro*. A molécula ativa, nomeada como salinosporamida A (13) (Figura 10), uma  $\gamma$ -lactama- $\beta$ -lactona

bicíclica densamente funcionalizada, é um potente inibidor da subunidade catalítica 20S do proteassoma (Feling et al., 2003), uma organela celular responsável pela degradação de proteínas não-funcionais (Adams, 2004). As células tumorais parecem demandar mais da função do proteassoma que as normais, haja vista a sua alta atividade proliferativa e elevadas taxas de síntese de proteína.



**Figura 10.** A) Estrutura da salinosporamida A (**13**) isolada do actinomiceto marinho *Salinispora tropica*. B) Desenho ilustrativo do mecanismo de ação da salinosporamida A em células tumorais.

Após comprovada atividade em tumores xenográficos *in vivo* e maior eficácia nos modelos de mieloma múltiplo, em consonância com os demais inibidores de proteassoma já utilizados clinicamente (Chauhan et al., 2005), foi iniciada a primeira fase dos ensaios clínicos da salinosporamida A em 2006, para tratamento de linfomas e alguns tumores sólidos, menos de três anos após sua descoberta. Em 2007, a salinosporamida A, batizada como marizomibe pela indústria, foi submetida a ensaios clínicos para o tratamento de mieloma múltiplo. Atualmente, encontra-se em fase I de testes para mieloma múltiplo e em fase II para o tratamento de glioma recorrente. Entretanto, o marizomibe recebeu da FDA o certificado de fármaco órfão para esses dois tipos de tumores.

A síntese total da salinosporamida A foi resolvida, pela primeira vez, em 2004 (Reddy; Saravanan; Corey, 2004). Desde então, diversas rotas sintéticas diferentes foram propostas e validadas. Entretanto, a molécula que segue nos ensaios clínicos é totalmente produzida pela própria *S. tropica* a partir de um robusto processo de fermentação salina. As condições de crescimento de uma cepa selvagem da bactéria foram otimizadas visando aumentar a sua produção de salinosporamida A, bem como para contornar os efeitos corrosivos do sal em excesso nos fermentadores industriais, feitos de metal. Nesse cenário, o rendimento de salinosporamida A produzida originalmente em escala laboratorial, de poucos mg para cada litro de cultura de

*S. tropica*, passou a quase 300mg/L após otimização e escalonamento industrial, demonstrando ser o processo com melhor relação custo-benefício, além de adequado, inclusive, para atender a demanda comercial em caso de aprovação (Fenical et al., 2009). Dessa forma, a salinosporamida A é a primeira e, por ora, única molécula em ensaios clínicos obtida por processo de fermentação salina.

## 2 | ABORDAGENS METODOLÓGICAS

Nesta seção, discutiremos os aspectos técnicos relacionados à pesquisa visando à obtenção de produtos naturais marinhos com atividade anticâncer, abordando a coleta do material biológico, técnicas de obtenção e cultivo de micro-organismos marinhos, métodos de extração, isolamento e identificação química de substâncias bioativas, bem como diferentes abordagens para avaliação da atividade biológica. Vale ressaltar que os protocolos aqui descritos não são necessariamente os únicos disponíveis, mas refletem a experiência adquirida pelo nosso grupo de pesquisa ao longo dos últimos 20 anos.

### 2.1 COLETA E PRESERVAÇÃO

A obtenção e o armazenamento apropriados de amostras são fundamentais para o trabalho de bioprospecção. Saber como coletar e conservar as amostras adequadamente otimiza tempo e recursos financeiros e reflete diretamente na qualidade dos resultados. Considerando os diferentes aspectos e variedade de condições locais dos pontos de coleta, erros ou descuidos podem inviabilizar a operação ou pôr em risco a integridade física da equipe. Não obstante, amostras armazenadas inadequadamente, mesmo por tempo reduzido, rendem dados no mínimo questionáveis. Aqui, abordaremos aspectos do planejamento à execução da coleta, bem como armazenamento, transporte e catalogação de amostras, aplicáveis em estudos clássicos de química de produtos naturais marinhos e de cultivo de micro-organismos.

O planejamento é extremamente importante, uma vez que otimiza tempo e recursos e garante maior eficiência na execução do trabalho de campo. Mais além, essa etapa pode ser crucial para o êxito da coleta e obtenção de amostras com a qualidade adequada. Por isso, o empenho no planejamento deve ser proporcional ao nível de complexidade da operação da coleta e seu armazenamento e transporte. A elaboração de um protocolo completo e específico para cada situação de coleta é recomendável. Além dos protocolos de procedimentos, listas de checagem (*checklists*) ajudam na preparação para a coleta, seja a enumeração de todo o material que deve ser providenciado, bem como os procedimentos que devem ser realizados. As perguntas de partida do projeto orientam a seleção do local, tipos de amostras e quantidade ou número de réplicas das amostras.

As características do local estão diretamente relacionadas com a complexidade da logística para a coleta. A preparação para coleta na costa é normalmente mais simples e econômica que aquelas realizadas em expedições a ilhas oceânicas ou de acesso a grandes profundidades. Isso porque, nestas últimas, há maiores restrições de acesso e infraestrutura local

limitada, além do alto custo das expedições. Quanto às condições específicas do local, pequenas profundidades, águas calmas e de boa visibilidade são mais acessíveis e seguras do que profundidades maiores e condições mais rigorosas, como ondas grandes, correnteza e visibilidade limitada. Conhecendo as condições naturais e infraestrutura do local, e com os protocolos de coleta bem definidos, pode-se avaliar a necessidade e quantidade adequadas de equipamentos de mergulho e preparo dos mergulhadores. O georreferenciamento exato de cada ponto de coleta também é fundamental. A anotação das coordenadas geográficas, bem como registro de diversas características dos locais de coleta, contribui para a reprodutibilidade – importante para publicação de artigos –, mas também permite análises mais rigorosas em plataformas de metadados. A depender da disponibilidade da equipe, essas informações podem ser tão simples quanto a presença de sedimento bentônico, tipo de substrato, informações sobre luminosidade/cobertura de nuvens, visibilidade, clorofila, etc.

A natureza e quantidade de amostras coletadas também merecem atenção especial, uma vez que trazem implicações passíveis de limitação ao trabalho. Os pesquisadores que executam a etapa de campo devem ser capazes de reconhecer as espécies de interesse de estudo. Deve-se ter o cuidado de obter antecipadamente o maior número de informações sobre a espécie a ser coletada, como imagens de boa qualidade, seu aspecto em habitat natural, tamanho, forma e variabilidade na coloração. Além disso, deve ser tomada atenção especial quando se tratar de espécies crípticas.

No momento da coleta, deve-se ter cuidado de separar e preservar um espécime-tipo de cada espécie com agente fixador, para confirmação da identificação por especialista. Quando o objetivo do trabalho de prospecção exige, pode ser necessário coletar diversas espécies de organismos por grupo de interesse, como esponjas, moluscos, corais, zoantídeos, ascídias etc. Trabalhos desse tipo aumentam as chances de encontrar espécies novas, como já observado em diversos estudos cujo objetivo principal era a bioprospecção. Muitos grupos de invertebrados, como esponjas, cnidários e moluscos, podem ser fixados diretamente com etanol 70% ou formalina; já algumas espécies de ascídias devem ser anestesiadas antes da fixação, para preservação de características morfológicas favoráveis à identificação. Fazer imagens no local pode auxiliar na identificação em alguns casos, sendo sempre recomendado dispor de equipamento fotográfico adequado e obter imagens dos organismos *in situ*.

A coleta de amostras de sedimento é bem mais simples em pequenas profundidades, porém existem limitações quando o fundo do local é essencialmente rochoso ou de grande profundidade. A coleta de amostras deve ser realizada com autorização do órgão fiscalizador local. No Brasil, o Instituto Chico Mendes (ICMBio) está responsável pela análise das solicitações de coleta, que podem ser realizadas pela plataforma SISBIO, no sítio eletrônico [www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio). A quantidade e natureza das amostras, além do *status* de ameaçado de extinção ou não, são fatores que influenciam o parecer da SISBIO. Uma vez aprovado, o projeto pode ser renovado anualmente, mediante envio de relatório técnico-científico.

A identificação e a conservação das amostras coletadas são etapas que também exigem planejamento cuidadoso. É importante estabelecer e utilizar um sistema de códigos para identificação das amostras que permita o rastreamento rápido de informações básicas como: tipo ou espécie, local, número da réplica (quando houver mais de uma) e data. Além disso, o

preparo de uma planilha com detalhes adicionais para consulta e análises também pode ser útil para melhor interpretação dos dados e planejamento de futuras coletas. A elaboração de relatório técnico da expedição é importante como material complementar de rastreamento de procedimentos, incluindo possíveis alterações do que foi planejado.

A conservação de amostras é fundamental quando o seu processamento imediato no local de coleta ou base próxima for inviável – situação que é frequente nas expedições. A forma apropriada de conservação das amostras depende tanto do tipo de amostra como da finalidade do estudo, havendo, portanto, uma gama de opções. A redução da temperatura, sozinha ou associada a outros procedimentos, é a opção mais indicada de conservação quando se deseja obter metabólitos secundários ou cultivar micro-organismos associados a invertebrados ou encontrados no sedimento.

A magnitude do resfriamento pode variar dependendo do período de armazenamento. A redução da temperatura para 0-4°C pode ser alcançada utilizando gelo em caixas térmicas ou geladeira, sendo suficiente para processar as amostras dentro de algumas horas, ainda no mesmo dia da coleta. Para períodos de armazenamento maiores que 6h, é preferível optar pelo congelamento. Temperaturas de -20°C podem conservar amostras por poucas semanas, sendo preferível armazenar a -80°C por longo períodos. O congelamento em N<sub>2</sub> líquido, se realizado no local de coleta, é o mais eficiente e permite maior tempo de conservação, possivelmente por alguns anos. Porém essa opção traz várias dificuldades logísticas para a expedição e, dependendo do local, duração e quantidade de amostras, pode ser inviável.

Embora haja boa correlação entre temperatura e tempo de conservação, é importante salientar que algumas amostras, sobretudo invertebrados, podem conter substâncias extremamente lábeis. Isso deve ser considerado quando se deseja estudar moléculas presentes nas amostras. O mais indicado é realizar a extração orgânica das amostras frescas ainda no local de coleta e mantê-las imediatamente sob refrigeração. Nesses casos, o armazenamento a -20°C gera bons resultados.

Quando a finalidade exclusiva é o cultivo de bactérias presentes nas amostras, pode-se utilizar conservantes, como cuidado adicional à refrigeração, para aumentar a viabilidade dos micro-organismos, sobretudo de bactérias Gram-negativas. O glicerol 25% em água do mar estéril é o mais utilizado. Porém, por ser tóxico para bactérias em altas concentrações, deve-se ter cautela. O tempo de manipulação para diluir ou eliminar o glicerol após descongelamento é crucial para aumentar as chances de manter viáveis as cepas mais sensíveis.

## **2.2 MÉTODOS PARA PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA CULTIVO DE ACTINOMICETOS**

Os actinomicetos são um grupo de destacada importância na prospecção de produtos naturais marinhos com potencial farmacológico. São produtores da maioria dos antibióticos conhecidos e também profícuos produtores de substâncias citotóxicas (Berdy, 2005). Todavia, mesmo com esse cenário favorável, vale a pena ressaltar que apenas uma fração diminuta da diversidade microbiana presente no sedimento e associados a invertebrados marinhos é cultivável. Portanto, quanto maior o esforço lançado em quantidade de processamentos – não ne-

cessariamente em quantidade amostras – e sobretudo em variedade de protocolos utilizados, – melhores são as chances de recuperação de maior diversidade de cepas. Ainda nesse sentido, também devem ser considerados fatores como condições ambientais peculiares do local de coleta, quando se trata de sedimento, e conhecimento prévio de atividade biológica relacionada à espécie do organismo amostrado.

Há diversos métodos descritos para recuperação, cultivo e isolamento de actinomicetos oriundos, sobretudo, de amostras de sedimentos e invertebrados marinhos. A etapa de processamento tem maior impacto para a recuperação de diversidade de cepas, enquanto as condições de cultivo de culturas isoladas podem influenciar na produção de substâncias com atividade biológica. Fatores passíveis de variação no processamento são relacionados a temperatura, ressecamento, diluição e composição do meio de cultura. O período de observação das placas de processamento também é relevante e as combinações entre esses diferentes fatores geram uma variedade apreciável de protocolos.

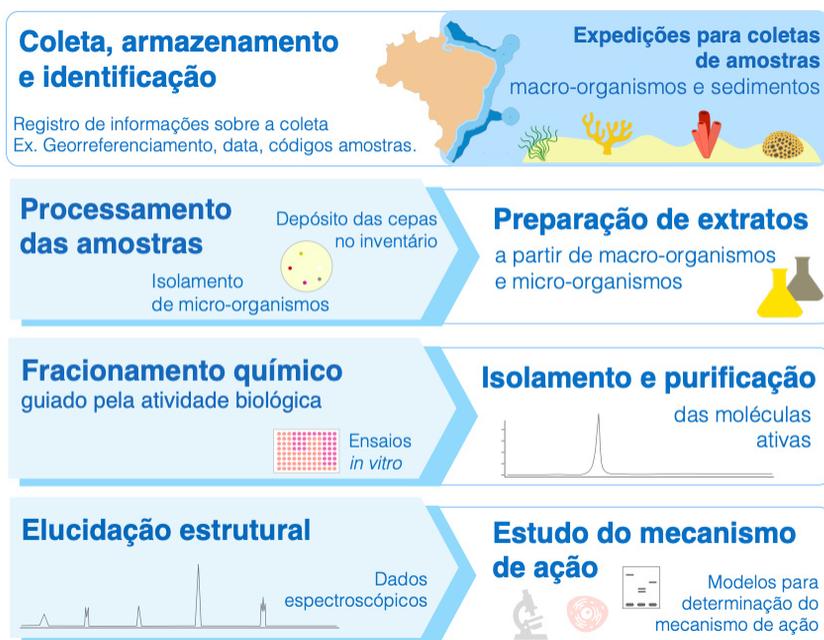
O aquecimento da amostra por alguns minutos antes do plaqueamento é amplamente utilizado para favorecer a recuperação de actinomicetos. A resistência ao aquecimento das actinobactérias é devido à formação de esporos, enquanto as linhagens Gram-negativas são mais susceptíveis a esse tratamento. Como muitas destas crescem bem mais rapidamente, a sua redução ou eliminação é desejável. Outro fator relevante é o tempo em que a placa é mantida. Os actinomicetos crescem lentamente e, além disso, a dormência dos esporos pode levar meses para ser quebrada. Quando possível, deve-se manter as placas por até seis meses, observando-as semanalmente para detectar o aparecimento de novas colônias.

Os meios de cultura para processamento de amostras são normalmente sólidos, através da utilização de ágar, e preparados com água do mar artificial estéril. Além disso, é altamente recomendável utilizar um painel de meios de composição variada. Essa alternativa é particularmente conveniente quando o objetivo é maximizar a diversidade de linhagens de actinomicetos recuperadas. Os meios podem ser pobres em nutrientes, p. ex., contendo apenas água do mar estéril ou suplementado com metais em quantidades mínimas. Além destes, também podem-se utilizar meios ricos em nutrientes com fontes de carbono e nitrogênio variadas. Para invertebrados, ainda é interessante preparar meios específicos, utilizando extrato estéril do próprio animal. Este último proporciona resultados interessantes, sobretudo quando os demais meios não são eficazes para promover crescimento. Já para linhagens de sedimento ou água do mar, podem-se utilizar armadilhas específicas disponíveis comercialmente ou preparadas artesanalmente, que permitam o crescimento ou preservação dos actinomicetos. Elas consistem em um dispositivo com substrato interno, membranas nas extremidades e trama de 0,22µm, permitindo, dessa forma, a passagem de pseudo-hifas de actinomicetos, mas não de bactérias em si. Finalmente, o isolamento pode ser realizado seguindo técnicas convencionais de microbiologia.

### **2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE EXTRATOS E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO**

Uma etapa essencial da biotecnologia marinha trata do preparo de extratos visando ao

isolamento de substâncias do metabolismo secundário. Para isso, existem várias metodologias bem estabelecidas, muito embora algumas etapas sejam comuns a todas elas. Essas etapas são aquelas consideradas essenciais para que o trabalho possa ser reproduzido (Figura 11). Todo e qualquer material usado com a finalidade de obter substâncias puras deve ser inicialmente submetido a extração com um solvente orgânico, o qual, após ser destilado sob pressão reduzida a uma temperatura igual ou inferior a 35°C, resultará no extrato bruto. Após essa etapa, faz-se necessária uma série de fracionamentos cromatográficos guiados pela atividade biológica, particularmente neste capítulo, a atividade anticâncer, até que se chegue à substância de interesse, cuja estrutura será determinada com base em dados espectroscópicos. Após determinação da estrutura da substância isolada, recomenda-se a obtenção de alguns dados físicos importantes, como ponto de fusão e rotação óptica específica. Somente após a estrutura ter sido completamente elucidada, recomenda-se seu envio para ensaios farmacológicos e/ou biológicos.



**Figura 11.** Representação geral das etapas para isolamento de substâncias ativas.

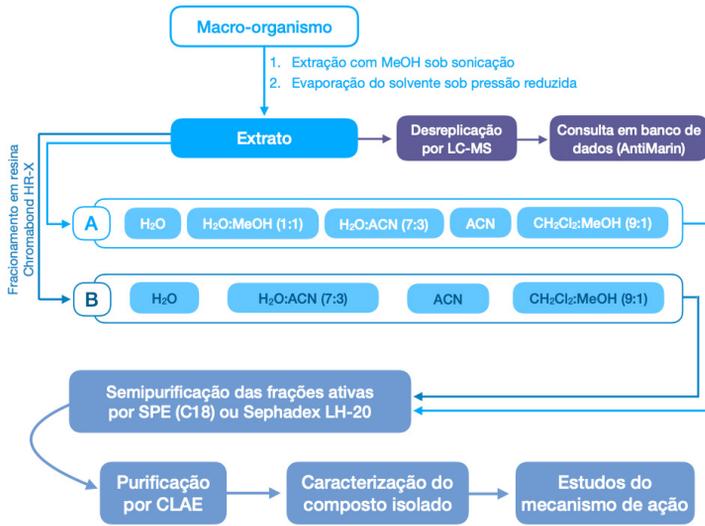
Neste trabalho, abordaremos metodologias atuais, cujos resultados têm se mostrado bastante eficientes. Para melhor entendimento, separamos os estudos de extração e fracionamentos cromatográficos dos macro-organismos (esponjas, moluscos, ascídias, briozoários, corais etc.), daqueles dos micro-organismos associados, detendo-nos nos estudos envolvendo as bactérias marinhas.

Primeiramente, será mostrada a metodologia utilizada para o processamento dos macro-organismos. O material, fresco ou congelado, deverá ser cortado em pequenos pedaços, acondicionado em um recipiente de vidro e imerso em metanol (MeOH) ou etanol (EtOH). Esse material deverá ser submetido a três extrações por cerca de 15min cada, em banho ultrassônico. As soluções MeOH ou EtOH remanescentes deverão ser concentradas a pressão reduzida até a

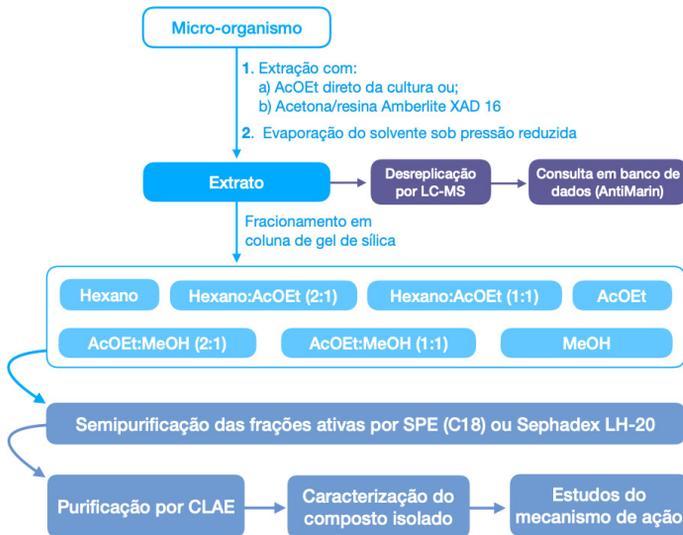
formação do extrato bruto, o qual deverá ser, inicialmente, fracionado por extração em fase sólida (SPE) e um dos sistemas de solventes, A ou B, conforme especificado no fluxograma apresentado na Figura 12. Para isso, indicamos cartucho contendo resina de poliestireno-divinil benzeno (Chromabond® HR-X). Antes do fracionamento, recomenda-se o condicionamento do cartucho. Esse procedimento é fundamental para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente em que a amostra foi dissolvida – lembrando que, para o condicionamento, a ordem dos solventes empregados deve ser inversa à utilizada para a eluição do material com vistas ao isolamento dos metabólitos secundários. Desse modo, se o sistema de solventes escolhido for o A (Figura 12), o primeiro solvente empregado será a mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 e o último solvente será  $\text{H}_2\text{O}$ , assim, coincidindo com o primeiro solvente de eluição da amostra. Observe que em ambos os sistemas de solventes sugeridos (A e B), o solvente inicial utilizado é  $\text{H}_2\text{O}$ , fornecendo uma fração rica em sal e assim, promovendo uma espécie de “limpeza” do extrato ou fração desse material indesejado. Seguindo esse raciocínio, as últimas frações deverão ser constituídas principalmente de substâncias de média a baixa polaridade. Embora uma ou outra fração oriunda desse primeiro fracionamento possa ser purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o comum é que cada fração seja submetida a uma semipurificação prévia, em que a escolha do adsorvente dependerá da natureza da amostra. No caso de amostras de alta a média polaridade, aconselhamos o uso de Sephadex LH-20 ou cartucho SPE (C18), não excluindo, no entanto, o uso dessas matrizes em amostras de baixa polaridade. Finalmente, passamos para a etapa de purificação do composto de interesse, a qual, em geral, é conduzida por CLAE. O conhecimento das propriedades da amostra é fundamental para a escolha do tipo adequado da coluna que deverá ser utilizada, bem como da natureza do sistema de solvente de eluição. Outro ponto relevante a ser considerado é ter conhecimento dos tipos de solventes apropriados para cada tipo de coluna. O uso inadequado de um solvente poderá danificar de forma irreversível uma coluna, quer seja analítica ou semipreparativa. Esse protocolo foi desenvolvido pelo grupo do Prof. Angelo Fontana, do Instituto de Química Biomolecular – CNR, em Pozzuoli, Nápoles, Itália (Cutignano et al., 2015).

O estudo químico dos micro-organismos marinhos começa pela etapa de extração do fermentado biológico, obtido conforme descrito anteriormente, que poderá ser realizada de duas maneiras: a) pela extração usando acetato de etila ( $\text{AcOEt}$ ), ou b) pela extração usando resina de estireno-divinil benzeno (Amberlite® XAD® 16) em acetona. A escolha por uma dessas extrações dependerá do resultado prévio de um teste em pequena escala, em que a produção de maior biomassa ou da atividade será o guia de escolha. Para algumas bactérias, o uso de resina pode implicar fortemente o aumento de biomassa e, como consequência, a produção seletiva de metabólitos secundários (Figura 13). A evaporação do solvente, por qualquer que seja a forma de extração, é realizada a pressão reduzida a uma temperatura inferior ou igual a  $35^\circ\text{C}$ , levando à obtenção dos extratos. Nesse ponto, a desreplicação do extrato por LC-MS, seguida de pesquisa das massas em bancos de dados, é extremamente importante. Com esse procedimento, tem-se uma ideia real da composição química do extrato e, dependendo do resultado e do interesse, o trabalho de fracionamento poderá ser continuado ou descontinuado.

Uma vez isolada a substância, recomenda-se obter, de imediato, todas as informações necessárias para a caracterização inequívoca desta. Para isso, recomenda-se a obtenção de



**Figura 12.** Fluxograma da metodologia usada para o estudo químico de macro-organismos marinhos.



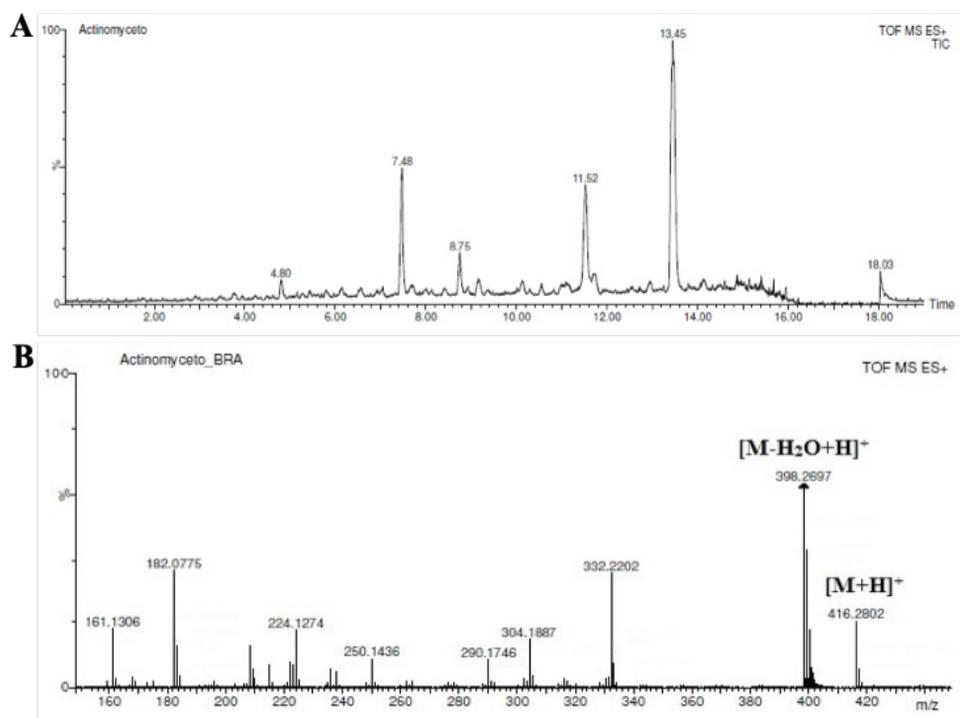
**Figura 13.** Fluxograma da metodologia usada para o estudo químico de micro-organismos marinhos.

espectros como infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e espectrometria de massas (EM). Através da interpretação dos dados fornecidos por essas técnicas, a estrutura do composto poderá ser completamente elucidada, inclusive sua estereoquímica. A determinação do ponto de fusão e rotação óptica também é essencial para o completo estabelecimento de uma estrutura. Feito isso, o composto poderá seguir para os testes farmacológicos. Uma vez que o estudo químico foi guiado pela atividade, existe maior probabilidade de chegar ao princípio ativo.

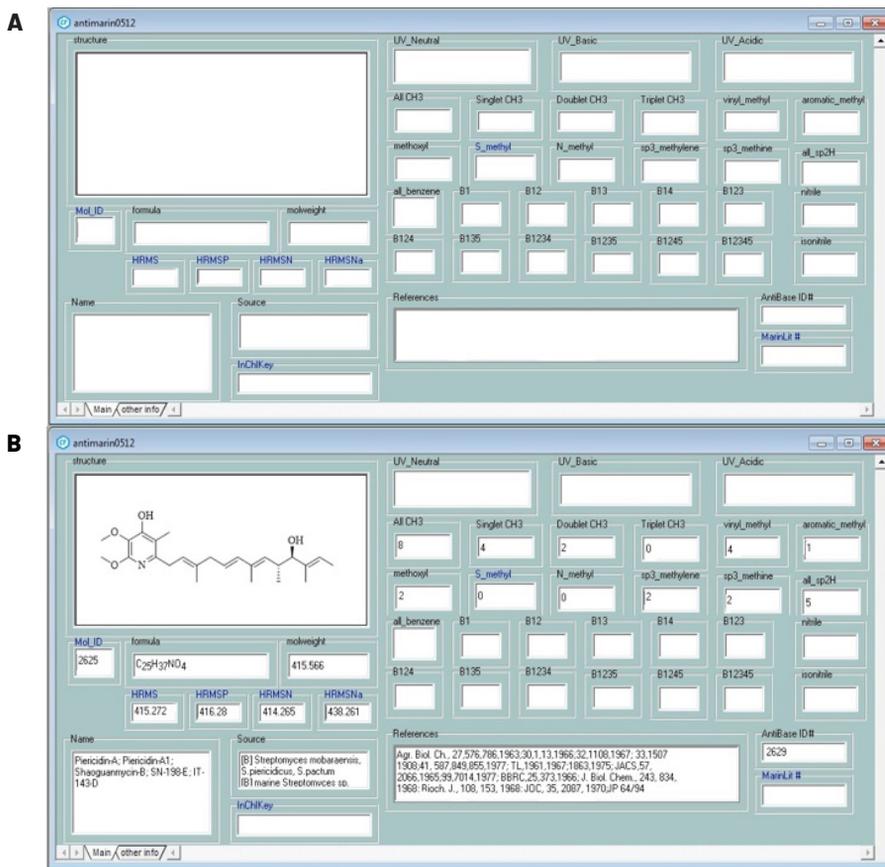
Assim como em outras áreas do conhecimento, o avanço da ciência, impactado pela

tecnologia, tem incrementado fortemente os estudos envolvendo a química de produtos naturais. Para entender a versatilidade de um estudo químico monitorado por LC-MS e acompanhado por pesquisa no banco de dados AntiMarin (Blunt; Munro; Upjohn, 2012), vamos considerar, como exemplo, a prospecção química do extrato ativo obtido de um *Streptomyces* sp. marinho obtido de *Palythoa variabilis* coletado na praia de Paracuru, no Ceará. É importante saber que, para realizar uma pesquisa no banco de dados AntiMarin, faz-se necessário conhecer pelo menos uma destas informações: a massa molar do composto, que pode ser protonada  $[M+H]^+$ , desprotonada  $[M-H]^-$  ou na forma de aduto de sódio  $[M+Na]^+$ . Para melhor direcionamento da pesquisa, informe, caso tenha, dados de RMN  $^1H$  da substância de interesse.

Agora, vamos considerar o exemplo acima mencionado. A análise por LC-MS desse extrato apresentou um cromatograma contendo seis picos (Figura 14A), e, portanto, pelo menos seis substâncias. Aquele com tempo de retenção (tR) 13min45s apresentou em seu espectro de massas o íon molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z$  416,2802 u.m.a (Figura 14B). Essa massa foi então pesquisada no banco de dados AntiMarin, conforme ilustrado na Figura 15A. Na Figura 15B tem-se uma amostra do resultado da busca, em que um dos compostos compatíveis com a massa pesquisada foi a piericidina. Na mesma tela tem-se informação sobre a fonte de isolamento, bem como referências bibliográficas. Essas informações são essenciais para a inequívoca identificação da substância.



**Figura 14.** A) Cromatograma obtido por LC-MS do extrato de um *Streptomyces* sp. B) Espectro de massas do pico com tempo de retenção 13min45s.



**Figura 15.** A) Tela principal do AntiMarin, com destaque para as entradas de massas e de informações de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. B) Tela do AntiMarin após ter sido realizada a entrada dos dados de massas.

No entanto, é importante lembrar que uma mesma massa pode corresponder a mais de uma fórmula molecular e, conseqüentemente, a mais de uma substância. De fato, observe que como resultado foram apresentadas três substâncias com a mesma fórmula molecular,  $C_{25}H_{37}NO_4$  (Figura 16). A natureza química da substância em questão pode ser esclarecida através da fragmentação de massas, conforme Figura 17A, e/ou pelos dados de RMN  $^1H$  (Figura 17B), isso quando a substância tiver sido isolada ou esteja presente majoritariamente na fração analisada. O perfil e o valor das bandas de absorção no ultravioleta, bem como a fonte de onde a substância foi obtida previamente, também podem servir de guias para a sua identificação.

A prospecção química de produtos naturais marinhos exige habilidade, determinação e disciplina, haja vista as quantidades limitadas de material, o excesso de água e sal nas amostras e o longo percurso entre a coleta e a identificação do material até as etapas finais de isolamento e caracterização química das moléculas. Entretanto, é um processo cientificamente desafiador e os resultados podem ser surpreendentes.



## 2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

A escolha do ensaio biológico a ser utilizado é elemento chave no sucesso dos programas de prospecção de substâncias bioativas com potencial biotecnológico, em especial, aquelas com atividade anticâncer. Historicamente, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) foi pioneiro nesse tipo de estudo. Iniciou na década de 50 seu programa de prospecção, utilizando, como modelo para avaliação de novas substâncias, camundongos inoculados com leucemias L1210 e P388. Esse modelo foi bastante questionado, uma vez que não era representativo dos tumores humanos, na sua maioria sólidos (Shoemaker, 2006). Assim, o modelo do NCI-USA foi reconsiderado e, a partir da década de 80, o programa de prospecção passou a basear-se em testes *in vitro* com 60 linhagens tumorais humanas representando tumores de vários tipos, como leucemia, cólon, pulmão, sistema nervoso central, rim, melanoma, ovário, mama e próstata (Shoemaker, 2006). Mais recentemente, devido ao elevado número de amostras, uma etapa chamada de *prescreen*, utilizando apenas três linhagens, foi incorporada no programa, acelerando os testes e minimizando os custos com os ensaios de amostras inativas. Há que se ressaltar que a utilização de linhagens tumorais possibilitou avanços marcantes na pesquisa na área, além de contribuir significativamente para a redução no uso de animais de laboratório.

Tradicionalmente, quanto à atividade anticâncer, a primeira pergunta que é feita é se as substâncias naturais obtidas, sejam oriundas de fontes marinhas ou não, ou mesmo os extratos brutos, têm capacidade de reduzir a proliferação de células tumorais. Para responder experimentalmente a essas questões, ensaios que avaliam a capacidade proliferativa de linhagens de células tumorais expostas às amostras-teste, como o teste do MTT (Mosman, 1983) e sais correlacionados, teste da sulforrodamina B (Skehan et al., 1990), e do Alamar Blue (Ahmed, Gogal; Walsh, 1994), são a base da maioria de programas de prospecção no mundo. Vale destacar que esses tipos de ensaios podem ser automatizados para realização em escalas altíssimas, chamadas de *high-throughput screening* (HTS), permitindo a triagem de grandes quantidades de amostras em pouco tempo. Os ensaios do MTT e Alamar Blue utilizam parâmetros indiretos para estimar a quantidade de células viáveis, sendo que em ambos os casos os corantes são metabolizados principalmente pelas enzimas mitocondriais, e não são isentos de inconsistências nem de ressalvas. Já no ensaio da sulforrodamina B, o corante se liga a aminoácidos básicos e, portanto, o número de células está correlacionado à quantidade de proteínas. O uso de qualquer um desses ensaios permite a obtenção do valor da  $CI_{50}$ , que significa, em termos farmacológicos, a concentração de amostra-teste (p.ex., extrato ou substância pura) capaz de causar 50% do efeito máximo comparado ao grupo controle negativo. Em outros termos, aplicados especificamente às circunstâncias aqui exemplificadas, a  $CI_{50}$  pode ser compreendida como a concentração de amostra necessária para reduzir em 50% a proliferação das células tratadas em comparação às células não-tratadas. O valor de  $CI_{50}$  é calculado a partir da regressão não-linear de uma curva concentração-efeito construída pela exposição das células a diluições seriadas da amostra-teste e o registro do efeito sobre a viabilidade celular de cada concentração ensaiada. A  $CI_{50}$  é, por sua vez, um tipo de “moeda de troca” na farmacologia de produtos naturais, e mune o pesquisador com um parâmetro comparativo da referida amostra

com o restante da literatura da área.

Os testes que avaliam mecanismos de ação são mais acurados e verificam o efeito das substâncias em alvos ou sistemas celulares mais específicos e pontuais – proteínas funcionais ou estruturais, ativação ou transcrição de genes, sistemas enzimáticos, metabolismo celular, entre outros parâmetros (Shoemaker et al., 2002; Swinney, 2013). Em muitos casos, o principal objetivo de um estudo de mecanismo de ação é entender a via e o alvo de ação da molécula experimentada, ou seja, onde essa molécula age, em nível celular, e os processos desencadeados que vulnerabilizam a célula tumoral e, conseqüentemente, induzem-na, enfim, à morte (ou, ainda, ao bloqueio da proliferação). A importância de compreender esses parâmetros, no caso dos fármacos anticâncer, é prever sobre a seletividade do tratamento, os efeitos colaterais e a possibilidade de combinação com fármacos que tenham outros alvos de ação, buscando maior eficácia no esquema terapêutico, ao atacar cada célula tumoral por diversas frentes. Adicionalmente, os tumores não são necessariamente homogêneos, e cada célula pode ser mais ou menos sensível a um determinado medicamento, devido, precisamente, ao seu mecanismo e alvo de ação. Mais além, como bactérias expostas aos antibióticos, as células tumorais também têm capacidade de desenvolver resistência a quimioterápicos, logo, quanto mais amplas forem as estratégias terapêuticas, mais chances haverá de sucesso no tratamento de tumores recidivados.

Assim, a abordagem alvo-direcionada como estratégia de busca de novas substâncias bioativas vem se alargando em anos mais recentes. Nesse caso, ocorre uma inversão da ordem tradicional de prospecção, e parte-se de um alvo celular específico, relevante no contexto da patologia que se deseja tratar, aqui ilustrada pelo câncer, e buscam-se moléculas que modulem esse alvo. Assim, nessa perspectiva, em vez de procurar entender qual o alvo celular modulado por uma determinada molécula com comprovada atividade anticâncer, buscam-se substâncias que modulem um alvo cuja relevância já se saiba nos processos de carcinogênese.

Os ensaios *in vivo* são conduzidos com as substâncias selecionadas nas etapas iniciais de teste para avaliar seu efeito antitumoral em animais de laboratório portadores de tumor. Nesses modelos de tumores murinos, diversos esquemas de tratamento podem ser propostos, inclusive em combinação com outros fármacos, particularmente aqueles utilizados na clínica. Modelos xenográficos são também amplamente empregados, por permitirem o implante de células tumorais humanas em camundongos imunodeprimidos, para que não rejeitem tais células.

Além do efeito antitumoral, os ensaios *in vivo* também se prestam à avaliação de parâmetros de toxicologia e farmacocinética da substância. Esses parâmetros são essenciais para conhecer seus padrões metabólicos e fisiológicos, assim como a dose tolerada e os efeitos adversos. Tais medidas são fundamentais para a translação dos possíveis efeitos em humanos, antes de prosseguir para a etapa dos ensaios clínicos (Wagner-Döbler et al., 2002; Newman; Cragg, 2004). Os ensaios clínicos de um novo medicamento, ou mesmo de um fármaco para uso com uma nova finalidade, constituem-se de quatro fases, sendo que as primeiras três são realizadas em clínicas ou hospitais, devem ter o consentimento livre e esclarecido dos voluntários envolvidos e recrutados especificamente para esse processo, e têm rigoroso controle de todas as etapas e dados coletados. Durante essas fases, que variam em número de voluntários, o objetivo é observar toxicidade, eficácia, dose terapêutica e efeitos colaterais, dos mais aos menos comuns.

Ao constatar-se o sucesso ao final da terceira fase de ensaios clínicos e a aprovação da agência regulatória, a substância ganha, então, *status* de medicamento e pode ser comercializada e utilizada clinicamente. A quarta fase dos ensaios clínicos é cumprida a partir daí, e pode durar até 25 anos. Nesse caso, o objetivo é avaliar os efeitos do medicamento em uma ampla parcela da população e perceber, p. ex., efeitos adversos raros e idiossincráticos.

Não é difícil supor que o desenvolvimento de um novo fármaco anticâncer a partir da biodiversidade seja um processo tão demorado quanto caro. Tomando-se cerca de cinco mil moléculas naturais, estima-se que apenas uma venha a se tornar um fármaco. Esse processo poderá levar em média quinze anos e custar aproximadamente US\$ 1 bilhão (Costa-Lotufo et al., 2009).

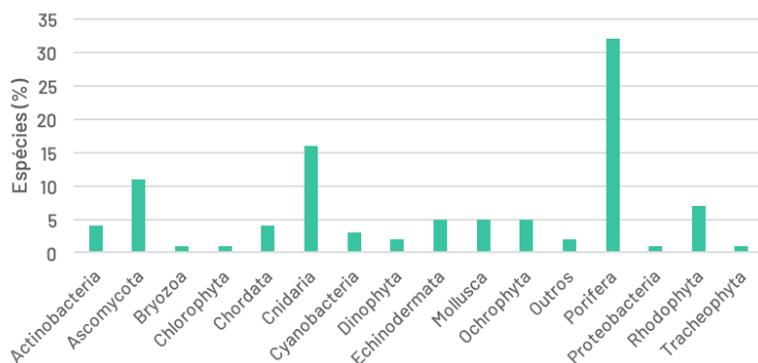
### 3

## APLICAÇÕES DA BIODIVERSIDADE NA BIOTECNOLOGIA MARINHA

O ambiente marinho é o habitat natural de uma abastada variedade de organismos. Embora haja um maior número de espécies documentadas no ambiente terrestre, e um número consideravelmente mais elevado de substâncias bioativas obtidas desses organismos, os oceanos ainda abrigam uma diversidade biológica superior se tomados os níveis taxonômicos mais altos (i.e., a distinção taxonômica). Nesses termos, e sabendo-se que a diversidade genética presta-se não só à diversidade biológica, mas igualmente, à diversidade química, presume-se que haja, portanto, no mar, uma abundância de moléculas estruturalmente diversificadas nesse ambiente (Snelgrove, 2016). De fato, considerando as poucas décadas de estudo e ponderando pela razão entre o número de moléculas bioativas encontradas e as espécies estudadas, o ambiente marinho já supera o ambiente terrestre (Mayer et al., 2010).

No princípio, a busca por moléculas bioativas em organismos marinhos enfocou, principalmente, os grupos de invertebrados, aqueles sésseis, de corpo macio e coloridos. A figura 18 ilustra o esforço de coleta realizado no ambiente marinho ao longo dos anos de 1971 a 2015, distribuído por filos, e mostra, claramente, o domínio dos estudos com esponjas e corais, além de ascídias, moluscos e briozoários, abalizado pela noção de que a vulnerabilidade física desses organismos estaria relacionada à presença de mecanismos químicos de defesa (Faulkner, 2000; Costa-Lotufo et al., 2009). Como apresentado no tópico 1.3, desses organismos foram isoladas as substâncias de que derivaram os fármacos marinhos que hoje estão na clínica para tratamento de câncer e de outras patologias, como também o extenso rol de moléculas que ainda cumprem etapas precedentes de testes clínicos e pré-clínicos (Gerwick; Moore, 2012).

A produção dessas moléculas decorre, para além do determinismo genético, da adaptação dos organismos aos fatores abióticos dos oceanos, como salinidade, temperatura, pH, pressão e luminosidade, bem como da interação entre os organismos em meio aquoso, p. ex., alimentação por filtração e comunicação química. Mais além, há o entendimento de que os invertebrados estão associados a grandes quantidades de micro-organismos, em alguns casos, inclusive, em relação de simbiose obrigatória, sendo estes um recurso igualmente próspero



**Figura 18.** Distribuição do número de espécies estudadas com relação à presença de substâncias químicas bioativas nos diversos grupos taxonômicos. Fonte: Blunt et al., 2017.

dos metabólitos bioativos (Imhoff et al., 2011). Inúmeros fatores influenciam a produção de metabólitos por micro-organismos, desde o estado do meio (sólido ou líquido), tempo de cultivo (“idade da cultura”), composição do meio ou da presença de outra linhagem ou molécula de *quorum sensing* ativadora de vias de produtos naturais.

A hipótese de um micro-organismo simbiote como produtor da trabectedina, isolada da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, descrita anteriormente neste capítulo, foi uma ideia que, gradativamente, ganhou força, visto que, além da cianossafracina B, antibiótico produzido pela proteobactéria *Pseudomonas fluorescens*, utilizado no processo de semissíntese comercial do fármaco Yondelis, outros dois produtos bacterianos – a safracina A, produzida pelo actinomiceto *Streptomyces lavendulae*, e a safracina Mx1, pela mixobactéria *Myxococcus xanthus* – guardam grande semelhança estrutural à molécula encontrada na ascídia. De fato, foi sugerido, através de análise metagenômica da ascídia e seu consórcio microbiano, que a proteobactéria *Candidatus Endoecteinascidia frumentensis* é dotada dos genes compatíveis à biossíntese da trabectedina. Esse micro-organismo, no entanto, também mostrou ter um genoma extremamente reduzido, ao ponto de inviabilizar o seu cultivo independente do hospedeiro, sugerindo ser esta uma relação de simbiose obrigatória (Schofield et al., 2015).

A produção das dolastatinas, por sua vez, isoladas primeiramente do molusco *Dolabella auricularia*, como já mencionado, foi rastreada à cianobactéria do gênero *Symploca* sp. (hoje renomeada como *Caldora penicillata*). Além da semelhança estrutural com a simplostatina 1, sintetizada por micro-organismos desse gênero, mais recentemente foi isolada a própria dolastatina 10 de cianobactérias do gênero *Symploca*, que são, também, parte da dieta do molusco (Luesch et al., 2001).

A previsão bancada por alguns autores é de que, nos próximos quinze anos, os produtos naturais marinhos serão dominados por moléculas de origem microbiana, insinuada pela alavancada, dos últimos quinze anos, de bactérias e fungos nesse cenário. Motivada pelo interesse na diversidade estrutural e propriedade biológicas dessas substâncias, relativa facilidade de coleta de sedimento ou invertebrados para dali recuperar micro-organismos de vida livre ou endossimbiotes, e a expansão das regiões passíveis de exploração, a bioprospecção de micro-organismos mostra-se como um recurso promissor e de baixo impacto ambiental, por não demandar a extração de quantidades significativas de organismos vivos. Mais além, a versatilidade biotecnológica permitida por organismos unicelulares considerando o cultivo,

sequenciamento e montagem dos genomas, bem como a simplicidade de manipulação em vetores heterólogos, tornam sustentáveis esses sistemas de produção de fármacos (Blunt et al., 2017).

## 4 | CONCLUSÕES

### 4.1 PERSPECTIVAS

A incorporação dos estudos de perfis “ômicos” na prospecção de produtos naturais com aplicações biotecnológicas ampliou significativamente a possibilidade de descoberta de novas moléculas bioativas. A metagenômica permite a mineração de vias de biossíntese e o estudo das complexas interações entre invertebrados e seus micro-organismos simbiotes. Essa ferramenta possibilita a prospecção de comunidades microbianas através da análise do genoma de todos os micro-organismos ali congregados (metagenoma), sem a necessidade de cultivo *in vitro*, viabilizando a mineração de genes associados à produção de metabólitos secundários e a predição, por colinearidade, do produto derivado daquele grupo de genes. A metabolômica, por sua vez, define uma estratégia de análise do conjunto de metabólitos presentes em um organismo no momento da análise. A combinação da coleta de dados do perfil metabólico associado à alimentação de redes neurais como, por exemplo, o sistema de compartilhamento e curadoria de dados de espectrometria de produtos naturais GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Network*; <https://gnps.ucsd.edu>), que permite a organização das possíveis estruturas químicas em agrupamentos (*clusters*) definidos por perfil de fragmentação, é uma importante estratégia de estudos (Wang et al., 2016). Logo, qualquer alteração induzida geneticamente, epigeneticamente, ou por influência do ambiente é manifestada, em última instância, através de alterações na concentração de metabólitos. Dessa forma, a análise do metaboloma pode fornecer uma ligação direta entre o genoma, o transcriptoma e o proteoma, e revelar quais os fatores que influenciam diretamente uma dada função biológica. O uso da metagenômica e da metabolômica, somado aos chamados métodos tradicionais, assim como o uso de ensaios fenotípicos, trazem avanços significativos na pesquisa em produtos naturais visando ao desenvolvimento de fármacos.

### 4.2 OPORTUNIDADES E DESAFIOS

A biotecnologia ampliou a empregabilidade dos recursos biológicos do planeta para muito além da alimentação, e a bioprospecção, compreendida como a busca de produtos funcionais a partir de recursos vivos, é sabidamente uma estratégia de agregar valor à biodiversidade. É claro que o valor absoluto da biodiversidade é incondicional e infinito. Entretanto, a valoração econômica dos recursos marinhos é focada, comumente, na pesca e no turismo, em ecossistemas costeiros (Brander et al., 2007), ou na regulação climática e ciclagem de nutrientes, no mar aberto (De Groot et al., 2002). Contudo, é importante expandir esses bem conhecidos

serviços ecossistêmicos, para incluir, ainda, o provimento de fármacos e outros bioprodutos obtidos de organismos marinhos (Erwin et al., 2010).

Os desafios, nessa vereda, têm sido vincular o valor econômico da biodiversidade à necessidade de conservação dos ecossistemas, bem como assegurar os benefícios econômicos à região provedora do recurso natural, como promulgado pela Convenção da Diversidade Biológica e detalhado no Protocolo de Nagoya. Essas questões, entretanto, podem ser agravadas em países tropicais em desenvolvimento que, via de regra, abrigam uma ampla fração da diversidade biológica mundial, mas são mal atendidos nos quesitos regulamentação, fiscalização, desenvolvimento tecnológico e apoio financeiro à pesquisa.

No Brasil, ainda que incipiente frente à dimensão e diversidade biológica incluída nos variados ecossistemas da costa e das ilhas, a bioprospecção de organismos marinhos com propriedades biomédicas encontra-se em franca expansão. Nesta última década, podem ser constatados resultados concretos desse alargamento, como aumento da produção científica, estruturação de redes de pesquisa, formação de recursos humanos e depósitos de patentes. Todavia, essas iniciativas são essencialmente de cunho acadêmico e, tal como acontece com a prospecção farmacológica de plantas medicinais, consideravelmente mais disseminada no país, há dissintonia com os setores da indústria e governo, resultando, pois, no subaproveitamento do recurso biológico. Cabe enfatizar, ainda, que o Brasil tem uma das leis mais restritivas de acesso ao patrimônio genético – o que vai de encontro a uma das principais diretrizes da Convenção da Diversidade Biológica –, e talvez seja este o maior entrave ao desenvolvimento de produtos e serviços a partir da nossa biodiversidade. Tais limitações dificultam o amplo estudo, e o desconhecimento da biodiversidade subtrai do país uma fonte de riquezas. Nesse sentido, o Brasil é destacado por sua megadiversidade, título respaldado pela larga fatia da diversidade biológica hospedada entre os seus limites territoriais, onde abriga um generoso, mas subprodutivo, potencial biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

- Adams, J. (2004) **Proteasome inhibitors in cancer therapy**. Totowa, NJ: Humana Press.
- Ahmed, S.A.; Gogal, R.M.Jr.; Walsh J.E. (1994) A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**.170:211-224.
- Aicher, T.D.; Buszek, K.R; Fang, F.G.; Forsyth, C.J.; Jung, S.H.; Kishi, Y.; Matelich, M.C.; Scola, P.M.; Spero, D.M.; Yoon, S.K. (1992) Total synthesis of halichondrin B and norhalichondrin B. **J. Am. Chem. Soc.** 114: 3162-3164.
- Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. **J. Antibiot.** 58: 1-26.
- Bergmann, W.; Stansbury, H.A. (1944) Contributions to the study of marine products. XV. The sterols of starfish. II. **J. Org. Chem.** 09: 281-289.
- Bergmann, W.; Burke, D.C. (1955) Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. **J. Org. Chem.** 20: 1501-1507.

Bergmann, W.; Burke, D.C. (1956) Contributions to the study of marine products. XL. The nucleosides of sponges. **J. Org. Chem.** 21: 226-228.

Bergmann, W.; Feeney, R.J. (1951) Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. **J. Org. Chem.** 16: 981-987.

Bergmann, W.; Stempien Jr, M.F. (1957) Contributions to the study of marine products. XLIII. The nucleosides of sponges. V. The synthesis of spongosine. **J. Org. Chem.** 22: 1575-1577.

Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.G.; Prinsep, M.R. (2017) Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** 34: 235-294.

Blunt, J.; Munro, M.; Upjohn, M. (2012) The role of databases in marine natural products research. In: Fattorusso, E.; Gerwick, W.H.; Tagliapietra, O. (eds.), **Handbook of Marine Natural Products**, Springer Science+Business Media B.V.

Bonfanti, M.; La Valle, E.; Sousa-Faro, J.M.F.; Faircloth, G.; Caretti, G.; Mantovani, R.; D'Incalci, M. (1999) Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and DNA. **Anti-Cancer Drug Des.** 14: 179-186.

Brander, L.M.; Van Beukering, P.; Cesar, H.S.J. (2007) The recreational value of coral reefs: a meta-analysis. **Ecological Economics.** 63: 209-218.

Chauhan, D.; Catley, L.; Li, G.; Podar, K.; Hideshima, T.; Velankar, M.; Mitsiades, C.; Mitsiades, N.; Yasui, H.; Letai, A.; O'vaa, H.; Berkers, C.; Nicholson, B.; Chao, T.-H.; Neuteboom, S.T.C.; Richardson, P.; Palladino, M.; Anderson, K.C. (2005) A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. **Cancer Cell.** 8: 407-419.

Clardy, J.; Walsh, C. (2004) Lessons from natural molecules. **Nature.** 432: 829-837.

Corey, E.J.; Gin, D.Y.; Kania, R.S. (1996) Enantioselective total synthesis of ecteinascidin 743. **J. Am. Chem. Soc.** 118: 9202-9203.

Costa-Lotufo, L.V.; Wilke, D.V.; Jimenez, P.C.; Epifanio, R.A. (2009) Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Quim. Nova.** 32: 703-716.

Cragg, G.M.; Newman, D.J.; Snader, K.M. (1997) Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.** 60: 52-60.

Cragg, G.M.; Newman, D.J. (2005) Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure Appl. Chem.** 77: 7-24.

Cuevas, C.; Francesch, A. (2009) Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. **Nat. Prod. Rep.** 26: 322-337.

Cuevas, C.; Perez, M.; Francesch, A.; Fernandez, C.; Chicharro, J.L.; Gallego, P.; Zarzuelo, M.; De la Calle, F.; Manzanares, I. (2000) **Preparation of ecteinascidin analogs as antitumor agents.** Assignee: Pharma Mar, S.A., Spain; Ruffles, Graham Keith. Patent Information: Nov 23, WO 2000069862A2.

Cutignano, A.; Nuzzo, G.; Ianora, A.; Luongo, E.; Romano, G.; Gallo, C.; Sansone, C.; Aprea, S.; Mancini, F.; D'Oro, U.; Fontana, A. (2015) Development and application of a novel SPE-method for bioassay-guided fractionation of marine extracts. **Mar. Drugs.** 13: 5736-5749.

De Groot, R.S.; Wilson, M.A.; Boumans, R.M.J. (2002) A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. **Ecological Economics.** 41: 393-408.

Doronina, S.O.; Toki, B.E.; Torgov, M.Y.; Mendelsohn, B.A.; Cerveny, C.G.; Chace, D.F.; DeBlanc, R.L.; Gearing, R.P.; Bovee, T.D.; Siegall, C.B.; et al. (2003) Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. **Nat. Biotechnol.** 21, 778-784.

D'Incalci, M.; Badri, N.; Galmarini, C.M.; Allavena, P. (2014) Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. **Br. J. Cancer.** 111: 646-650.

Erba, E.; Bergamaschi, D.; Bassano, L.; Damia, G.; Ronzoni, S.; Faircloth, G.T.; D'Incalci, M. (2001) Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound with a unique mechanism of action. **Eur. J. Chem.** 37: 97-105, 2001.

Erwin, P.M.; López-Legentil, S.; Schuhmann, P.W. (2010) The pharmaceutical value of marine biodiversity for anti-cancer drug discovery. **Ecological Economics.** 70: 445-451.

Farnsworth, N.R. (1985) Medicinal plants in therapy. **Bull WHO.** 63: 965-981.

Faulkner, D.J. (2000) Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** 17: 7-55.

Feher, M.; Schmidt, J.M. (2003) Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.** 43: 218-227.

Feling, R.H.; Buchanan, G.O.; Mincer, T.J.; Kauffman, C.A.; Jensen, P.R.; Fenical, W. (2003) Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. **Angew. Chem. Int. Ed.** 42: 355-357.

Fenical, W. (1997) New pharmaceuticals from marine organism. **Trends Biothechnol.** 15: 339-341.

Fenical, W.; Jensen, P.R.; Palladino, M.A.; Lam, K.S.; Lloyd, G.K.; Potts, B.C. (2009) Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). **Bioorg. Med. Chem.** 17: 2175-2180.

Feuerhahn, S.; Giraudon, C.; Martinez-Diez, M.; Bueren-Calabuig, J.A.; Galmarini, C.M.; Gago, F.; Egly, J.M. (2011) XPF-dependent DNA breaks and RNA polymerase II arrest induced by antitumor DNA interstrand crosslinking-mimetic alkaloids. **Chem. Biol.** 18: 988-999.

Fischl, M.A.; Richman, D.D.; Grieco, M.H.; Gottlieb, M.S.; Volberding, P.A.; Laskin, O.L.; Leedom, J.M.; Groopman, J.E.; Mildvan, D. (1987) The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. **New Engl. J. Med.** 317: 185-191.

Garcia-Rocha, M.; Bonay, P.; Avilam J. (1996) The antitumoral compound Kahalalide F acts on cell lysosomes. **Cancer Lett.** 99: 43-50.

Gerwick, W.H.; Moore, B.S. (2012) Lessons from the past and charting the future of marine natural products, drug discovery and chemical biology. **Chem. Biol. Rev.** 19: 85-98.

Grabowski, K.; Schneider, G. (2007) Properties and architecture of drugs and natural products revisited. **Curr. Chem. Biol.** 1: 115-127.

Harvey, A.L. (2008) Natural products in drug discovery. **Drug Discov. Today.** 13: 894-901.

Hirata, Y.; Uemura, D. (1986) Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. **Pure Appl. Chem.** 58: 701-710.

Imhoff, J.F.; Labes, A.; Wiese, J. (2011) Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. **Biotech. Adv.** 29: 468-482.

Jensen, P.R.; Dwight, R.; Fenical, W. (1991) Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1102-1108.

Jin, S.; Gorfajn, B.; Faircloth, G.; Scotto, K.W. (2000) Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97: 6775-6779.

Jordan, M.A.; Kamath, K.; Manna, T.; Okouneva, T.; Miller, H.P.; Davis, C.; Littlefield, B.A.; Wilson, L. (2005) The primary antimetabolic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. **Mol. Cancer Ther.** 4: 1086-1095.

Kanzaki, A.; Takebayashi, Y.; Ren, X.Q.; Miyashita, H.; Mori, S.; Akiyama, S.; Pommier, Y. (2002) Overco-

- ming multidrug drug resistance in P-glycoprotein/MDR1-overexpressing cell lines by ecteinascidin 743. **Mol. Cancer Ther.** 1: 1327-1334.
- Katzung, B.G.; Trevor, A.J. **Basic & Clinical Pharmacology**. 13. ed. New York, McGraw-Hill Medical, 2014. 1216pp.
- König, G.M.; Wright, A.D. (1997) *Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. **J. Nat. Prod.** 60: 967-970.
- Lester, D.; Bergmann, W. (1941) Contributions to the study of marine products. VI. The occurrence of cetyl palmitate in corals. **J. Org. Chem.** 6: 120-122.
- Li, W.R.; Joullie, M.M. (1992) The didemnins: biological properties, chemistry and total synthesis. In: Atta-ur-Rahman (Ed.) **Studies in natural products chemistry**, Vol. 10. Elsevier Science Publishers B.V. 241-302.
- Losada, A.; Muñoz-Alonso, M.J.; García, C.; Sánchez-Murcia, P.A.; Martínez-Leal, J.F.; Domínguez, J.M.; Lillo, M.P.; Gago, F.; Galmarini, C.M. (2016) Translation elongation factor eEF1A2 is a novel anticancer target for the marine natural product plitidepsin. **Sci. Rep.** 6: 35100.
- Luesch, H.; Moore, R.E.; Paul, V.J.; Mooberry, S.L.; Corbett, T.H. (2001) Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symprostatin 1. **J. Nat. Prod.** 64: 907-910.
- Mayer, A.M.S.; Glaser, K.B.; Cuevas, C.; Jacobs, R.S.; Kem, W.; Little, R.D.; McIntosh, J.M.; Newman, D.J.; Potts, B.C.; Shuster, D.E. (2010) The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends Pharmacol. Sci.** 31: 255-265.
- Minuzzo, M.; Marchini, S.; Brogгинi, M.; Faircloth, G.; D'Incalci, M.; Mantovani, R. (2000) Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97: 6780-6784.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Met.** 65: 55-63.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2006) Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. **Curr. Drug Targets.** 7: 279-304.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2016) Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current "state of play". **Planta Med.** 82: 775-789.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2017) Current status of marine-derived compounds as warheads in anti-tumor drug candidates. **Mar. Drugs.** 15: 99-118.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.** 79: 629-661.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2004) Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **J. Nat. Prod.** 64: 1216-1238.
- Perez, E.A.; Hillman, D.W.; Fishkin, P.A.; Krook, J.E.; Tan, W.W.; Kuriakose, P.A.; Alberts, S.R.; Dakhil, S.R. (2005) Phase II trial of dolastatin-10 in patients with advanced breast cancer. **Investig. New Drugs.** 23: 257-261.
- Pettit, G.R. (1997) The dolastatins. In: Herz, W.; Kirby, G.W.; Moore, R.E.; Steglich, W.; Tamm, C.; Eds. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*; **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Springer: Vienna, Austria. 70: 1-79.
- Pettit, G.R.; Kamano, Y.; Herald, C.L.; Tuinman, A.A.; Boettner, F.E.; Kizu, H.; Schmidt, J.M.; Baczynskyj,

L.; Tomer, K.B.; Bontems, R.J. (1987) The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: Dolastatin 10. **J. Am. Chem. Soc.** 109: 6883-6885.

Pommier, Y.; Kohlhagen, G.; Bailly, C.; Waring, M.; Mazumder, A.; Kohn, K.W. (1996) DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Biochemistry**. 35: 13303-13309.

Reddy, L.R.; Saravanan, P.; Corey, E.J.J. (2004) A simple stereocontrolled synthesis of salinosporamide **A. J. Am. Chem. Soc.** 126: 6230-6231.

Rinehart, K.L.; Gloer, J.B.; Hughes, R.G.; Renis, H.E.; McGouren, J.P.; Swynenberg, E.B.; Stringfellow, D.A.; Kwentzel, S.L.; Li, L.H. (1981) Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. **Science**. 212: 933-935.

Rinehart, K.L.; Holt, T.G.; Fregeau, N.L.; Stroh, J.G.; Kiefer, P.A.; Sun, F.; Li, L.H.; Martin, D.G. (1990) Ecteinascidins 729, 743, 745, 759 A, 759B and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **J. Org. Chem.** 55: 4512-4515.

Rinehart, K.L. (2000) Antitumor compounds from tunicates. **Med. Res. Rev.** 20: 1-27.

Rinehart, K.L.; Kishore, V.; Bible, K.C.; Sakai, R.; Sullins, D.W.; Li, K.M. (1988) Didemnins and tunicholorin: novel natural products from the marine tunicate *Trididemnum solidum*. **J. Nat. Prod.** 51: 1-21.

Sakai, R.; Rinehart, K.L.; Kishore, V.; Kundu, B.; Faircloth, G.; Gloer, J.B.; Carney, J.R.; Namikoshi, M.; Sun, F.; Hughes, R.G.; Gravalos, D.G.; Quesada, T.G.; Wilson, G.R.; Heid, R.M. (1996) Structure-activity relationships of the didemnins. **J. Med. Chem.** 39: 2819-2934.

Schofield, M.M.; Jain, S.; Porat, D.; Dick, G.J.; Sherman, D.H. (2015) Identification and analysis of the bacterial endosymbiont specialized for production of the chemotherapeutic natural product ET-743. **Environ. Microbiol.** 17: 3964-3975.

Schwartzmann, G.; Rocha, A.B.; Berlinck, R.G.S.; Jimeno, J. (2001) Marine organisms as a source of new anticancer agents. **Lancet Oncol.** 2: 221-225.

Senter, P.D.; Sievers, E.L. (2012) The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed *Hodgkin lymphoma* and systemic anaplastic large cell lymphoma. **Nat. Biotechnol.** 30: 631-637.

Sigel, M.M.; Wellham, L.L.; Lichter, W.; Dudeck, L.E.; Gargus, J.L.; Lucas, L.H. (1970) Anti-cellular and antitumor activity of extracts from tropical marine invertebrates. In: Youngken HW jr. (Ed.) **Food-drugs from the sea: proceedings 1969**. Washington, D. C.: Marine Technology Society, 281-294.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.** 82: 1107-1112.

Snelgrove, P. (2016) An ocean of discovery: biodiversity beyond the Census of Marine Life. **Planta Med.** 82: 790-799.

Shoemaker, R.H. (2006) The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nat. Rev. Cancer** 6: 813-823.

Shoemaker, R.H.; Scudiero, D.A.; Melillo, G.; Currens, M.J.; Monks, A.P.; Rabow, A.A.; Covell, D.G.; Sausville, E.A. (2002) Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery. **Curr. Top. Med. Chem.** 2: 229-246.

Swinney, D.C. (2013) Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. **Clin. Pharmacol. Ther.** 93: 299-301.

Spainhour, C.B. (2005) Natural products. In: Gad, S.C. **Drug discovery handbook**. Wiley-Interscience,

Hoboken. 11-72.

Storz, U. (2015) Antibody-drug conjugates: Intellectual property considerations. **mAbs**. 7: 989-1009.

Vaishampayan, U.; Glode, M.; Du, W.; Kraft, A.; Hudes, G.; Wright, J.; Hussain, M. (2000) Phase II study of dolastatin-10 in patients with hormone-refractory metastatic prostate adenocarcinoma. **Clin. Cancer Res**. 6: 4205-4208.

Vera, M.D.; Joullié, M.M. (2002) Natural products probes of cell biology: 20 years of Didemnin research. **Med. Res. Rev.** 22: 102-145.

Wagner-Döbler, I.; Beil, W.; Lang, S.; Meiners, M.; Laatsch, H. (2002) Integrated approach to explore the potential of marine micro-organisms for the production of bioactive metabolites. **Adv. Biochem. Engineer./Biotechnol.** 74: 207-238.

Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kapono, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A.V.; Meehan, M.J.; Liu, W.T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P.D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R.D.; Pace, L.A.; Quinn, R.A.; Duncan, K.R.; Hsu, C.C.; Floros, D.J.; Gavilan, R.G.; Kleigrew, K.; Northen, T.; Dutton, R.J.; Parrot, D.; Carlson, E.E.; Aigle, B.; Michelsen, C.F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B.T.; Gerwick, L.; Liaw, C.C.; Yang, Y.L.; Humpf, H.U.; Maansson, M.; Keyzers, R.A.; Sims, A.C.; Johnson, A.R.; Sidebottom, A.M.; Sedio, B.E.; Klitgaard, A.; Larson, C.B.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D.J.; Silva, D.B.; Marques, L.M.; Demarque, D.P.; Pociute, E.; O'Neill, E.C.; Briand, E.; Helfrich, E.J.N.; Granatosky, E.A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J.J.; Zeng, Y.; Vorholt, J.A.; Kurita, K.L.; Charusanti, P.; McPhail, K.L.; Nielsen, K.F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M.F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O.B.; Baric, R.; Silva R.R.; Mascuch, S.J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P.G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A.M.C.; Lamsa A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B.M.; Almaliti, J.; Allard, P.M.; Phapale, P.; Nothias, L.F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.L.; Kyle, J.E.; Metz, T.O.; Peryea, T.; Nguyen, D.T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K.M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P.R.; Palsson, B.O.; Pogliano, K.; Lington, R.G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N.P.; Gerwick W.H.; Moore, B.S.; Dorrestein, P.C.; Bandeira, N. (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nat. Biotechnol.** 34: 828-837.

Yu, M.J.; Kishi, Y.; Littlefield, B.A. (2005) Discovery of E7389, a fully synthetic macrocyclic ketone analog of halichondrin B. In: Cragg, G.M.; Kingston, D.G.I.; Newman, D.J. (Eds.) **Anticancer agents from natural products**. Boca Raton, FL: Taylor and Francis; 241-265.

Yu, M.J.; Zheng, W.; Seletsky, B.M. (2013) From micrograms to grams: scale-up synthesis of eribulin mesylate. **Nat. Prod. Rep.** 30: 1158-1164.

Zewail-Foote, M.; Hurley, L.H.J. (1999) Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. **Med. Chem.** 42: 2493-2497.

Zewail-Foote, M.; Li, V.S.; Kohn, H.; Bears, D.; Guzman, M.; Hurley, L.H. (2001) The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743-DNA adducts by the UVr ABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent. **Chem. Biol.** 8: 1033-1049.



# FÁRMACOS CONTRA DOENÇAS TROPICAIS E PARASITOS

Cláudia S. de Oliveira<sup>a</sup>

Tainara M. R. da Silva<sup>a,b</sup>

Cleópatra A. da S. Caldeira<sup>a,c</sup>

Rafaela Diniz-Sousa<sup>a,c</sup>

Juliana P. Zulian<sup>a,c,d</sup>

Carolina B. G. Teles<sup>a,c,d,e</sup>

Andreimar M. Soares<sup>a,b,c,d,e</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Rondônia

<sup>b</sup> Centro Universitário São Lucas

<sup>c</sup> Fundação Oswaldo Cruz

<sup>d</sup> Rede BIONORTE

<sup>e</sup> INCT-EpiAmO

## RESUMO

As doenças tropicais afligem cerca de um bilhão de pessoas, principalmente as populações mais vulneráveis social e economicamente, e que se encontram nas áreas tropicais do Planeta. O acesso e aumento da circulação de pessoas nessas regiões tropicais predispõe a facilitação das infecções por doenças tropicais nos demais países, tornando-se um problema mundial. Com isso, existe a necessidade contínua de novos tratamentos e desenvolvimento de fármacos capazes de burlar a resistência antiparasitária e financeiramente acessíveis, de modo que possam ter impacto em regiões endêmicas. Nesse contexto, várias pesquisas têm demonstrado que produtos naturais marinhos possuem atividade antiprotozoária, tornando-os interessantes fontes de biomoléculas que podem contribuir para bioprospecção de novos fármacos aplicados no tratamento de doenças tropicais negligenciadas.

# 1 DOENÇAS TROPICAIS

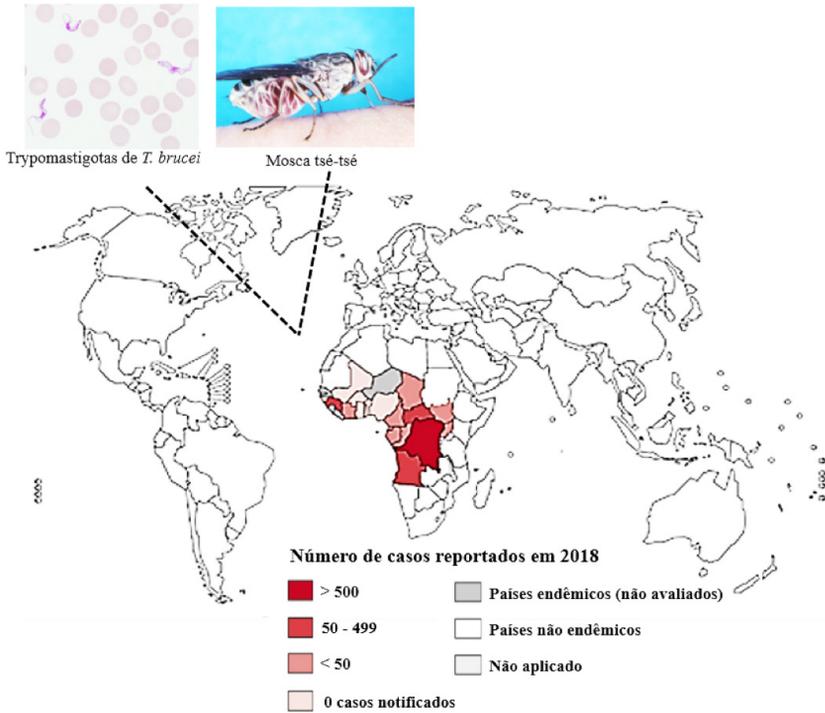
A designação “doenças tropicais” está incluída no vocabulário médico desde o século XIX, a partir da criação das sociedades médicas como a Sociedade Americana de Medicina Tropical e a Sociedade Real de Medicina Tropical e Higiene, que tinham por finalidade discutir e elucidar os mecanismos de transmissão de patologias que surgiram mais severamente nos trópicos com a expansão da colonização da Inglaterra, França e Estados Unidos. Aos poucos os agentes infecciosos foram reconhecidos, explorados e descritos, sendo relacionados à biogeografia dos trópicos, como doenças tropicais. Estas incluíam um conjunto de doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, protozoários e helmintos, que afligiam aproximadamente um bilhão de pessoas, especialmente nas regiões mais quentes do planeta (áreas tropicais) em comparação com os demais países do mundo.

Na primeira metade do século XX, a relação das doenças tropicais e a biogeografia começou a ser contestada. A predominância e concentração nos países tropicais poderia ter outras razões, como o subdesenvolvimento e os decorrentes problemas sociais, oriundos da miséria das populações locais. Vários fatores relacionados à pobreza podem estar associados à propagação dessas patologias: o acesso limitado à água potável, o inadequado descarte de resíduos orgânicos e não-orgânicos, a debilidade dos serviços de saneamento, a precária infraestrutura de serviços públicos, com subsequente urbanização desordenada, bem como o rápido crescimento demográfico sem apoio educacional e de campanhas de saúde pública. O conjunto desses fatores dificulta o controle de vetores, muitas vezes responsáveis pela transmissão de doenças, além de poder intensificar o contato direto com o agente etiológico, favorecendo a recorrência das endemias.

## 1.1 TRYPANOSSMA E OUTROS PARASITOS

Quando se observa o cenário das doenças de origem tropical, algumas são estreitamente relacionadas à biogeografia, como a doença do sono ou tripanossomíase africana, transmitida por moscas hematófagas do gênero *Glossina* (conhecidas como tsé-tsé). A doença afeta o sistema nervoso no homem, provocando distúrbios neurológicos graves. É causada pela infecção dos protozoários *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense*, sendo limitada ao continente africano (Figura 1). No rol de doenças restritas aos trópicos, importadas da África e com focos no Oriente Médio e na América do Sul, tem-se a oncocercose (doença que provoca tumores dérmicos e cegueira), transmitida por moscas do gênero *Simulium* e causada pelo nematódeo *Onchocerca volvulus*; as filariose linfáticas, transmitidas ao homem principalmente por mosquitos *Culex quiquefasciatus* infectados por vermes nematoides *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*, cujas larvas se alojam nos vasos linfáticos, causando linfedema ou elefantíase; e as esquistossomoses, veiculadas por caramujos infectados por trematódeos do gênero *Schistosoma*, capazes de contaminar rios e lagos com a forma de cercárias dos parasitos, que podem

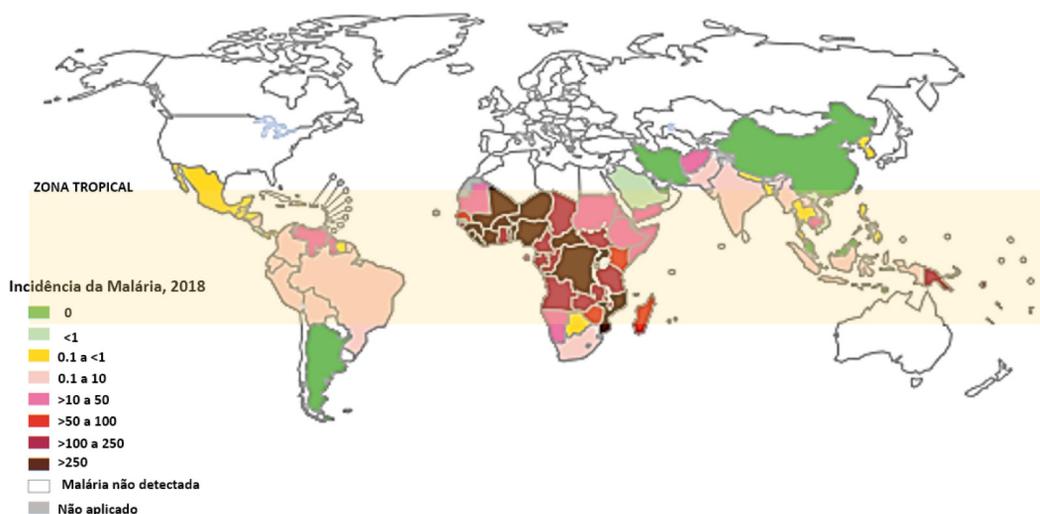
penetrar ativamente na pele e nas mucosas de pessoas que entram em contato com o ambiente aquático. Essa doença pode causar problemas crônicos hepáticos, intestinais e gênito-urinários. A partir de urina e fezes humanas contaminadas, ocorre a disseminação dos ovos de *Schistosoma* que eclodem e invadem os tecidos de caracóis. A geografia tropical pode produzir ambientes aprazíveis e com ótimas condições para a proliferação dos agentes etiológicos e/ou vetores capazes de transmitir doenças, o que explica a variedade de patologias encontradas nessas regiões.



**Figura 1.** Distribuição Tripanossomíase Africana em 2018 (Fonte: adaptado WHO, 2020; CDC, 2020).

Apesar da influência dos fatores ambientais e biológicos no desencadeamento das doenças tropicais, observa-se na distribuição mundial contemporânea que muitas delas são universais. Mesmo apresentando maior incidência em países tropicais, suas distribuições não estão condicionadas a particularidades climáticas. A malária, enfermidade causada por parasitos do gênero *Plasmodium* e transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos *Anopheles*, ilustra bem esse quadro. Embora seja considerada prevalente na região tropical, casos residuais de malária foram notificados no Afeganistão, no norte da Índia e no sul da China (Figura 2). Nesse contexto, também se incluem a leishmaniose visceral ou calazar e a leishmaniose tegumentar, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por flebotomíneos com ocorrência nos países tropicais e mediterrâneos. Na China, em 1950, essa doença foi controlada com o uso de inseticidas, eliminação de cães contaminados e tratamento em massa de pacientes infectados.

Atentando-se ao fato de que o mapa das doenças tropicais é susceptível a mudanças e que o contexto socioeconômico dessas regiões não pode ser subestimado, a Organização



**Figura 2.** Distribuição da malária e as taxas de incidência por países em 2018. (Fonte: adaptado WHO, 2019).

Mundial da Saúde (OMS/WHO), em 2000, introduziu o termo “doenças negligenciadas”. Essas doenças foram definidas como um grupo de patologias altamente prevalentes em populações de baixa renda e vulneráveis. Além disso, constituem um grave problema de saúde e social, pois contribuem para a perpetuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social, principalmente pelo impacto que causam na saúde infantil, na redução da taxa de escolarização, na redução da produtividade de trabalhadores e na promoção do estigma social.

O adjetivo “negligenciada” foi proposto tendo em vista os baixos investimentos em pesquisas e a falta de interesse das grandes empresas farmacêuticas no desenvolvimento de novos medicamentos para tratar tais enfermidades, em comparação a outras doenças (não-negligenciadas). Em 30 anos, foram disponibilizados aproximadamente 21 medicamentos novos para as patologias tropicais, enquanto mais de 1500 fármacos foram lançados no mercado mundial para o tratamento de doenças globais, como câncer, doenças cardiovasculares e endócrinas.

No Brasil totalizavam quatorze doenças negligenciadas: doença de Chagas, leishmaniose, malária, filariose, esquistossomose, hanseníase, tuberculose, dengue, HIV/AIDS, ascariase, tricuriase, necatoríase, ancilostomíase e tracoma. Desse grupo, destacaram-se HIV/AIDS, tuberculose e malária, que tiveram investimentos significativos, de modo que não estão mais incluídas no grupo das doenças negligenciadas. Posteriormente, foram incluídas outras patologias frequentes e extremamente preocupantes, como as causadas pela inoculação de toxinas animais, como os venenos ofídicos e de artrópodes. A tabela 1 sumariza as 22 principais doenças negligenciadas (WHO, 2020).

## 2 | ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS

<b>VÍRUS</b>	Dengue Chikungunya Raiva	
	<b>PROCARIOTES</b>	Úlcera de Buruli Lepra Tracoma Treponematoses
Unicelular		Doença de Chagas Tripanossomiase Africana Leshmaniose
<b>EUCARIONTES</b>	Multicelular	Cisticercose/ Taeníase Dracunculoses Equinococose Esquistossomose Filariose Linfática Helmintíases transmitidas pelo solo Micetoma Cromoblastomicose e outras micoses profundas Oncocercose Sarna e outros ectoparasitas Trematodíases alimentares Ambiente de picadas de serpentes

**Tabela 1.** Principais doenças negligenciadas tropicais identificadas pela Organização Mundial da Saúde no Brasil.

Ao longo da evolução, inúmeros organismos desenvolveram ferramentas potentes, como repelentes, toxinas e venenos, para os auxiliarem na luta pela sobrevivência, reprodução e alimentação. Os animais peçonhentos são conhecidos por apresentar glândulas de veneno e aparelhos inoculadores (dentes ocos, ferrões ou agulhões) para as substâncias tóxicas produzidas, usadas na captura de presas ou na defesa contra predadores. Entre esses animais, desta cam-se: lagartas, vespas, abelhas, escorpiões, aranhas e serpentes.

Os acidentes com as formas larvais de lepidópteros compreendem manifestações predominantemente dermatológicas – dor local, edema, eritema e prurido local, podendo evoluir para formação de bolhas e necrose. Os acidentes por himenópteros (abelhas, formigas e vespas) são mundialmente conhecidos por desenvolver reações alérgicas em indivíduos previamente sensibilizados, devido à liberação de substâncias desencadeadoras de resposta de hipersensibilidade imediata, como histamina, serotonina, dopamina, prostaglandinas e leucotrienos. Nos seres humanos são comumente relatadas dor severa e inflamação local, assim como angioedema, náusea, diarreia, colapso cardiovascular e choque anafilático.

## 2.1 ARACNÍDEOS

No Brasil, os escorpiões de interesse médico pertencem ao gênero *Tityus*. As manifestações clínicas podem ser classificadas em leve, moderada ou grave, dependendo da gravidade do acidente. Efeitos sistêmicos podem envolver os sistemas digestivo (náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal), cardiovascular (arritmias, hiper- e hipotensão arterial e insuficiência cardíaca congestiva), respiratório (taquipneia, dispneia e edema pulmonar agudo) e nervoso (agitação, sonolência, hipertonia e tremores). Os acidentes com aranhas no país pertencem aos

gêneros *Latrodectus* (viúva-negra), *Loxosceles* (aranha marrom) e *Phoneutria* (armadeira). Os principais sintomas em casos de envenenamentos são: dor, edema, sudorese profusa, priapismo, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e parada cardiorrespiratória, dependendo do tipo da espécie.

Dentre os animais peçonhentos com maior incidência de casos, os acidentes com serpentes tomam dimensões exorbitantes. Por isso, foram incluídos no grupo das doenças negligenciadas.

Os acidentes ofídicos constituem um grave problema de saúde pública, sendo frequentes em regiões tropicais e subtropicais situadas na África, Oceania e América Latina. Esses acidentes configuram um problema clínico-epidemiológico e, no ano de 2009, foram incluídos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), no quadro das Condições Negligenciadas. Recentemente, em 2017, durante o 10º Encontro do Grupo de Consultoria Estratégico e Técnico das Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde, os acidentes ofídicos voltaram a incorporar o quadro das Doenças Tropicais Negligenciadas (WHO, 2017).

Estima-se que cerca de 420 mil casos de envenenamento causados por serpentes possam ocorrer por ano em todo o mundo, e esse índice pode resultar em 20 mil óbitos. Os acidentes podem ocorrer em áreas remotas e subdesenvolvidas com ausência ou pouca estrutura para notificação e controle de envenenamento, podendo chegar a uma projeção de um milhão e 800 mil casos e, até mesmo, 94 mil óbitos a cada ano. A dificuldade de acesso ao serviço de saúde pelas populações rurais tem contribuído para o aumento dos casos de morbidade e mortalidade provocados por mordida de serpentes. Aqueles que muitas vezes não conseguem chegar ao hospital a tempo, acabam morrendo sem receber tratamento adequado, e as vítimas, geralmente trabalhadores rurais do sexo masculino e na idade produtiva entre 19 e 49 anos, que sobrevivem aos acidentes, precisam conviver com as sequelas físicas. Geralmente, os membros inferiores são os mais atingidos, o que acaba refletindo em um impacto econômico considerável para a família das vítimas.

Quanto à sazonalidade, para todos os tipos de acidentes ofídicos há maior frequência na época do ano em que há intensa atividade agrícola, como colheita e plantio, ou seja, nos meses de setembro a março nas regiões Sul e Sudeste e de janeiro a maio no Nordeste, enquanto, na região Norte, ocorre principalmente durante os meses mais chuvosos do ano. A elevação dos índices pluviométricos faz com que os leitos de rios, igarapés e açudes transbordem, obrigando as serpentes a procurar terra firme, o que facilita e aumenta as possibilidades de encontro com pessoas, ocasionando um número elevado de acidentes. Nesse mesmo período, há maior movimentação dos animais, ocasionada pelo período de reprodução de algumas espécies de serpentes, obrigando-os a buscar abrigo em locais secos, como as proximidades e até mesmo o interior das residências.

A gravidade dos acidentes depende de vários fatores, como gênero e espécie da serpente, tamanho do animal, tempo de atendimento, quantidade de veneno inoculado, local da inoculação e a intensidade dos sintomas. A composição bioquímica e as atividades toxicológicas desses venenos também devem ser levadas em consideração, visto que a composição bioquímica dos venenos de serpentes capturadas em diferentes áreas geográficas pode variar significativamente.

## 2.2 BOTHROPS E OUTROS OFÍDIOS

Na América Latina, a maioria dos acidentes ofídicos está relacionada ao gênero *Bothrops*, pertencente à família Viperidae. No Brasil, das 62 espécies de serpentes peçonhentas conhecidas, os acidentes ocorrem com um destes quatro gêneros: *Bothrops* e *Bothrocophias* (jararacas, 87% dos casos); *Crotalus* (cascavéis, 9% dos casos); *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca, 3% dos casos), e *Micrurus* e *Leptomicrurus* (corais-verdadeiras, 1% dos casos), as duas últimas pertencentes à família Elapidae.

Os aspectos fisiopatológicos do envenenamento ocasionado por serpentes botrópicas, de modo geral, são definidos como local e sistêmico, sendo que os distúrbios na coagulação e no sistema cardiovascular são as principais alterações sistêmicas. Dentre as manifestações locais, encontram-se dor, edema, hemorragia e mionecrose. Em casos mais graves pode haver dano tecidual intenso, com perda de função do órgão ou dano permanente ao tecido e local afetados.

Os acidentes crotálicos causam sérios problemas e podem ser fatais pela falta de tratamentos adequados. O aumento do índice de letalidade ocorre devido à frequência com que o envenenamento crotálico progride para a insuficiência renal aguda, uma das principais causas de morte, além dos efeitos neurotóxicos, miotóxicos e distúrbios na coagulação. No envenenamento por *Lachesis* são observados sinais e sintomas semelhantes àqueles associados ao gênero *Bothrops*, caracterizados por dor local, edema, hemorragia e mionecrose. Efeitos neurotóxicos (comuns ao gênero *Crotalus*) também são relatados. Porém, há manifestações sistêmicas consideradas próprias de envenenamentos laquéuticos, como a síndrome vagal, caracterizada por sudorese profusa, cólica abdominal, náusea, vômito, diarreia aquosa, bradicardia, sonolência e lapsos de consciência, podendo persistir por dias, mesmo após a administração de antivenenos. Por fim, serpentes do gênero *Micrurus*, pertencente à família Elapidae, e popularmente conhecidas como coral ou cobra-coral, causam acidentes pouco frequentes e de baixa letalidade.

As manifestações clínicas locais são discretas ou até mesmo ausentes, sendo raros os acidentes graves. No entanto, sistemicamente, o acidente elapídico é caracterizado por manifestações paralíticas, devido à ação neurotóxica pré- e pós-sináptica do veneno, também denominadas ações curarimiméticas, pela semelhança com sintomas da miastenia grave, paralisia muscular facial que causa ptose palpebral e distúrbios visuais. Em ambas as situações ocorrem paralisias nas musculaturas intercostais, diafragmática e miocárdica, provocando decréscimo na função cardiorrespiratória e levando as vítimas a óbito em casos de acidentes graves.

O tratamento disponível para neutralizar a ação dos venenos de serpentes é a administração de imunobiológico ou soro antiofídico, também conhecido como soro heterólogo ou antiveneno, que contém alta concentração de anticorpos específicos íntegros (imunoglobulinas G) ou fragmentos (F(ab) ou F(ab')<sub>2</sub>), obtidos do processamento do plasma de equinos (cavalos) ou ovinos (ovelhas) hiperimunizados.

O soro tem um papel fundamental na redução da morbidade e do número de óbitos decorrentes de envenenamentos. O tratamento com soro antiofídico está incorporado na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde, devendo ser disponibilizado em

locais onde há ocorrência e notificação de acidentes ofídicos. Embora a terapêutica demonstre eficácia contra os danos sistêmicos, apresenta limitações no tratamento dos efeitos locais. Além disso, as possíveis reações adversas após a administração com antivenenos, o tempo necessário nas etapas de produção e a manutenção onerosa do rebanho instigam a busca por novos processos e/ou produtos alternativos que auxiliem no tratamento dos envenenamentos ofídicos.

### **3 | BIODIVERSIDADE MARINHA COMO FONTE DE POTENCIAIS FÁRMACOS**

Os primeiros organismos vivos da Terra surgiram no ambiente marinho há mais de 3500 milhões de anos. Por terem sido os primeiros a surgir, consequentemente esses organismos passaram por um processo evolutivo mais longo, o que pode ter favorecido a produção de uma grande variedade de moléculas com estruturas únicas em termos de diversidade e função. Aproximadamente 70% do planeta é coberto por oceanos, no entanto a dificuldade de acesso, por muito tempo, não favoreceu projetos de pesquisa que tivessem como objeto fontes marinhas. Esse quadro começou a mudar a partir da década de 70, quando houve um avanço nas técnicas de mergulho e surgiram novas tecnologias que garantiam a fabricação de equipamentos mais seguros. Nesse período, iniciaram-se os primeiros trabalhos de isolamento de biomoléculas derivadas de invertebrados marinhos e a bioprospecção de fármacos a partir de análogos sintéticos inspirados nestes.

Atualmente, sete produtos de origem marinha com fins terapêuticos estão aprovados e são comercializados. Quatro deles são administrados em terapias contra o câncer: a citarabina (Aracytin<sup>®</sup>), derivada de um nucleosídeo obtido da esponja *Tethya crypta*; a trabectedina (Yondelis<sup>®</sup>), um alcaloide derivado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, a primeira molécula natural marinha a ser aprovada para uso clínico na quimioterapia do câncer e a primeira droga em 20 anos a ser validada para o tratamento de sarcoma em tecidos moles; o mesulato de eribulina (Halaven<sup>®</sup>), derivado de um poliéter macrocíclico obtido da esponja *Halichondria okadai*; a vedotina, obtida do gastrópode *Dolabella auricularia*, complexada com um anticorpo brentuximabe (Adcetris<sup>®</sup>) específico para células tumorais que expressam o marcador CD30. Dos sete produtos de origem marinha aprovados como medicamento, dois deles são antivirais: a vidarabina (Viread<sup>®</sup>), que assim como a citarabina é também derivado de um nucleosídeo obtido da esponja *Tethya crypta*, foi aprovada em 1976, porém descontinuada nos Estados Unidos desde o ano de 2001, e a iota-carragenina (Carragelose<sup>®</sup>), um polissacarídeo sulfatado extraído de algas vermelhas. Um dos medicamentos, é um potente analgésico, mais eficiente que a morfina. O ziconotídeo (Prialt<sup>®</sup>), um peptídeo de 25 aminoácidos, obtido do molusco *Conus magnus* aplicado no controle da dor.

Além dos fármacos aprovados, atualmente existem mais de 20 produtos naturais marinhos em diferentes estágios clínicos, sendo grande o número de pesquisas básicas e em fases iniciais relatando efeitos antibacteriano, imunomodulador, antifúngico, anti-inflamatório, antitumoral, neuroprotetor e analgésico. Neste capítulo, listamos os extratos ou moléculas, isoladas de macroinvertebrados marinhos e algas, com atividade farmacológica sobre micro-organismos

causadores de doenças tropicais negligenciadas e sobre os efeitos promovidos por envenenamento ofídico.

### 3.1 ALGAS, ESPONJAS, CORAIS E OUTROS ORGANISMOS MARINHOS COMO FONTE DE ANTI-PARASÍTICOS

Algas, esponjas, corais e moluscos apresentam atividades biológicas relevantes contra *Leishmania*, *Plasmodium* e *Trypanosoma*. Geralmente, os ensaios contra esses parasitas são realizados com extratos obtidos a partir da porção total do organismo marinho. Poucos estudos relatam testes semelhantes a estes, utilizando somente veneno. Os solventes utilizados no processo de extração podem interferir diretamente na atividade. Extratos hidroalcoólicos de algas vermelhas e marrons do Norte da França são capazes de inibir o crescimento de cepas de *P. falciparum* K1 resistente e *L. donovani*, respectivamente. Contudo, os mesmos testes utilizando extratos obtidos com solventes apolares mostram resultados mais significativos, sugerindo que os compostos com atividade antiparasitária, contidos nesses extratos, provavelmente são moléculas mais apolares. Extratos aquosos das algas *Bryothamnion triquetrum* e *Halimeda opuntia* (Cuba) e frações da alga vermelha *Bostrychia tenella* (Brasil) tiveram atividade contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

Estudos que envolvem extratos obtidos a partir de invertebrados marinhos e parasitas são descritos principalmente para as leishmanioses. Anêmonas, caravelas, pepinos do mar, briozoários e gorgônias são os mais citados. O extrato hidroalcoólico da anêmona *Bunodossona granulifera* e o extrato aquoso da caravela *Physalia physalis* são eficazes contra amastigotas de *L. amazonensis*; enquanto frações de n-butanol do pepino do mar *Actinopyga lecanora* possuem ação contra as cepas de *L. donovani*. Extratos de n-butanol do briozoário *Bugula neritina* e do coral *Carijoa riseii* exibiram atividade relevante em promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*. Lectinas isoladas do plasma do molusco bivalve *Anadara granosa* (Índia) são capazes de aglutinar formas promastigotas de *L. donovani*, enquanto lectinas das esponjas *Cliona varians* e *Cinachyrella apion* (Brasil) aglutinaram formas promastigotas de *L. chagasi*. A principal característica dessa classe de proteínas é a aglutinação por meio da ligação a carboidratos ou a glicoconjugados específicos aderidos à superfície celular. A capacidade de aglutinar promastigotas de cepas de *Leishmania* indica que, na fase infecciosa, os parasitas expressam glicoconjugados na superfície celular que podem ser essenciais para a sua sobrevivência e para o mecanismo de infecção.

As atividades antiofídicas de extratos marinhos também são relatadas. A esponja *Petromica citrina* foi capaz de inibir letalidade, hemorragia, coagulação do plasma e hemólise induzida pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Lachesis muta*. Os extratos das anêmonas *Condylactis gigantea*, *Stichodactyla helianthus* e *Bartholomea annulata* e dos corais *Millepora alcicornis* e *Plexaura homomalla*, foram capazes de neutralizar a coagulação induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (exceto *M. alcicornis*) e inibir o efeito hemorrágico causado pelo veneno de *B. moojeni*.

A tabela 2 enumera extratos de diferentes organismos marinhos, obtidos por diferentes solventes e suas atividades frente a parasitas e venenos de serpentes.

**Tabela 2.** Extratos de organismos marinhos testados quanto a suas atividades biológicas sobre diferentes parasitos e venenos ofídicos.

ESPÉCIE	ORGANISMO	LOCAL DE COLETA	TIPO DE EXTRAÇÃO	ATIVIDADE BIOLÓGICA	IC50 (µg/mL)	REFERÊNCIA
<i>A. lecanora</i>	Pepino do mar	Oceano Índico	N-butanol(fração)	Antileishmania (promastigotas de <i>L. donovani</i> ) Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> )	8,2 5	Singh et al., 2008
<i>A. viridis</i>	Eponja	Brasil	Acetona	Antiofídica	-	Faioli et al., 2013
<i>A. saldamhae</i>	Alga	Brasil	Acetona	Antileishmania (promastigotas de <i>L. braziliensis</i> )	23,9	Bianco et al., 2013
<i>A. fulva</i>	Eponja	Brasil	Acetona	Antiofídica	-	Faioli et al., 2013
<i>A. armata</i>	Alga	Itália	Acetato de etila (fração)	Antileishmania (promastigotas de <i>L. donovani</i> ) Antileishmania (promastigotas de <i>L. donovani</i> )	10 19	Genovese et al., 2009
<i>A. taxiformis</i>	Alga	Itália	Hexano Diclorometano	Antileishmania (promastigotas de <i>L. donovani</i> ) Antileishmania (promastigotas de <i>L. donovani</i> )	17 16	Genovese et al., 2009
<i>B. bifurcata</i>	Alga	França	Acetato de etila	Antiplasmodium (Plasmodium falciparum, intraeritrocítico) Antitripanosoma (tripomastigotas de <i>T. b. rhodesiense</i> ) Antitripanosoma (amastigotas de <i>T. cruzi</i> )	9,7 45 58	Minicante et al., 2016
<i>B. tenella</i>	Alga	Brasil	N-hexano (fração H02) N-hexano (fração H03) N-hexano (fração D01) N-hexano (fração D02)	Antileishmania (promastigotas de <i>L. amazonensis</i> )	1,5 2,7 4,4 4,3	De Felicio et al., 2010
<i>B. neritina</i>	Briozoário	Brasil	N-butanol	Antileishmania (promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ) Antileishmania (amastigotas de <i>L. braziliensis</i> )	47 >50	Bianco et al., 2013
<i>B. granulifera</i>	Anêmona	Cuba	Hidroalcoólico	Antileishmania (amastigotas de <i>L. amazonensis</i> )	82,8	García et al., 2010
<i>C. crispus</i>	Alga	França	Hidroalcoólico	Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> )	9,7	Faioli et al., 2013

**Tabela 2.** Continuação

ESPÉCIE	ORGANISMO	LOCAL DE COLETA	TIPO DE EXTRAÇÃO	ATIVIDADE BIOLÓGICA	IC50 (µg/mL)	REFERÊNCIA
<i>C. risei</i>	Coral	Brasil	N-butanol e metanol	Antileishmania (promastigotas de <i>L. braziliensis</i> )	14,6	Bianco et al., 2013
			Hexano	Antileishmania (amastigotas de <i>L. braziliensis</i> )	143,3	
			Hexano	Antileishmania (promastigotas de <i>L. braziliensis</i> )	35,9	
			N-butanol e metanol Extrato aquoso e metanol		2,6 5,5	
			Hexano	Antitripanosoma (epimastigotas de <i>T. cruzi</i> )	43,4	
			Diclorometano		29,1	
			Acetato de etila e metanol		26,1	
			N-butanol	Antileishmania (promastigotas de <i>L. braziliensis</i> )	14,6	
				Anti-leishmania (amastigotas de <i>L. braziliensis</i> )	46,6	
<i>B. triquetrum</i>	Alga	Cuba	Aquosa	Antileishmania (promastigotas de <i>L. amazonensis</i> )	78,6	Spavieri, 2010
<i>C. sertularioides</i>	Alga	Golfo Pérsico	Aquosa a quente	Antileishmania (promastigotas de <i>L. major</i> )	85	Bianco et al., 2013
			Aquosa a frio		125	
<i>C. collectrix</i>	Espoonja	Brasil	Acetona	Antiofidica	-	Faioli et al., 2013
<i>C. rupestris</i>	Alga	Inglaterra	Clorofórmio, acetato de etila e metanol	Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> )	20,2	Spavieri, 2010
				Antitripanosoma (tripomastigotas de <i>T. b. rhodesiense</i> )	3,7	
				Antitripanosoma (tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> )	80,8	
<i>C. fragile</i>	Alga	Inglaterra	Clorofórmio, acetato de etila e metanol	Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> )	16,6	Spavieri, 2010
				Antitripanosoma (tripomastigotas de <i>T. b. rhodesiense</i> )	8,9	
				Antitripanosoma (tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> )	>90	
<i>C. ramosa</i>	Alga	Irlanda/ Reino Unido	Clorofórmio, acetato de etila e metanol	Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> )	85,6	Broniatowska et al., 2011
				Antitripanosoma (tripomastigotas de <i>T. b. rhodesiense</i> )	21	

Tabela 2. Continuação

ESPÉCIE	ORGANISMO	LOCAL DE COLETA	TIPO DE EXTRAÇÃO	ATIVIDADE BIOLÓGICA	IC50 (µg/mL)	REFERÊNCIA
<i>D. anchorata</i>	Espunja	Brasil	Acetona	Antiofídica	-	Faioli et al., 2013
<i>D. anõmala</i>	Espunja	Brasil	Hexano	Antileishmania (promastigotas de <i>L. braziliensis</i> ) Antileishmania (amastigotas de <i>L. braziliensis</i> )	97,2 54,3	
<i>D. etheria</i>	Espunja	Brasil	Acetona	Antiofídica	-	Faioli et al., 2013
<i>G. corticata</i>	Alga	Golfo Pérsico	Aquosa a quente Aquosa a frio	Antileishmania (promastigotas de <i>L. major</i> ) Antileishmania (promastigotas de <i>L. major</i> )	38 65	Spavieri et al., 2010
<i>G. salicornia</i>	Alga	Golfo Pérsico	Aquosa a quente Aquosa a frio	Antileishmania (promastigotas de <i>L. major</i> ) Antileishmania (promastigotas de <i>L. major</i> )	46 74	Spavieri et al., 2010
<i>Halichoelona sp.</i>	Espunja	Brasil	Resíduo aquoso de N-butanol	Antileishmania (promastigotas de <i>L. braziliensis</i> ) Antileishmania (amastigotas de <i>L. braziliensis</i> )	16,9 54,3	Bianco et al., 2013 Gros et al., 2015
<i>H. exigua</i>	Espunja	Índia	N-butanol	Antileishmania (promastigotas de <i>L. donovani</i> ) Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> )	31,2 8,2	Gros et al., 2015
<i>H. opuntia</i>	Alga	Cuba	Aquosa	Antileishmania (promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ) Antileishmania (amastigotas de <i>L. amazonensis</i> )	83,5 70,7	SPAVIERI et al., 2010
<i>H. incurvus</i>	Alga	Irlanda/ Reino Unido	Clorofórmio, acetato de etila e metanol	Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> )	16,5	Broniatowska et al., 2011
<i>I. spinosula</i>	Espunja	Tunisia	Acetato de etila	Antileishmania (promastigotas de <i>L. major</i> )	16,09	Bem-Kahla et al., 2010
<i>M. stellatus</i>	Alga	Reino Unido	Clorofórmio, acetato de etila e metanol	Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> ) Antitripanosoma (tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> ) Antitripanosoma (tripomastigotas de <i>T. b. rhodesiense</i> )	44,1 >90 11,1	Broniatowska et al., 2011
<i>M. angulosa</i>	Espunja	Brasil	Acetona	Antiofídica	-	Faioli et al., 2013

**Tabela 2.** Continuação

ESPÉCIE	ORGANISMO	LOCAL DE COLETA	TIPO DE EXTRAÇÃO	ATIVIDADE BIOLÓGICA	IC50 (µg/mL)	REFERÊNCIA
<i>P. citrina</i>	Espunja	Brasil	Acetona	Antiofídica	-	Faioli et al., 2013
<i>P. physalis</i>	Caravela	Cuba	Aquosa	Antileishmania (amastigotas de <i>L. amazonensis</i> )	52,8	Spavieri et al., 2010
<i>P. brasiliense</i>	Alga	Brasil	Diclorometano	Antiofídica	-	Da Silva et al., 2015
<i>P. janeirensis</i>	Espunja	Brasil	Acetona	Antiofídica	-	Faioli et al., 2013
<i>S. stellatum</i>	Coral	Madagascar	Metanol	Antiplasmodium ( <i>P. falciparum</i> , FCM29)	35,20	Rahelivao et al., 2017
<i>Sarcothragus sp.</i>	Espunja	Tunísia	Diclorometano (fração)	Antileishmania (promastigotas de <i>L. major</i> )	1,39	Bem-Kahla et al., 2010
<i>S. oligocystum</i>	Alga	Golfo Pérsico	Aquosa a quente Aquosa a frio	Antileishmania (promastigotas de <i>L. major</i> ) Antileishmania (promastigotas de <i>L. major</i> )	78 105	Spavieri et al., 2010
<i>T. ignis</i>	Espunja	Brasil	Acetona	Antiofídica	-	Faioli et al., 2013
<i>U. intestinalis</i>	Alga	Inglaterra	Clorofórmio, acetato de etila e metanol	Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> ) Antitriptanosoma (triptomastigotas de <i>T. b. rhodesiense</i> ) Antitriptanosoma (triptomastigotas de <i>T. cruzi</i> )	14,9 11 >90	Spavieri et al., 2010
<i>U. lactuca</i>	Alga	Inglaterra	Clorofórmio, acetato de etila e metanol	Antileishmania (amastigotas de <i>L. donovani</i> ) Antitriptanosoma (triptomastigotas de <i>T. b. rhodesiense</i> ) Antitriptanosoma (triptomastigotas de <i>T. cruzi</i> )	12 18 34,9	Spavieri et al., 2010

Moléculas isoladas de invertebrados marinhos, principalmente da classe dos terpenos e alcaloides, podem ter ação sobre parasitas de gêneros diferentes, como a ilimaquinona, um terpenoide produzido por vários gêneros de esponjas, mencionado na literatura por perturbar o complexo de Golgi em células de mamíferos, interromper a proliferação e induzir alterações morfológicas e ultraestruturais em promastigotas de *L. mexicana*. Esponjas são particularmente abundantes quanto a síntese de terpenoides e alcaloides. O diterpeno (11 $\beta$ -acetoxyspongi-12-en-16-one), obtido de esponjas *Spongia* sp. coletadas no Mar Egeu (Turquia), é exemplo promissor, por exibir atividade contra *T. cruzi* e *L. donovani*. Nessas mesmas espécies foi encontrado o diterpeno (dorisenone D), ativo contra cepas de *P. falciparum*, e o meroterpeno linear (heptaprenyl-*p*-quinol), que mostrou atividade contra *T. cruzi*.

Alcaloides do tipo manzaminas, derivados de esponjas *Acanthostrongylophora* sp. (Indonésia), são ativos contra formas promastigotas de *L. donovani*. Uma série de alcaloides presentes em extratos da esponja *Monanchora arbuscula* (Brasil) foram eficazes contra promastigotas de *L. infantum*. Alcaloides de guanidina mostram relevantes atividades antivirais, antifúngicas e antiparasitárias, como observado para os compostos monalidine A, batzelladines F, batzelladines L e norbatzelladine L isolados da esponja brasileira *M. arbuscula* que foram ativos contra tripomastigotas de *T. cruzi*. O diterpeno dolastano, purificado da alga *Canistrocarpus cervicornis*, inibe hemólise e o efeito hemorrágico *in vivo* do veneno de *L. muta*. A tabela 3 enumera as moléculas obtidas de extratos marinhos com propriedades antiparasitárias e antiofídicas.

### 3.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Mesmo com o avanço de programas de financiamento para algumas áreas de doenças negligenciadas, no Brasil, doenças como malária, leishmaniose e envenenamentos por animais peçonhentos, principalmente os ofídicos, ainda necessitam de mais investimentos. Por isso é necessário desenvolver um esforço maior na compreensão e nos estudos dedicados às doenças negligenciadas, com uma atenção especial ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o controle das infecções de interesse no Brasil. Ações como as da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), que, baseando-se na quantidade de medicamentos derivados de produtos naturais ou baseados neles, recomenda que os governos de países com alta incidência de doenças tropicais negligenciadas, desenvolvam estratégias que combinem o conhecimento tradicional da biodiversidade com empreendimentos científicos para o desenvolvimento de novas terapias de tratamento para estas doenças, pode ser uma estratégia interessante para a bioprospecção de fármacos. Desse modo, a vasta gama de metabólitos sintetizados por invertebrados marinhos pode e deve ser explorada como protótipos químicos na descoberta de potenciais drogas.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Rondônia de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do Estado de Rondônia (FAPERO).

## REFERÊNCIAS

- Alves, W.A. (2009) Leishmaniasis: current situation in Brazil. **Bepa**. 6(71): 25-29.
- Antinori et al. (2012) Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**. 4(1): e2012013.
- Bannister et al. (2003) *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. **Journal of Cell Science**. 116(18): 3825-3834.
- Bartoloni, A.; Zammarchi, L. (2012) Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**. 4(1).
- Bianco et al. (2013) Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. **Molecules**. 18: 5761-5778.
- Broniatowska, B. et al. (2011) Antiprotozoal, antitubercular and cytotoxic potential of cyanobacterial (blue-green algal) extracts from Ireland. **Natural Product Communications**. 6(5): 689-694.
- Burrows, J.N. et al. (2014) Antimalarial drug discovery—the path towards eradication. **Parasitology**. 141(1): 128-139.
- Camargo, E.P. (2008) Doenças tropicais. **Estudos Avançados**. 22(64): 95-110.
- Cantanhêde et al. (2015) Further evidence of an association between the presence of Leishmania RNA virus 1 and the mucosal manifestations in tegumentary leishmaniasis patients. **Neglected Tropical Diseases**. 9:1-11.
- Centre For Diseases Control: <http://cdc.com> (informações sobre doenças infecciosas).
- Chin, W. et al. (1968) Experimental mosquito-transmission of *Plasmodium knowlesi* to human and monkey. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 17: 355-358.
- Cibulskis, R.E. et al. (2016) Malaria: global progress 2000-2015 and future challenges. **Infectious Diseases of Poverty**. 5(1):1.
- Da Silva et al. (2015) The red seaweed *Plocamium brasiliense* shows anti-snake venom toxic effects. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. 21:1-9.
- Dam, T.K. et al. (1994) Purification and partial characterization of a heparin-binding lectin from the marine clam *Anadara granosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 203(1): 36-45.
- De Assis et al. (2008) Purification and complete primary structure of the first PLA2 from *Lachesis stenophrys* (the Central American Bushmaster) snake venom. **Protein Journal**. 27(5): 327-333.

De Lima, P.H.S.; Junior, V.H. (2015) A snakebite caused by a bushmaster (*Lachesis muta*): report of a confirmed case in State of Pernambuco. **Brazil**. 48: 636-637.

Domingos et al. (2015) Effect of diterpenes isolated of the marine alga *Canistrocarpus cervicornis* against some toxic effects of the venom of the *Bothrops jararaca* snake. **Molecules**. 20: 3515-3526.

Faioli et al. (2013) Appraisal of antiophidic potential of marine sponges against *Bothrops jararaca* and *Lachesis muta* venom. **Toxins**. 5: 1799-1813.

De Felício, R. et al. (2010) Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 52(5): 763-769.

Franco, J.R. et al (2014) Epidemiology of human African trypanosomiasis. **Clinical Epidemiology**. 6: 257-275.

Galeano, E. et al. (2011) Antiparasitic bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Verongula rigida*. **Marine Drugs**. 9(10): 1902-1913.

García, P.M et al. (2012) Antileishmanial activity of six extracts from marine organisms. **Revista Cubana de Medicina Tropical**. 64(1): 61-64.

Gazzinelli, R.T. et al. (2014) Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**. 1: 1-14.

Genovese, G. et al. (2009) The Mediterranean red alga *Asparagopsis*: a source of compounds against *Leishmania*. **Marine Drugs**. 7(3): 361-366.

Gray, C.A. et al. (2006) Sulfated meroterpenoids from the Brazilian sponge *Callyspongia* sp. are inhibitors of the antileishmaniasis target adenosine phosphoribosyl transferase. **The Journal of Organic Chemistry**. 71(23): 8685-8690.

Gros, E. et al. (2014) Netamines H-N, tricyclic alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei* and their antimalarial activity. **Journal of Natural Products**. 77(4): 818-823.

Hanboonkunupakarn, B.; White, N.J. (2016) The threat of antimalarial drug resistance. **Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines**. 2(1): 1.

Howes et al. (2016) Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 95(6): 15-34.

Hua, H.-M et al. (2004) Crystallographic and NMR studies of anti-infective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 12(24): 6461-6464.

Ishigami, S.-T. et al. (2012) Cristaxenicin A, an antiprotozoal xenicane diterpenoid from the deep sea gorgonian *Acanthoprimnoa cristata*. **The Journal of Organic Chemistry**. 77(23): 10962-10966.

Kahla-Nakbi, A.B. et al. (2010) Screening of antileishmanial activity from marine sponge extracts collected off the Tunisian coast. **Parasitology Research**. 106(6): 1281-1286.

Lainson, R. (2010) The neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev. Pan-Amazônica de Saúde**. 1(2): 13-38.

Lainson, R.; Shaw, J.J. (1998) New World leishmaniasis - the Neotropical *Leishmania* species. In: Feg, C.; Krier, J.P.; Wakelin D. (Editors). **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**. London: Arnold. 5: 241-266.

Lanca et al. (2012) Risk factors and characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to pediatric intensive care units in the Brazilian Amazon. **PLoS One**. 7(4): e35406.

Lebouvier et al. (2009) Antiplasmodial activities of homogentisic acid derivative protein kinase inhibitors isolated from a Vanuatu marine sponge *Pseudoceratina* sp. **Marine Drugs**. 7: 640-653.

Lehnhardt P.C. et al. (2013) Evaluation of macroalgae sulfated polysaccharides on the *Leishmania* (L.)

amazonensis promastigote. **Marine Drugs**. 11(3): 934-943.

Le Pape, P. et al. (2000) A glycoprotein isolated from the sponge, *Pachymatisma johnstonii*, has anti-leishmanial activity. **Cell Biology International**. 24(1): 51-56.

López et al. (201) Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. **Gene**. 467: 1-12.

Ma, W.S. et al. (2009) Norselic Acids A- E, Highly Oxidized Anti-infective Steroids that Deter Mesograzed Predation, from the Antarctic Sponge *Crella* sp. **Journal of Natural Products**. 72(10): 1842-1846.

Mackey et al. (2014) Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. **Clinical Microbiology Reviews**. 27(4): 949-979.

Magalhães et al. (2003) Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**. 136(2): 255-266.

Marzochi, M.C.A.; Marzochi, K.B.F. (1994) Tegumentary and visceral leishmanioses in Brazil - Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Pública**. 10(2): 359-375.

Medeiros, D.S. et al. (2010) A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania promastigotes*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. 155(3): 211-216.

Melek, F.R. et al. (2012) Screening of marine extracts for schistosomicidal activity *in vitro*: Isolation of the triterpene glycosides echinosides A and B with potential activity from the Sea Cucumbers *Actinopyga echinites* and *Holothuria polii*. **Pharmaceutical Biology**. 50(4): 490-496.

Ministério Da Saúde. (2010) Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. **Centro Nacional de Epidemiologia**. Fundação Nacional de Saúde, Brasília.

Miotto et al. (2013) Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. **Nat Genet**. 45: 648-655.

Moura, R.M. et al. (2006) CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. 145(4): 517-523.

Nakao, Y. et al. (2008) Ciliatamides A- C, bioactive lipopeptides from the deep-sea sponge *Aaptos ciliata*. **Journal of Natural Products**. 71(3): 469-472.

Orhan, I. et al. (2010) Inhibitory activity of marine sponge-derived natural products against parasitic protozoa. **Marine Drugs**. 8(1): 47-58.

Organização Mundial Da Saúde: <http://www.who.int> (dados: Data and Statistics, WHOSIS, TDR, Tropical diseases e Neglected Tropical Diseases).

Organização Mundial Da Saúde: <http://www.paho.org> (dados sobre saúde nas Américas, procurar em Health Data).

Organização Mundial da Saúde: <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019> (Relatório mundial sobre a malária 2019).

Packard, R.M. (2014) The origins of antimalarial-drug resistance. **New England Journal of Medicine**. 371: 397-399.

Pérez et al. (2016) Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. **Marine Drugs**. 14:52.

Pimenta, P.F.P. et al. (2012) Interação do protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. In: **Tópicos avançados em entomologia molecular**. 12: 1-45.

Pla et al. (2013) Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment

of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across *Lachesis*. **Journal of Proteomics**. 89: 112-123.

Rangel, E.F.; Lainson, R. (2009) Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 104(7): 937-954.

Rahelivao, M.P. et al. (2017) Isolation and structure elucidation of natural products of three soft corals and a sponge from the coast of Madagascar. **Organic & Biomolecular Chemistry**. 15(12): 2593-2608.

Rao, K.V. et al. (2004) Three new manzamine alkaloids from a common Indonesian sponge and their activity against infectious and tropical parasitic diseases. **Journal of Natural Products**. 67(8): 1314-1318.

Reimão, J.Q. et al. (2008) Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoa riisei*. **Parasitology Research**. 103(6): 1445-1450.

Rocha-Martin et al. (2014) Emerging strategies and integrated systems microbiology technologies for biodiscovery of marine bioactive compounds. **Marine Drugs**. 12: 3516-3559.

Rogers et al. (2011) Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**. 21(12): 2129-2142.

Sacks, D.; Noben-Trauth, N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**. 2: 845-858.

Sánchez et al. (1991) Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **Biochimica et Biophysica Acta**. 1074(3): 347-56.

Santos, A.O. et al. (2011) 4-Acetoxydolastane diterpene from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. **Marine Drugs**. 9(11): 2369-2383.

Santos, M.F.C. et al. (2015) Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora arbuscula*. **Journal of Natural Products**. 78(5): 1101-1112.

Sanz et al. (2008) Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of Proteomics**. 71(1): 46-60.

Sargolzaie, N.; Kiani, M. (2014) Malaria and social disparity. Zahedan **Journal of Research in Medical Sciences**. 16(4): 45-45.

Shaw, J.J. (1997) Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. A review. **Brazilian Journal of Genetics**. 20(1).

Silveira, F.T. et al. (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 99(3): 239-251.

Singh, N. et al. (2008) Antileishmanial activity in vitro and in vivo of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora*. **Parasitology Research**. 103(2): 351-354.

Soares et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**. 46(1): 31-38.

Spavieri, J. et al. (2010) Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of some British green algae. **Phytotherapy Research**. 24(7): 1095-1098.

Thao, N.P. et al. (2015) Anti-protozoal activities of cembrane-type diterpenes from Vietnamese soft corals. **Molecules**. 20(7): 12459-12468.

Von Salm, J.L. et al. (2014) Shagenes A and B, new tricyclic sesquiterpenes produced by an undescribed Antarctic octocoral. **Organic Letters**. 16(10): 2630-2633.

White, N.J. et al. (2014) Malaria. **The Lancet**. 383: 723-735.

Yang, F. et al. (2012) Antimicrobial metabolites from the Paracel Islands sponge *Agelas mauritiana*. **Journal of Natural Products**. 75(4): 774-778.



# BIOINCRUSTAÇÃO E BIOINVASÃO SOB A PERSPECTIVA DA BIOTECNOLOGIA MARINHA

Ricardo Coutinho<sup>a</sup>  
Luciana V. R. de Messano<sup>a</sup>  
Fernando Siviero<sup>a</sup>  
Luciana V. Granthom Costa<sup>a</sup>  
Daniela Batista<sup>a</sup>  
José Eduardo Arruda Gonçalves<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

## RESUMO

Bioincrustação marinha é o processo de colonização e crescimento de micro e macro-organismos em substratos artificiais submersos tais como cascos de navios, plataformas, pilares, boias etc. Esse processo pode ocorrer em quatro etapas sequenciais – o condicionamento bioquímico, a colonização bacteriana, a colonização por eucariontes unicelulares e por eucariontes multicelulares. Os prejuízos causados pelo crescimento desses organismos atingem as diversas indústrias que utilizam diretamente sistemas marinhos, entre elas, em particular, as indústrias naval e petrolífera, a indústria da aquicultura, centrais nucleares, usinas de dessalinização e mais recentemente o setor de energias renováveis, como os geradores de energia de ondas e marés. Os métodos de amostragem dos organismos incrustantes em substratos artificiais são adaptações dos utilizados em outros substratos duros, como os costões rochosos e recifes de corais. O monitoramento da bioincrustação pode ser realizado a partir do momento em que uma estrutura é submergida na água, para avaliação desde a fase inicial da sucessão ecológica, quando há a formação do biofilme microbiano. Esse tipo de estudo é uma importante ferramenta, por exemplo, de avaliação da ação de uma tinta anti-incrustante para a indústria naval. A bioincrustação marinha nos cascos de navios e plataformas é considerada um importante vetor de transferência de espécies para fora de sua área de distribuição original. Esse processo se intensificou nas últimas décadas, devido à expansão do comércio e do intenso tráfego, e, uma vez que os volumes de comércio marítimo continuam a aumentar, o problema ainda não atingiu seu pico. A presença de espécies exóticas numa região é sempre vista como uma grande ameaça para a biodiversidade, pois pode

causar a extinção ou retração de uma ou mais espécies nativas de uma área ou comunidade. As lacunas no conhecimento sobre a distribuição das espécies nativas e sobre a ocorrência e entrada de espécies exóticas no ambiente natural dificultam a quantificação de impactos, as ações preventivas e a definição de estratégias de controle para os problemas de bioinvasão no âmbito regional e nacional. Produtos naturais com propriedades anti-incrustantes têm sido identificados a partir de espécies de algas marinhas, esponjas, corais moles e outras, e têm sido considerados alternativas às tintas anti-incrustantes convencionais que usam metais pesados como biocidas. A elucidação sobre a comunicação de micro-organismos chamada de *quorum sensing* (QS) foi recentemente proposta como uma ferramenta potencial alternativa para controlar a incrustação biológica. Os vários métodos empregados na biotecnologia marinha oferecem alternativas potenciais no controle do processo de bioinvasão por bioincrustação, de forma a prevenir e controlar a presença de espécies indesejáveis nos substratos artificiais e seus arredores.

## 1 | INTRODUÇÃO E CONCEITOS

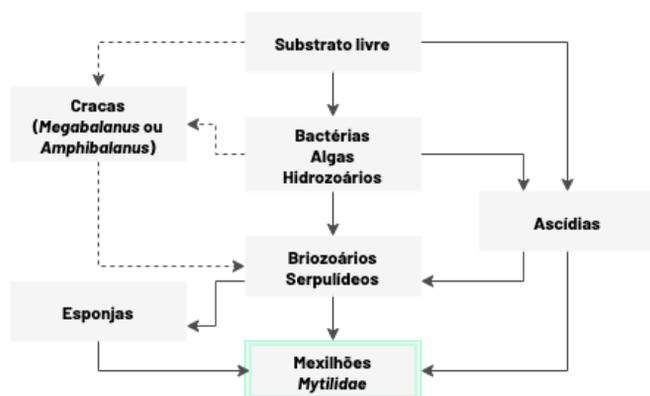
A bioincrustação marinha é geralmente definida como a colonização e acúmulo de organismos em uma superfície “estática” de estruturas artificiais como cascos de navios, pilares, boias, poitas, entre outras, que estejam imersas ou semi-imersas em um ambiente marinho. A bioincrustação é uma complexa camada de organismos, incluindo, além de bactérias e protozoários, micro e macroalgas, esponjas, cnidários, bivalves, poliquetos tubícolas, cirripédios, briozoários e tunicados, que pode ocorrer em qualquer superfície submersa em água do mar. O termo bioincrustação é utilizado para diferenciar os organismos bentônicos incrustantes que se desenvolvem sobre substratos artificiais, dos que se desenvolvem em substratos naturais, e frequentemente é empregado para delimitar situações em que o crescimento dos organismos é considerado prejudicial (Woods Hole Oceanographic Institution, 1952).

O processo de desenvolvimento reflete uma sequência temporal de desenvolvimento da comunidade controlada por processos biológicos (facilitação, competição, predação). De acordo com Wahl (1989), a ocupação da superfície segue uma sequência que pode ser simplificada em quatro etapas principais:

1. Condicionamento bioquímico, em que há a chegada de moléculas orgânicas. Essas moléculas adsorvem condicionando a superfície através de processos eletrolíticos puramente físicos e possibilitam o assentamento das bactérias a essa superfície.
2. Colonização bacteriana, em que a chegada das bactérias pode ser reversível (adsorção) ou irreversível (adesão). Os micro-organismos se aderem por fibras poliméricas fabricadas e orientadas pela célula, que se estendem da superfície celular para formar uma matriz. Os primeiros organismos a colonizar a superfície são bactérias cocoídes que podem prontamente usar os nutrientes adsorvidos na superfície, e que formam o biofilme primário. Os colonizadores secundários são as bactérias filamentosas ou pedunculadas (Little, 1984).

3. Colonização por eucariontes unicelulares, como diatomáceas e cianobactérias.
4. Colonização por eucariontes multicelulares, como esporos de algas, larvas de cracas, briozoários, hidrozoários, poliquetas, entre outros, que dão início à fase macroscópica do processo. Um detalhe é que as larvas de cracas (cypris) não obrigatoriamente precisam da camada condicionante para assentar. Existem outros fatores, como sinalização química e processos hidrodinâmicos de microescala, que podem favorecer o seu assentamento (Railkin, 2004).

Apesar de não serem as mesmas espécies que colonizam no processo de bioincrustação, existe uma similaridade dos grupos que se sucedem no processo em todo o globo (Figura 1). O processo de sucessão em áreas tropicais é menos conhecido e estudado do que em áreas temperadas, onde há grande influência da sazonalidade. No Sudeste brasileiro, por exemplo, logo após a formação do biofilme, há a ocupação rápida por hidrozoários, algas filamentosas e algumas vezes poliquetas tubículas como os serpulídeos. Estes são organismos oportunistas e que possuem um ciclo de vida rápido. Após cerca de três meses começa um processo de ocupação por organismos de ciclo de vida mais longo, como cracas e briozoários. Estes começam com uma alta densidade que vai diminuindo à medida que vão sendo substituídos pelas espécies clímax, que podem ser o mexilhão *Perna perna* e/ou o hidrozoário *Bugula* sp.. Deve ser dada atenção especial em relação às cracas, pois não obrigatoriamente necessitam da presença do biofilme bacteriano para assentar. Além disso, ao se fixarem ao substrato, não apenas o utilizam como suporte, mas modificam a sua estrutura, provocando a corrosão (estruturas metálicas). Organismos que se fixam ou perfuram a superfície, como as cracas e os teredos, no caso de madeira, agregam um outro problema à bioincrustação, que é a destruição física da superfície à qual se fixam.



**Figura 1.** Esquema clássico de sucessão em uma comunidade bioincrustante. As linhas tracejadas mostram caminhos colaterais na sucessão; a linha dupla destaca a comunidade clímax. (Modificado de Railkin, 2004)

## 2

### A BIOINCRUSTAÇÃO COMO UM PROBLEMA: ESTRUTURAS SUBMERSAS FEITAS PELO HOMEM, NAVIOS, PLATAFORMAS

A bioincrustação é bem mais que um problema estético. Como as comunidades incrustantes se desenvolvem em estruturas construídas pelo homem e, com isso, afetam diretamente seu desempenho e integridade, o estudo dos organismos incrustantes envolve também interesses econômicos. Os prejuízos causados pelo crescimento desses organismos atingem as diversas indústrias que utilizam diretamente sistemas marinhos. Entre elas, em particular, as indústrias naval e petrolífera, a indústria da aquicultura, centrais nucleares, usinas de dessalinização e mais recentemente o setor de energias renováveis, com os geradores de energia de ondas e marés.

Para a indústria naval e *off-shore*, o crescimento da bioincrustação provoca danos em embarcações e plataformas de exploração de petróleo, pois aumenta o peso e diminui a fluidez, comprometendo o desempenho das estruturas, incluindo as boias de navegação (Figura 2). Em relação à navegação em si, o crescimento biológico torna irregular e rugosa a superfície dos cascos das embarcações, aumentando o arrasto e elevando consideravelmente os gastos com combustível, com sérias implicações para o aumento do aquecimento global (Hellio & Yebra, 2009).



**Figura 2.** Incrustações em embarcações e suas estruturas. Fotos: arquivo pessoal.

Na aquicultura, a bioincrustação afeta os equipamentos (como redes, gaiolas e lanternas), a infraestrutura (balsas e boias) e até mesmo o estoque, principalmente de bivalves (Figura 3).

As centrais nucleares normalmente estão localizadas em área costeiras e captam a água do mar diretamente do ambiente para o sistema de resfriamento. De modo geral, requerem em média  $3\text{m}^3$  de água de resfriamento por minuto para cada megawatt gerado. É comum o crescimento da bioincrustação principalmente no sistema de pré-condensação, onde entope os tubos condensadores e compromete a operação do sistema. As usinas de dessalinização de água também fazem captação de água do mar para o processo de osmose reversa que retira os sais através de uma membrana. O crescimento biológico nas membranas costuma ser expressivo e também compromete a operação do sistema (Figura 4).



**Figura 3.** Bioincrustação em estruturas utilizadas na aquicultura. Fonte: <http://wardaquafarms.com/img/research/netminder/Seaweed-on-cage.png>; [http://www.eco-sea.com/Ecosea/Aquaculture\\_files/28%20weeks\\_compressed\\_2.jpg](http://www.eco-sea.com/Ecosea/Aquaculture_files/28%20weeks_compressed_2.jpg).



**Figura 4.** Crescimento biológico em trocadores de calor (à esquerda, foto: <http://www.heatexchangeraia.co/tubular-heat-exchanger/thumb/tubular-heat-exchanger-in-india.jpg>) e membranas de osmose reversa (à direita, <http://heatxcoatings.com/fouling-shield/>).

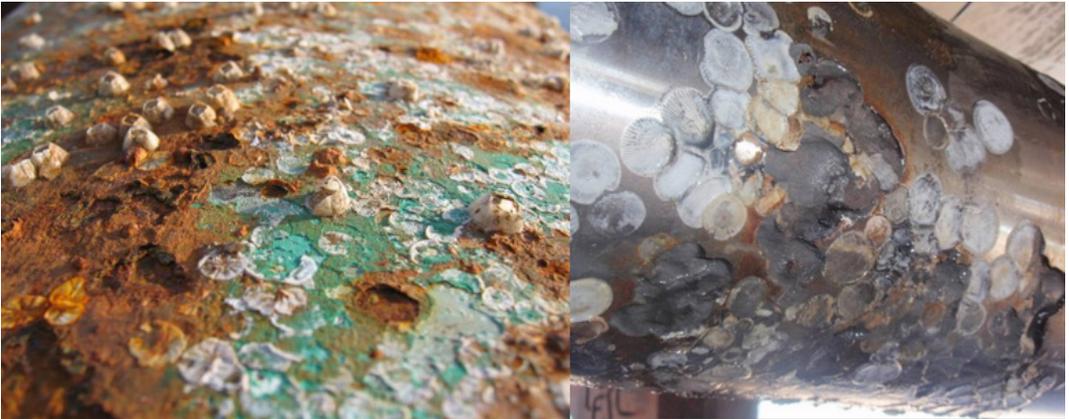
O setor de energias renováveis tem desenvolvido sistemas de geração de energia através de ondas, marés e correntes marinhas que requer a instalação de turbinas submersas, entre outras estruturas. A presença da bioincrustação nessas estruturas pode diminuir a eficiência da turbina em até 70% (Figura 5). Um dos pontos que encarecem o emprego dessa técnica é a necessidade de aplicação de revestimentos anti-incrustantes e um controle mais eficiente é o desafio desse setor (Sleiti, 2017).

Outro ponto em comum entre todos os setores é a utilização de materiais metálicos em suas estruturas. A corrosão é um processo espontâneo, de natureza eletroquímica, que causa a deterioração dos materiais metálicos por ação do ambiente. O ambiente marinho é um meio corrosivo especialmente agressivo, onde, além da salinidade, vários outros fatores interagem e agravam o problema, entre eles o crescimento da bioincrustação (Gentil, 2011). A influência da bioincrustação nos processos corrosivos se dá através de mudanças na interface metal/solução das superfícies metálicas, em decorrência da excreção e das atividades metabólicas dos orga-



**Figura 5.** Turbinas para a geração de energia das marés (à esquerda, foto: DTOcean, <http://www.DTOcean.eu>) e após o tempo de imersão, com incrustação de macroalgas (à direita).

nismos e pela formação de depósitos descontínuos sobre as superfícies. Com a presença da bioincrustação é possível encontrar uma condição de corrosão diferenciada e de danos muitas vezes imprevisíveis, que podem ser irreparáveis (Figura 6) e causar falhas graves de engenharia (Videla, 2003).



**Figura 6.** Corrosão em materiais metálicos claramente associada à fixação das cracas e ostras. © Rafal Konkolewski, Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5 license. <https://www.boats.com/how-to/are-barnacles-eating-my-propeller-shaft/>.

### 3 | METODOLOGIA DE ESTUDOS DA BIOINCRUSTAÇÃO

#### 3.1 COLETA E PRESERVAÇÃO DAS ESPÉCIES INCRUSTANTES EM NAVIOS, PLATAFORMAS, PÍERES ETC.

As múltiplas abordagens nesses substratos podem gerar, para o ramo da biotecnologia

marinha, informações básicas sobre a taxonomia, as relações ecológicas e genéticas das espécies, tais como a identidade molecular e/ou conectividade de populações. O tipo de ambiente artificial (pilares, navios, boias e plataformas) interfere diretamente na escolha do método e a triagem do material pode ser realizada no próprio local – *in situ* – ou as amostras podem ser anestesiadas e posteriormente triadas no laboratório. Dependendo do objetivo, as coletas podem ser pontuais, de cunho apenas exploratório em locais nunca amostrados previamente, ou buscando espécies-alvo que estão intimamente relacionadas com o conhecimento pretérito da biota marinha. Por um lado, se a localidade é bem conhecida, o objetivo é buscar respostas sobre as relações ecológicas ou de impactos causados por contaminação, por exemplo, em que há necessidade de um método mais detalhado e sazonal. Qual seja o objetivo, o reconhecimento da biota marinha incrustante e suas relações vem sendo uma ferramenta imprescindível para o entendimento dos padrões e processos da ecologia das comunidades de substrato artificial, auxiliando em estudos de bioinvasão e biogeografia.



**Figura 7.** A. Pilar de concreto cilíndrico encontrado na Marina dos Pescadores no cais da Pesca na área portuária em Arraial do Cabo, RJ; B. Mergulhador realizando amostragem subaquática nos pilares. Fotos: Áthila Bertoncini.

Os métodos de amostragem em substratos artificiais são adaptações dos utilizados em outros substratos duros, como os costões rochosos e recifes de corais. Para alcançar e amostrar pilares ou molhes, o mergulho livre (apneia) e/ou autônomo garante uma melhor amostragem e precisão do ambiente estudado (Figura 7). As ferramentas aliadas às técnicas experimentais dependem do objetivo do estudo. O método de amostragem utilizando um quadrado ao longo de transecto é o mais utilizado. São necessários uma trena e um quadrado, ambos de tamanho conhecido, relacionado com o tamanho da área amostral. A amostragem pode ser destrutiva – retirando toda a comunidade encontrada dentro do quadrado através de raspagem – ou não. As técnicas não-destrutivas apenas quantificam de maneira visual ou por captura de imagem a biomassa dos organismos da comunidade incrustante. O uso de imagens – por fotos ou vídeos – tem sido um aliado em estudos de bioincrustação, pois, além de ser importante para a identificação de espécies em alguns grupos taxonômicos cujos caracteres morfológicos se modificam após

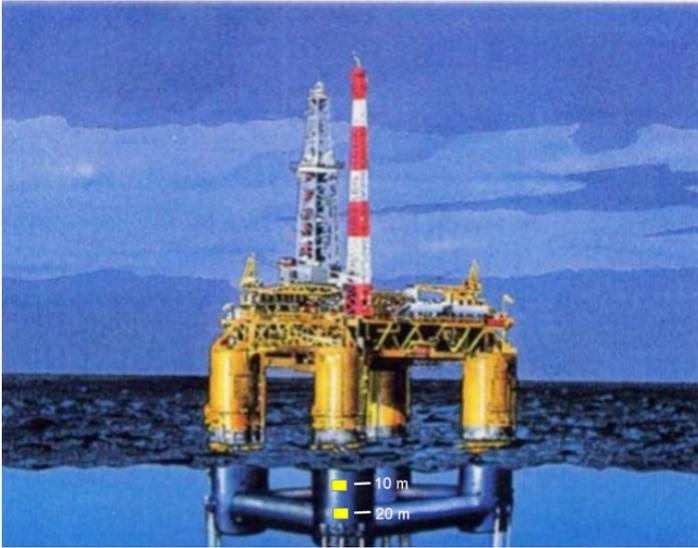
a fixação do material, também reduz o tempo de trabalho do pesquisador-mergulhador debaixo d'água. No entanto, há a necessidade de se conhecer antecipadamente a fauna e flora do entorno ou coletar de maneira pontual as espécies para que consiga identificar de maneira precisa até o menor nível taxonômico possível.

A amostragem em navios e plataformas é uma atividade desafiadora, uma vez que exige a atuação de mergulhadores experientes em campo ou a espera da docagem dessas embarcações. A técnica mais comum é a de quadrado destrutiva, em que o pesquisador, além de quantificar a porcentagem de cobertura das espécies encontradas, raspa com espátula todo o material biológico no quadrado em diferentes áreas do casco da embarcação – linha d'água ou zona submersa – de maneira muito semelhante às faixas do entremarés e infralitoral dos costões rochosos (Coutinho, 1995; Ferreira et al., 2004). Uma amostragem qualitativa também se faz necessária quando o pesquisador observa a ocorrência, mesmo que rara, de espécies que não tenham sido consideradas no estudo quantitativo. Um indivíduo ou um pedaço da colônia é suficiente para posterior análise do especialista. A avaliação da bioincrustação em plataformas de petróleo também pode ser realizada através da análise de vídeo ou a partir da coleta e observação direta no campo.

No caso da análise através de vídeo de plataformas em águas rasas, dois mergulhadores podem percorrer um transecto desde a superfície até a maior profundidade possível das pernas, para filmagem da bioincrustação. É muito importante que as imagens apresentem excelente qualidade para facilitar a posterior identificação das espécies. No caso de plataformas localizadas em águas expostas, recomenda-se o uso de um veículo submarino operado remotamente, já que não há possibilidade de mergulho devido às condições ambientais. É sempre recomendado que as imagens de todos os táxons detectados nos diferentes vídeos sejam identificadas individualmente por um código do filme de origem. Uma vez coletados, os espécimes marinhos devem ser identificados por taxonomistas de cada grupo encontrado na amostra.

Vale comentar que, na maior parte das vezes, a riqueza de espécies registrada em cada plataforma é subestimada, devido à dificuldade de chegar ao menor nível específico em certos grupos taxonômicos utilizando apenas imagens, principalmente em relação aos representantes dos filos Porifera e Chordata (Ascidiacea). As espécies desses grupos taxonômicos são distinguidas a partir da observação da morfologia externa, mas principalmente pela análise de espículas e/ou histológica (morfologia interna). Assim, é muito importante a coleta do material biológico para se ter certeza da composição das espécies que ocorrem em cada plataforma.

A realização de raspagens nas plataformas em profundidades distintas é o método ideal para o posterior acompanhamento da sucessão ecológica. Para tal, os mergulhadores devem primeiramente escolher a área de amostragem para fazer a marcação permanente, em cada profundidade. Em seguida, os quadrados são posicionados sobre o substrato para iniciar a remoção dos organismos, com auxílio de espátula e marreta. Enquanto um mergulhador remove a incrustação da área limitada pelo quadrado, o outro deve ser responsável pelo acondicionamento do material biológico no samburá. É sempre recomendável realizar uma triplicata de raspagem numa das plataformas de cada "subárea" de amostragem. Nesse caso, as amostras devem ser realizadas em outras duas "pernas" da plataforma posicionadas na mesma direção (Figura 8).



**Figura 8.** Desenho amostral da área de raspagem na “perna” da plataforma (em amarelo), em duas profundidades distintas (exemplo: 10 e 20m). No caso da triplicata, as raspagens devem ser feitas em outras duas “pernas” voltadas para a mesma posição geográfica. Fonte: Modificado de <http://petrogasenaval.blogspot.com>.

Após a obtenção dos dados ou coleta dos organismos que foram foco do estudo, a triagem ou separação dos organismos pode ser feita em grandes grupos taxonômicos ou por grupos morfofuncionais (Figura 9).



**Figura 9.** Organismos coletados em casco de navio e triados por grupos taxonômicos. Foto: J.C. Monteiro.

Uma vez triados com auxílio de uma lupa binocular, faz-se o registro, preservação e conservação dos exemplares que são procedimentos padrões que permitirão que o exemplar armazenado e conservado seja posteriormente estudado e analisado com todas as características imprescindíveis para sua identificação, ou que qualquer outra análise pertinente possa ser realizada. A preparação do material biológico para armazenamento inclui duas etapas: anestesia e fixação. A anestesia pode ser realizada ainda no campo, onde pode ser utilizado o cloreto de magnésio ou mentol por algumas horas, dependendo do grupo taxonômico coletado. Já na etapa de fixação o material é colocado em frascos de vidro ou plástico com formol (aldeído fórmico)

ou álcool etílico em concentrações conhecidas para cada grupo taxonômico em questão. De maneira geral, os organismos devem ser depositados numa coleção científica, e sendo assim, precisam ser identificados e tombados de acordo com a instituição de pesquisa a que se destinam. Geralmente, o material é etiquetado com os dados de coleta (data, coletor, local, tipo de substrato e coordenadas geográficas) e, para evitar a perda precoce do material fixante, os frascos são vedados com parafilm – um tipo de “capa” que envolve o frasco e reduz a evaporação do conservante (Figura 10).



**Figura 10.** A. Frasco de vidro com o exemplar em material conservante, etiquetado e com o parafilm; B. Material com número de tombo e depositado na coleção científica do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira. Foto: L. V. Granthom Costa.

Atualmente, o material biológico coletado em campo também pode ter finalidade para análises moleculares (Figura 11) ou testes para avaliação de compostos com atividade biológica. Para o armazenamento do material genético, primeiramente se faz necessário o uso de anestésico, em alguns grupos taxonômicos, tais como as ascídias, por algumas horas antes da fixação em álcool etílico absoluto ou etanol em altas concentrações, e são realizados os mesmos procedimentos de etiquetagem e tombamento. Já os organismos separados para avaliação de compostos ativos, OS MESMOS são mantidos frescos ou são congelados para posterior análise.

### 3.2 MONITORAMENTO DA BIOINCRUSTAÇÃO

O acompanhamento sistemático das respostas da bioincrustação tem sido uma importante ferramenta de avaliação de alterações ambientais, já que esses organismos não conseguem “fugir” de condições adversas, por estarem fixos ao substrato. Dessa forma, a distribuição e a abundância dos organismos incrustantes são fortemente influenciadas por fatores abióticos, tais como batimento de ondas, turbidez, variação de temperatura e salinidade (Coutinho & Zalmon, 2009). Esses parâmetros físicos podem variar no tempo e espaço, devido à ocorrência de fatores naturais e/ou antropogênicos, e os organismos reagem a esses estímulos de formas diferenciadas. As interações biológicas (e.g. herbivoria, predação, competição) estabelecidas pela complexa teia trófica também influenciam a distribuição da flora e fauna nos substratos



**Figura 11.** Tubos de Eppendorf plásticos estéreis com material biológico em conservante e etiquetado para análises moleculares, depositados na coleção do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira. Foto: L. V. Granthom Costa.

consolidados, sejam naturais ou artificiais, onde disputam intensamente por alimento e espaço. Embora esses fatores naturais causem mudanças espaço-temporais nas estruturas das comunidades macrobentônicas (Borthagary et al., 2009), os estresses induzidos pelas atividades antropogênicas são os principais responsáveis pela perda da biodiversidade nos ambientes naturais. A construção de casas e deques, as atividades portuárias, a introdução de espécies exóticas e o despejo de poluição urbana representam algumas das ameaças à biota que vive na área costeira.

Alguns ambientes urbanos desprovidos de substratos naturais podem utilizar a resposta da bioincrustação que ocorre, por exemplo, em pilares de deques, para detectar algum impacto ambiental. Há outros casos em que programas de monitoramento têm sido criados no âmbito da gestão ambiental de portos, por exemplo, em atendimento às recomendações e medidas mitigadoras apresentadas no Estudo de Impacto Ambiental do empreendimento e condicionantes do licenciamento ambiental realizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Nesses dois casos são usados estudos descritivos da bioincrustação, como ferramenta de monitoramento. O monitoramento da incrustação biológica pode ser realizado a partir do momento em que uma estrutura é submergida na água, para avaliação desde a fase inicial da sucessão ecológica, quando há a formação do biofilme microbiano. Esse tipo de estudo pode ser uma importante ferramenta, por exemplo, de avaliação da ação de uma tinta anti-incrustante para a indústria naval.

As amostragens devem ser realizadas periodicamente, através de mergulho autônomo, em diferentes pontos de coleta previamente selecionados. A dominância das espécies que ocorrem nas estruturas artificiais deve ser calculada em cada ponto, através de foto-quadrados utilizando câmera digital de alta resolução acoplada a uma caixa estanque. Nesse caso, as fotografias podem ser analisadas através do *software* Coral Point Count with Excel (CPCe 5.1)(Kohler & Gill, 2006). Outra alternativa é o mergulhador realizar a contagem diretamente no campo, utilizando apenas uma prancheta de PVC para anotar os dados numa planilha. Em ambos os casos, os quadrados devem ser distribuídos aleatoriamente ao longo de um transecto, em diferentes profundidades. A quantidade de quadrados e o seu tamanho devem ser estabelecidos em cada caso, a depender da área de amostragem. O tamanho do transecto e a profun-

didade de amostragem também devem ser escolhidos de acordo com o local e objetivos do estudo. Os mergulhos devem ser realizados durante a maré alta, tantas vezes quanto for necessário para examinar todo o substrato recoberto pela biota marinha nas áreas delimitadas para estudo. Uma vez detectada uma espécie desconhecida, o local de seu aparecimento é marcado por GPS, com apoio de um terceiro pesquisador na superfície. Posteriormente, o organismo em questão é coletado com auxílio de espátulas e facas de mergulho, armazenado em sacos tipo *zipbag* ou frascos plásticos, fixado com formalina a 10% e enviado para especialistas, visando a sua identificação.

As mudanças populacionais da macroincrustação podem ser mensuradas através das variações na abundância da espécie entre locais (e.g. pilar de um deque e um costão natural adjacente). No entanto, a abordagem mais frequente em estudos ambientais é a avaliação da resposta conjunta da comunidade bentônica (Terlizzi et al., 2007). Normalmente, o estudo de comunidades envolve identificar e quantificar todas as espécies ou os grandes grupos taxonômicos (filos, ordens, famílias) presentes no ecossistema. As respostas das comunidades são examinadas através da comparação de índices biológicos, tais como riqueza de espécie, diversidade de Shannon-Wiener e a equitabilidade de Pielou, em que os menores valores desses descritores encontram-se relacionados aos maiores níveis de estresse ambiental (Jonhston & Roberts, 2009). Tais descritores são comparados a partir de análises estatísticas univariadas, que podem ser realizadas no programa R (Ihaka & Gentleman, 1993) ou no programa Statistic (Statsoft, 2005).

Há também representações gráficas que podem ser usadas para caracterizar a qualidade ambiental de um ecossistema através da análise da bioincrustação. Por exemplo, a curva de dominância-K, que utiliza o ranqueamento cumulativo da abundância das espécies (eixo y) contra o rank log das espécies (eixo x), pode indicar uma comunidade com baixa diversidade de espécies se a curva for acentuada e curta. Existem ainda técnicas estatísticas multivariadas que determinam o quanto as estações amostradas estão proximamente relacionadas em sua composição de espécies. Por exemplo, a Análise de Agrupamento é utilizada para verificar a formação de grupos de espécies ou de estações dentro ou entre comunidades, através da construção gráfica de um dendograma. Já o Escalonamento Multidimensional Não Métrico (n-MDS) ordena os pontos em duas ou mais dimensões para representar espacialmente as amostras. Quanto menor for a distância entre os pontos no espaço, maior é a similaridade entre as estações em termos de abundância de espécies. Há vários outros tipos de metodologias, representações gráficas e interpretações dos dados que são usados para avaliar impactos através do estudo descritivo da bioincrustação (Quintino et al., 2006; Borja & Dauer, 2008).

## 4

## A BIOINCRUSTAÇÃO COMO VETOR DE ESPÉCIES EXÓTICAS EM NAVIOS E PLATAFORMAS

A introdução de espécies aquáticas invasivas em novos ambientes foi identificada como uma grande ameaça para os oceanos do mundo e para a conservação da biodiversidade.

O processo de bioinvasão pode ser definido como a chegada, estabelecimento e difusão de uma espécie em uma área onde antes não existia (Carlton, 1987). Esse fenômeno tem recebido especial atenção de pesquisadores e ecólogos nos últimos anos, devido ao aumento evidente na taxa de espécies exóticas invasoras e seus efeitos nas populações nativas e comunidades, no funcionamento dos ecossistemas e até mesmo na economia e na saúde humana (Ruiz et al., 2000).

Esse processo de transferência de espécies envolve múltiplos vetores. Os principais são o transporte de espécies pela bioincrustação em cascos de navios e em tanques de água de lastro, mas também a aquacultura e a aquariofilia, em menor escala, devem ser considerados (Williams et al., 2013). Assim, o transporte marítimo, seja interoceânico ou ao longo da costa, tornou-se vetor de introdução de espécies fora de sua distribuição original.

Regiões portuárias são reconhecidamente doadoras de espécies não nativas (Carlton, 1996). Na costa brasileira, essas áreas estão localizadas em ambientes protegidos e/ou confinados, principalmente nas baías. São caracterizadas por apresentar estruturas geralmente sustentadas por pilares (de ferro, madeira ou concreto) para atracação das embarcações, que podem ser de pequeno ou grande porte, além de boias de sinalização e molhes de granito. Todos esses tipos de substrato, com diferentes materiais, são excelentes espaços para a fixação e recrutamento de propágulos e larvas de espécies incrustantes, cuja composição específica está diretamente relacionada com a comunidade encontrada nos costões rochosos do entorno. Não apenas isso, mas os navios e plataformas que atracam em áreas de porto são reconhecidamente "ecossistemas flutuantes" que podem também alterar e modificar a composição nos substratos artificiais e na dinâmica local, evidenciando a importância e a real necessidade de se estabelecer métodos específicos para os diferentes tipos de substratos.

A crescente globalização e o aumento do comércio internacional contribuem para agravar o problema (Figura 12). Atualmente, 80% dos produtos comercializados no mundo são transportados por meios marítimos. Além disso, há os estaleiros, bases navais, terminais marítimos e campos de exploração de petróleo, que concentram grande uso de embarcações em suas atividades.

Um grande número de espécies marinhas, transportadas tanto na água de lastro como nos cascos dos navios, podem sobreviver para estabelecer uma população reprodutiva no ambiente do hospedeiro, tornando-se espécies nativas invasoras e fora de competição e multiplicando-se em proporções de pragas. O problema das espécies invasoras transportadas por navios se intensificou nas últimas décadas, devido à expansão do comércio e do volume de tráfego, e uma vez que os volumes de comércio marítimo continuam a aumentar, o problema ainda não atingiu seu pico. Os efeitos em muitas áreas do mundo têm sido devastadores. Os dados quantitativos mostram que as bioinvasões continuam a aumentar a uma taxa alarmante e novas áreas estão sendo invadidas constantemente. A propagação de espécies invasoras é agora reconhecida como uma das maiores ameaças ao equilíbrio ecológico e econômico do planeta. Essas espécies estão causando enormes danos à biodiversidade e às valiosas riquezas naturais da Terra, das quais dependemos. Os efeitos diretos e indiretos sobre a saúde estão se tornando cada vez mais sérios e os danos ao meio ambiente são muitas vezes irreversíveis. Além disso, ocorre um impacto econômico significativo nas indústrias que dependem do meio



**Figura 12.** Mapa global ilustrando as rotas de navegação ao redor do mundo (<http://www.shipmap.org>).

ambiente costeiro e marinho, como o turismo, a aquicultura e a pesca, além de danos dispendiosos à infraestrutura.

De uma forma ou de outra, espécies trazidas de outros lugares do mundo, após um primeiro evento reprodutivo, podem liberar larvas competentes a se fixar e se desenvolver no ambiente natural, muitas vezes utilizando os substratos artificiais como “acesso” (*stepping stones*). Se os fatores abióticos não forem limitantes, a dinâmica dos fatores bióticos (como competição e predação) irá determinar o sucesso ou não da espécie naquele ambiente. As definições sobre o que é uma espécie introduzida refletem vários contextos diferenciados. Um informe do Ministério do Meio Ambiente do Brasil sugere as seguintes definições (Lopes, 2009):

Espécie exótica é aquela registrada fora de sua área de distribuição original, em contraste com a nativa que vive em sua região de origem. São quatro categorias de espécies exóticas:

- **Contida** – quando presente em ambiente artificial controlado.
- **Detectada em ambiente natural** – sem aumento posterior de sua abundância e/ou de sua dispersão, caracterizando um registro isolado.
- **Estabelecida** – quando a espécie introduzida é detectada de forma recorrente, com ciclo de vida completo na natureza e mostrando indícios de aumento populacional ao longo do tempo, em uma região restrita ou ampla, porém sem apresentar impactos ecológicos ou socioeconômicos aparentes.
- **Invasora** – quando a espécie estabelecida causa impactos mensuráveis em atividades so-

cioeconômicas ou na saúde humana, bem como a diminuição da diversidade.

Existem casos emblemáticos de bioinvasão no mundo, extensamente documentados, como os casos do mexilhão-zebra (*Dreissena polymorpha*) nos Grandes Lagos – Estados Unidos, da alga *Caulerpa taxifolia* no Mar Mediterrâneo, da ascídia *Didemnum vexillum* na Nova Zelândia (Locke & Hanson, 2009). Na costa brasileira, um exemplo de invasão em ambiente limnético bem conhecido é o caso de *Limnoperna fortunei* Dunker, 1847 (mexilhão-dourado), que, oriundo da China e Sudeste da Ásia, invadiu Hong Kong, Japão e Taiwan e foi introduzido no Rio da Prata, na Argentina e nas Américas. No Brasil, o primeiro registro foi publicado por Mansur et al. (1999) para as ocorrências no Rio Guaíba e no porto de Pombas, município de Viamão, RS. Ainda na década de 1990, o bivalve foi encontrado na região portuária de Porto Alegre, e pouco tempo depois a distribuição aumentou, chegando a Foz do Iguaçu, onde causou diversos problemas na Usina de Itaipu. Outro exemplo mais recente de invasão é a dos corais do gênero *Tubastraea*, o coral-sol, cuja distribuição vem aumentando ao longo da costa brasileira. Acredita-se que esse coral tenha sido introduzido no Brasil por volta da década de 80 no Rio de Janeiro (Castro & Pires, 2001). Posteriormente, as espécies foram registradas em substratos naturais e artificiais nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Bahia, Espírito Santo e Ceará (Creed et al., 2017) (Figura 13).



**Figura 13.** Duas espécies invasoras na costa brasileira: mexilhão-dourado (à esquerda, foto: arquivo pessoal) e o coral-sol (à direita, foto: Fabian Messano).

A presença de espécies exóticas numa região é sempre vista como uma grande ameaça para a biodiversidade, pois pode causar a extinção ou retração de uma ou mais espécies nativas de uma área ou comunidade. As lacunas no conhecimento sobre a distribuição das espécies nativas e sobre a ocorrência e entrada de espécies exóticas no ambiente natural dificulta a quantificação de impactos, as ações preventivas e a definição de estratégias de controle para os problemas de bioinvasão no âmbito regional e nacional.

Em relação à quantificação dos impactos causados, uma revisão recente sugere que o gerenciamento das bioinvasões no meio marinho leve em consideração os seguintes critérios para quantificação dos impactos causados pela dispersão de espécies marinhas exóticas (Ojaveer et al., 2015).

- **Impactos ambientais:** impactos da espécie nas características físicas e biológicas dos ecossistemas. Exemplos: impactos no hábitat, biodiversidade, interações tróficas.
- **Impacto econômicos:** impactos que causem perda econômica, como nos recursos pesqueiros e na infraestrutura comercial. Exemplos: áreas portuárias, geração de energia de ondas e marés, usinas de dessalinização.
- **Impactos sociais e culturais:** impactos nas espécies de valor icônico ou espiritual, incluindo impactos em locais que tenham identidade regional ou nacional.
- **Impactos na saúde humana:** impactos na saúde e segurança da população da área e grupos socioeconômicos relacionados.

A escassez de estudos sobre quantificação de impactos de espécies exóticas nos ecossistemas marinhos do mundo inteiro e todas as consequências socioeconômicas associadas é o maior desafio para o entendimento mais amplo da questão da bioinvasão. Não existem ainda medidas globais padronizadas para a prevenção e controle da introdução de espécies através do transporte de incrustações em cascos de embarcações. Entre as várias iniciativas, vale ressaltar a criação do Programa Global de Gerenciamento de Água de Lastro (GloBallast), que trata apenas das questões relacionadas especificamente a este vetor (Silva & Barros, 2011).

Em virtude dos casos de bioinvasão claramente relacionados à transferência de bioincrustação, a IMO adotou em 15 de julho de 2011 o Anexo 26 da Resolução MEPC.207(62), que trata das orientações para o controle e gestão da bioincrustação em navios (IMO, 2011). O documento inclui novas diretrizes para o manejo da questão e sugere a implementação de práticas de gestão da bioincrustação, incluindo a utilização de sistemas anti-incrustantes e outras práticas de gestão operacional para reduzir o desenvolvimento dos incrustantes. Como perspectivas futuras estão incluídos na recomendação: o monitoramento e detecção da bioincrustação com equipamentos de bordo; a definição de métodos para avaliar os riscos associados à limpeza das embarcações, com atenção e cuidados em relação ao risco de bioinvasão; a definição da distribuição geográfica das espécies aquáticas invasoras incrustantes, e uma resposta rápida ao problema, incluindo ferramentas de diagnóstico e métodos de erradicação. Mais recentemente, a IMO estabeleceu um programa semelhante ao Globallast, o Glofouling que trata da bioinvasão por cascos de navios.

## 5

### **ESTRATÉGICAS DE CONTROLE DA BIOINCRUSTAÇÃO USANDO A BIOTECNOLOGIA MARINHA**

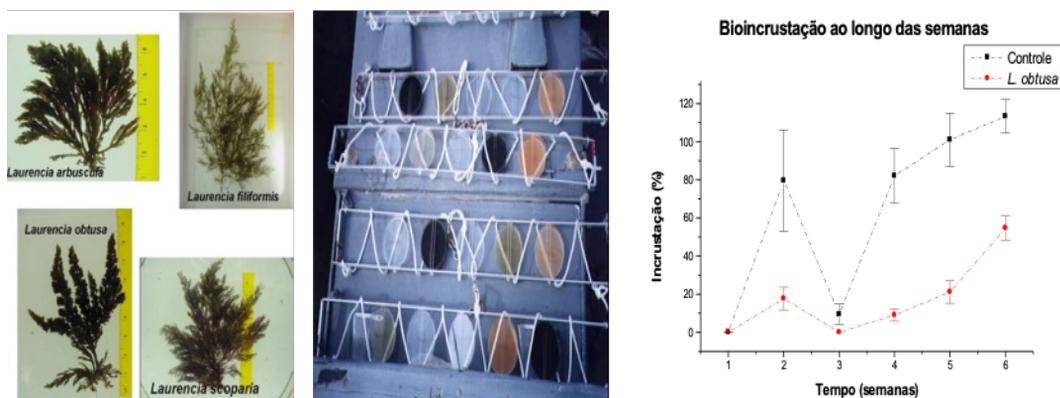
As soluções anti-incrustantes nas estruturas submersas devem levar em consideração as características das embarcações e estruturas, a obrigatoriedade ou não do uso, a periodi-

cidade entre as manutenções e a otimização de custos operacionais e de manutenção. Atualmente, os revestimentos utilizados para evitar a bioincrustação são necessariamente associados ao uso de tintas anti-incrustantes, pois são à base de cobre e não podem ser aplicados diretamente às superfícies metálicas. A pouca eficiência da atual geração de revestimentos comerciais, comparada com a geração anterior, encorajou a busca por soluções alternativas, como uso de produtos naturais marinhos, e promoveu uma interface entre a tecnologia anti-incrustante e a biotecnologia marinha.

Embora a proibição de TBT (“Tributyltin” – tributil-estanho) como anti-incrustante tenha sido saudada por ecologistas, ainda não existe uma alternativa ecologicamente segura que seja satisfatória para a sua substituição. Muitas frotas estão voltando ao uso de pinturas com cobre e zinco, que não são tão efetivas quanto o TBT e são tóxicas para muitas formas de vida marinha, sendo proibidas em várias partes do mundo. O retorno para esses metais pesados é uma estratégia provisória até que sejam desenvolvidas e avaliadas alternativas melhores. Um caminho a ser perseguido na busca de compostos anti-incrustantes seguros é observar os organismos marinhos e tentar descobrir como eles conseguem superar os problemas de incrustação. Isso tem levado a uma série de descobertas interessantes com potencial de aplicação industrial. Produtos naturais com propriedades anti-incrustantes têm sido identificados a partir de espécies de algas marinhas, esponjas, corais moles e outras. A maioria dos organismos pesquisados é sésil e a incrustação sobre eles teria um impacto negativo sobre o seu desenvolvimento. Há uma clara vantagem adaptativa que confere aos organismos a capacidade de produzir substâncias naturais para a redução da incrustação. As substâncias anti-incrustantes isoladas de organismos marinhos são avaliadas através de bioensaios que determinam a sua eficiência em inibir a fixação dos organismos incrustantes. Apesar de os resultados sugerirem que esses compostos podem ter relevância em aplicações comerciais anti-incrustantes (cracas estão entre os organismos incrustantes mais prejudiciais), persistem algumas dúvidas sobre a sua utilidade total, devido à maneira típica em que progride a bioincrustação, em sequências sucessionais que ocorrem ao longo do tempo nas superfícies de materiais estruturais diversos.

Diante dos inúmeros impactos negativos para a biota aquática causados pelos biocidas utilizados pelas indústrias, pesquisadores passaram a procurar compostos menos agressivos ao meio ambiente e mais eficientes. Nesse sentido, iniciou-se uma gama de estudos na área de bioprospecção marinha, com o intuito de procurar substâncias produzidas pelos próprios organismos, capazes de combater a bioincrustação. Esses compostos podem agir enzimaticamente, dissolvendo os tecidos de adesão das larvas na sua fase de fixação no substrato, interferindo no metabolismo da bioincrustação (por exemplo, interferência na via nervosa), inibindo a fixação, metamorfose ou crescimento, promovendo a quimiotaxia negativa, alterando a superfície dos organismos como repelentes, ou, finalmente, atuando como biocidas (Yebra et al., 2004). Há dois fortes argumentos defendidos pelos cientistas para investirem nesta nova área: os produtos naturais produzidos pelos organismos marinhos são menos danosos ao meio ambiente, comparados a substâncias de origem antropogênica, pois degradam mais rapidamente (uma vez que já existe a via de degradação no ambiente); e o seu efeito anti-incrustante não atua pela toxicidade (na maioria dos casos), mas pela repelência às larvas (Da Gama et al., 2009).

O primeiro passo foi desenvolver técnicas para a extração dessas substâncias e testá-las para verificar sua eficácia anti-incrustante. A partir de seu desenvolvimento, inúmeros experimentos de campo e de laboratório comprovaram a atividade anti-incrustante em uma enorme gama de invertebrados e macroalgas. No Brasil, por exemplo, experimentos com extratos de algas vermelhas do gênero *Laurencia* evidenciaram a presença de substâncias biocidas, evitando a fixação da bioincrustação em mais de seis semanas de submersão (Figura 14) (Pereira et al., 2003). Mais de 500 diferentes tipos de terpenos com atividade potencial anti-incrustante já foram identificados somente em algas do gênero *Laurencia* (Hay, 1996).



**Figura 14.** Testes de campo com extrato da alga do gênero *Laurencia*.

O segundo passo foi isolar as potenciais moléculas com atividades anti-incrustantes, identificá-las e testá-las em laboratório quanto à sua capacidade de evitar o assentamento de larvas de invertebrados.

Uma segunda linha de pesquisa desenvolvida no combate à bioincrustação foi a utilização de compostos de bactérias para impedir o desenvolvimento do biofilme. Atualmente, já foram descobertas inúmeras moléculas bioativas isoladas de macro-organismos capazes de evitar a bioincrustação. A elucidação sobre a comunicação de micro-organismos, chamada de *quorum sensing* (QS), foi recentemente proposta como potencial ferramenta para controlar a incrustação biológica (Dobretsov et al., 2009).

*Quorum sensing* é um sistema complexo de comunicação celular, comum em bactérias Gram-negativas, cuja sinalização ocorre através de um sinal molecular. Quando a concentração das moléculas é suficientemente elevada, inicia-se uma sinalização celular em que a gene alvo ou genes são ativados ou reprimidos. O sistema de comunicação microbiana QS coordena diversos processos na sobrevivência de micro-organismos, tais como a expressão de fatores de virulência e a formação de biofilme (Dobretsov et al., 2009). O biofilme microbiano aumenta ou inibe, na maioria dos casos, a fixação de larvas e esporos de macroincrustantes; dessa forma, a descoberta de compostos inibidores da comunicação bacteriana QS poderá fornecer uma estratégia para prevenir a incrustação biológica. Na costa brasileira, estudos têm sido realizados para prospectar compostos capazes de inibir a comunicação bacteriana (QS) de *Chromobacte-*

*rium violaceum* CV017, *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 e *Pseudomonas aeruginosa* PA01, para potencial aplicação em tintas anti-incrustantes “ambientalmente corretas” (Batista et al., 2014; 2018; Carvalho et al., 2016). Nestes testes feitos com bactérias presentes em espécies de macroalgas, que vivem numa peculiar área de ressurgência do Atlântico Sul Ocidental, mostraram que mais de 70% dos extratos inibiram eficientemente a comunicação bacteriana de QS e a formação de biofilme em bioensaios de laboratório (Batista et al., 2014; Carvalho et al., 2016). Os extratos de metanol das esponjas *Darwinella* sp., *Dysidea etheria*, *Hymeniacidon heliophila* e *Tedania ignis* da região de Arraial do Cabo (RJ) também foram os mais eficientes inibidores da comunicação QS (Batista et al., 2018). Considerando que mais de 40% da biomassa de uma esponja é composta por microssimbiontes, um único indivíduo pode representar uma relevante fonte de compostos bioativos de alto potencial comercial. Diferentemente dos macro-organismos, os micro-organismos podem ser facilmente modificados genética e quimicamente de modo a aumentar o rendimento dos compostos e sua bioatividade, além de serem cultiváveis em condições de laboratório. Outra vantagem dos micro-organismos é sua capacidade de produzir compostos mais rapidamente e em maiores quantidades em comparação a outros organismos marinhos. Assim, têm sido de grande relevância o isolamento e o cultivo dos microssimbiontes associados a espécies de invertebrados marinhos, para prospecção de compostos inibidores de QS com potencial aplicabilidade em tintas anti-incrustantes.

Dentro da área da biotecnologia marinha, uma das técnicas anti-incrustantes mais recentemente estudadas consiste em materiais que simulam superfícies de organismos marinhos, denominados “superfícies biomiméticas”. Pesquisadores têm analisado a microtopografia da superfície de carapaças e peles de diversos organismos (desde mexilhões até tubarões e tartarugas), com o intuito de elucidar os mecanismos pelos quais essas superfícies permanecem livres de epibiose. Através dos avanços recentes no campo da nanotecnologia, seria possível reproduzir essas microtopografias em materiais sintéticos produzidos em larga escala para o revestimento, por exemplo, dos cascos de embarcações (Da Gama et al., 2009).

Os diversos estudos na área da biotecnologia marinha em busca da solução dos problemas da bioincrustação ainda carecem de pesquisas para descobrir moléculas análogas às detectadas em organismos marinhos com atividades anti-incrustantes. Pesquisas paralelas também têm que ser aprofundadas na procura de compostos similares que tenham o mesmo potencial anti-incrustante. Dessa forma, a produção de biocidas não dependeria da produção em larga escala de organismos marinhos.

Por fim, a falta de recursos e co-participação das empresas também se mostra como um grande gargalo para o desenvolvimento mais rápido dos testes de toxicidade dessas novas formulações, proporcionando a liberação pelos órgãos legais para seu uso em futuras matrizes de tintas anti-incrustantes.

## 6

### **PREVENÇÃO, ERRADICAÇÃO E CONTROLE DA BIOINVASÃO POR BIOINCRUSTAÇÃO USANDO BIOTECNOLOGIA MARINHA**

Muitos trabalhos demonstram que em substratos artificiais, mesmo que próximos a áreas naturais, há predomínio de espécies invasoras ou crípticas que nem sempre estão presentes em locais próximos, mas que podem aumentar sua área de dispersão a partir daquele ponto. Normalmente, uma espécie invasora coloniza os substratos artificiais como áreas de píeres e molhes e depois colonizam substratos naturais, indicando que os substratos artificiais servem como foco de expansão das espécies invasoras.

Assim, a eficácia da prevenção, erradicação e controle da bioinvasão por bioincrustação numa região vai depender do tempo decorrido desde a invasão e do estágio de desenvolvimento, estabelecimento e distribuição da espécie, e das medidas a serem tomadas para sua redução.

O uso da biotecnologia marinha oferece algumas alternativas potenciais para o controle do processo de invasão. Abaixo são apresentadas algumas dessas possibilidades dentro dos vários estágios da bioinvasão.

## 6.1 PREVENÇÃO E CONTROLE

Há unanimidade entre os cientistas em considerar que a prevenção é a melhor forma de controlar a bioinvasão. O monitoramento repetido realizado nos locais de chegada de espécies invasoras, como regiões portuárias, é o principal requisito para a detecção precoce de espécies invasoras usando métodos tradicionais, e envolve a coleta de amostras físicas, triagem e identificação para compreender a biota residente e identificar as espécies invasoras. Esses métodos normalmente exigem a atuação de especialistas taxonômicos especializados, treinados para identificar as espécies. Como a rápida e precisa identificação das espécies é essencial para detecção precoce e manejo desses organismos, têm sido desenvolvidas ferramentas moleculares sensíveis e precisas para identificação das espécies. Dessa forma, o uso de ferramentas moleculares para monitoramento ecológico se faz necessário, permitindo o acesso à diversidade e mudanças ecológicas de forma mais completa, rápida e com melhor custo-benefício.

À medida que o uso de técnicas de biologia molecular se torna generalizado, o uso de técnicas baseadas em DNA para discriminar entre espécies, devido à capacidade desses métodos para detectar diferenças genéticas sutis, oferece uma excelente alternativa para a detecção de espécies invasoras. O DNA é relativamente estável e pode ser facilmente isolado, por sofrer taxas de evolução relativamente rápidas. As mitocôndrias são geralmente herdadas maternamente, tornando-se particularmente úteis como um marcador específico da espécie para a determinação de relações filogenéticas entre elas, por exemplo. A identificação de diferentes cepas – por exemplo, variantes da população – tem implicações importantes para a compreensão da origem geográfica e dos padrões de propagação de espécies invasoras marinhas, proporcionando potencialmente uma melhor compreensão dos padrões e meios de dispersão.

Uma ampla gama de técnicas baseadas em moléculas tem sido empregada para a identificação de espécies em estágios adultos e/ou larvais de espécies invasoras marinhas ou espécies relacionadas. A *polymerase chain reaction* – PCR revolucionou muitas áreas da pesquisa biológica, incluindo a delimitação de espécies. Alguns estudos utilizam a identificação de dife-

rentes grupos taxonômicos de invasores marinhos através de ferramentas moleculares. Hare et al. (2000) descreveram uma metodologia utilizando PCR multiplex para identificar larvas de bivalves economicamente importantes com base no tamanho dos produtos da citocromo oxidase I do gene *cox1*. Outros estudos fizeram uso da técnica de PCR *single strand conformation polymorphism* (SSCP) e do método de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) combinada com sequenciamento da região 18S rDNA para identificação de espécies de bivalves em estágios iniciais de desenvolvimento (Livi & Crosseti, 2006).

Zhou & Gao (1999) realizaram a identificação de três populações de caranguejo *Eriocheir sinensis* morfológicamente difíceis de distinguir, utilizando o método RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), contudo os autores só conseguiram desenvolver marcadores para uma das populações. Pesquisas com diversas espécies de equinodermas do gênero *Asterias* descrevem a utilização de PCR sobre o *locus* SST rDNA em amostras de água de lastro (Deagle et al., 2003). Além desse estudo, uma pesquisa realizada por Mountfort et al. (2012) relata o desenvolvimento de uma metodologia por meio de ensaio de hibridização *in situ* (SHA) para detectar uma espécie invasora presente na Nova Zelândia (*Asterias amurensis*).

Um estudo feito por Stewart-Clark et al. (2009) desenvolveu *primers* para a identificação de tunicados invasores em amostras de água utilizando a técnica de PCR a partir dos genes 18S rDNA e COI. Willis e colaboradores (2011) também desenvolveram um método baseado em PCR para facilitar a detecção da espécie da ascídia *Diplosoma listerianum* com foco no gene SSU de rDNA e no gene *cox1* mitocondrial.

Todas esses estudos mostram claramente a necessidade de aprimorar técnicas moleculares confiáveis, rápidas e baratas e assim otimizar a prevenção da chegada das espécies invasoras.

## 6.2 ERRADICAÇÃO E CONTROLE

Programas de erradicação de espécies exóticas são comuns em ambientes terrestres, porém raros em ecossistemas marinhos. A maior capacidade de dispersão dos propágulos e larvas nesses ambientes talvez explique a dificuldade da implementação dos programas nos ambientes marinhos. Contudo, existe um consenso entre os cientistas de que a única possibilidade de um programa de erradicação ter sucesso seria se fosse aplicado antes de a espécie se estabelecer no ambiente ou dentro de um tempo curto desde as primeiras detecções. Por exemplo, a eliminação do mexilhão *Mytilopsis sallei* de áreas infectadas em uma marina na Austrália consistiu em um dos poucos exercícios de erradicação de espécies não nativas aquáticas com reconhecido sucesso no mundo. Em duas semanas, a baía ficou submetida a quarentena e foram adicionados 187.000 litros de alvejante líquido e 7,5 toneladas de sulfato de cobre. O programa envolveu 280 pessoas e custou dois milhões de dólares australianos, mas o custo ambiental foi ainda maior, pois o procedimento causou a morte de todos os organismos na baía, invasoras e nativas (Bax et al 2002). Já a tentativa de erradicação de uma ascídia (*Didemnum vexillum*) em uma marina no País de Gales, usando diferentes métodos, entre eles o isolamento das ascídias em sacos plásticos e posterior adição de hipoclorito, mostrou-se pouco efetiva, pois menos de um ano depois algumas colônias de *D. vexillum* foram encontradas novamente no

local (Sambrook et al 2014).

No Brasil, o método de retirada manual do coral-sol tem sido utilizado em vários pontos da costa, porém o controle efetivo só tem sido observado em áreas em que a espécie se encontra em baixa densidade. Em locais como a Baía da Ilha Grande (RJ), onde o coral-sol ocorre em alta densidade, o controle manual por mergulhadores utilizando martelos e talhadeiras não tem sido eficaz, provavelmente devido à liberação de larvas e fragmentos que causam maior dispersão dessa espécie (Coutinho et al., 2013).

Uma alternativa biotecnológica no controle de espécies invasoras já estabelecidas é a inoculação de bactérias e vírus em adultos, que pode provocar a necrose de tecidos e a morte do organismo. Contudo, esse método ainda é incipiente e necessita de estudos adicionais para verificação da sua eficácia.

O uso de tintas anti-incrustantes para o controle das espécies incrustantes pode ser uma opção, como ocorre rotineiramente em cascos de navios e outras estruturas submersas. Por fim, métodos bioacústicos, produção de campos elétricos e afins para o controle da fixação de larvas de organismos invasores em superfícies metálicas também constituem alternativas promissoras para o controle da bioinvasão.

## 7 | PERSPECTIVAS FUTURAS

A prevenção da bioincrustação marinha em substratos artificiais constitui um grande desafio científico ainda não vencido. Novas diretrizes no manejo da questão e práticas de gestão da bioincrustação, incluindo a utilização de sistemas anti-incrustantes, deverão ser aprofundadas para reduzir a presença de espécies incrustantes nas estruturas submersas. Como perspectiva futura, é importante que sejam incluídos na gestão do problema o monitoramento e detecção da bioincrustação em fases iniciais, o desenvolvimento de novos métodos anti-incrustantes, a definição de métodos para avaliar os riscos associados à limpeza das embarcações, com atenção e cuidados em relação ao risco de bioinvasão, a definição da distribuição geográfica das espécies aquáticas invasoras incrustantes e uma resposta rápida ao problema, incluindo ferramentas de diagnóstico e métodos de erradicação.

## REFERÊNCIAS

Batista, D.; Carvalho, A.P.; Costa, R.; Coutinho, R.; Dobretsov, S. (2014) Extracts of macroalgae from the Brazilian coast inhibit bacterial quorum sensing. **Botanica Marina**. 57: 441-447.

Batista, D.; Costa, R.; Carvalho, A.P.; Batista, W.R.; Rua, C.P.J.; de Oliveira, L.; Leomil, L.; Fróes, A.M.; Thompson, F.L.; Coutinho, R.; Dobretsov, S. (2018) Environmental conditions affect activity and associated microorganisms of marine sponges. **Marine Environmental Research**. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.09.020>.

- Bax, N.; Hayes, K.; Marshall, A.; Parry, D.; Thresher, R. (2002) Man-made marinas as sheltered islands for alien marine organisms: establishment and eradication of an alien invasive marine species. In: Veitch, C.R.; Clout, M.N. (eds): **Turning the tide: the eradication of invasive species**. IUCN, Cambridge, UK. 26-39.
- Borja, A.; Dauer, D.M. (2008) Assessing the environmental quality status in estuarine and coastal systems: comparing methodologies and indices. **Ecological Indicators**. 8(4): 331-337.
- Borthagaray, A.I.; Carranza, A. (2007) Mussels as ecosystem engineers: their contribution to species richness in a rocky littoral community. **Acta Oecologica – International Journal of Ecology**. 31: 243-250.
- Carvalho, A.P.; Batista, D.; Dobretsov, S.; Coutinho, R. (2016) Extracts of seaweeds as potential inhibitors of Quorum Sensing and bacterial growth. **Journal of Applied Phycology**.
- Carlton, J.T. (1987) Patterns of transoceanic marine biological invasions in the Pacific Ocean. **Bulletin of Marine Science**. 41(2): 452-465.
- Coutinho, R. (1995) Avaliação crítica das causas da zonação dos organismos bentônicos em costões rochosos. **Oecologia Australis**. 1(1), 259-271.
- Coutinho, R.; Gonçalves, J.E.A.; Messano, L.V.R.; Ferreira, C.E.L. (2013) Avaliação crítica das bioinvasões por bioincrustação. **A Ressurgência**. 7: 11-18.
- Coutinho, R.; Zalmon, I.R. (2009) O bentos de costões rochosos. In: Pereira, R.C.; Soares-Gomes, A. (eds). **Biologia Marinha**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 1: 281-297.
- Creed, J.C. et al. (2017) The invasion of the azooxanthellate coral *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) throughout the world: history, pathways and vectors. **Biological Invasions**. 19(1): 283-305.
- Da Gama, B.A.P.; Pereira, R.C.; Coutinho, R. (2009) Bioincrustação marinha. In: Pereira, R.C.; Soares-Gomes, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. 2. ed. Rio de Janeiro, Interciência. 299-318.
- Deagle, B.E.; Bax, N.; Hewitt, C.L.; Patil, J.G. (2003) Development and evaluation of a PCR-based test for detection of *Asterias* (Echinodermata: Asteroidea) larvae in Australian plankton samples from ballast water. **Marine and Freshwater Research**. 54, 709-719.
- Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Paul, V.J. (2009) Quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. **Biofouling**. 25: 413-427.
- Ferreira, C.E.L.; Gonçalves, J.E.A.; Coutinho, R. (2004) Cascos de navios e plataformas como vetores na introdução de espécies exóticas. In: Silva, J.S.V.; Souza, R.C.C.L. **Água de Lastro e Bioinvasão**. Rio de Janeiro, Interciência.
- Gentil, V. (2011) **Corrosão**. 6. ed. Rio de Janeiro, LCT.
- Hare, M.P.; Palumbi, S.R.; Butman, C.A. (2000) Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. **Marine Biology**. 137: 953-961.
- Hay, M.E. (1996) Marine chemical ecology: what's known and what's next?. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 200:103-134.
- Hellio, C.; Yebra, D. (Ed.). (2009) **Advances in marine antifouling coatings and technologies**. Elsevier.
- Ikaha, R.; Gentleman, R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. **J. Comput. Graph. Stat.** 5: 299-314.
- IMO (International Maritime Organization). (2011) Guidelines for the control and management of ships biofouling to minimize the transfer of invasive aquatic species. **Resolution MEPC**. 207(62).
- Johnston, E.L.; Roberts, D.A. (2009) Contaminants reduce the richness and evenness of marine communities: A review and meta-analysis. **Environmental Pollution**. 157: 1745-1752.
- Kohler, K.E.; Gill, S.M. (2006) Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): A Visual Basic program for

the determination of coral and substrate coverage using random point count methodology. **Computers and Geosciences**. 32: 1259-1269.

Little, B. (1984) Sucession in microfouling. In: Costlow, J.D.; Tipper, R.C. (eds), **Marine Biodeterioration: an interdisciplinary study**. Annapolis, USA, Naval Institute Press. 63-69.

Locke, A. et al. (2009) Rapid response to non-indigenous species. 2. Case studies of invasive tunicates in Prince Edward Island. **Aquatic Invasions**. 4(1): 249-258.

Lopes, R.M. (2009) **Informe sobre as espécies exóticas invasoras marinhas no Brasil**. Biodiversidade 33, Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Brasil. 440 pp.

Mansur, M.C.D. et al. (1999) *Limnoperna fortunei*, moluscos bivalves invasores, na Bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**. Porto Alegre. 7(2): 147-50.

Mountfort, D.; Smith, K.F.; Kirs, M.; Kuhajek, J.; Adamson, J.E.; Wood, J.A. (2012) Development of single and multispecies detection methods for the surveillance and monitoring of marine pests in New Zealand. **Aquatic Invasions**. 7(1): 125-128.

Ojaveer, H. et al. (2015) Classification of non-indigenous species based on their impacts: considerations for application in marine management. **PLoS Biology**. 13(4): e1002130.

Pereira, R.C.; Da Gama, B.A.P.; Teixeira, V.L.; Yoneshigue-Valentin, Y. (2003) Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. **Brazilian Journal of Biology**. 63(4): 665-672.

Quintino, V.; Elliott, M.; Rodrigues, A.M. (2006) The derivation, performance and role of univariate and multivariate indicators of benthic change: case studies at differing spatial scales. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 330(1): 368-382.

Railkin, A.I. (2003) **Marine biofouling: colonization processes and defenses**. Boca Raton: CRC Press.

Ruiz, G.M. et al. (2000) Invasion of coastal marine communities in North America: apparent patterns, processes, and biases. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 31(1): 481-531.

Silva, E.C.; Barros, F. (2011) Macrofauna bentônica introduzida no Brasil: lista de espécies marinhas e dulcícolas e distribuição atual. **Oecologia Australis**. 15(2): 326-344.

Sambrook, K.; Holt, R.H.; Sharp, R.; Griffith, K.; Roche, R.C.; Newstead, R.G.; Wyn, G.; Jenkins, S.R. (2014) Capacity, capability and cross-border challenges associated with marine eradication programmes in Europe: The attempted eradication of an invasive non-native ascidian, *Didemnum vexillum* in Wales, United Kingdom. **Marine Policy**. 48: 51-58.

Sleiti, A.K. (2017) Tidal power technology review with potential applications in Gulf Stream. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 69: 435-441.

StatSoft I. (2005) **DataMiningTechniques**. <http://www.statsoftinc.com/textbook/stathome.html>.

Stewart-Clark, S.E.; Siah, A.; Greenwood, S.J.; Davidson, J.; Berthe, F.C.J. (2009) Development of 18S rDNA and COI gene primers for the identification of invasive tunicate species in water samples. **Aquat. Inv.** 4: 575-580.

Terlizzi, A.; Anderson, M.J.; Fraschetti, S.; Benedetti-Cecchi, L. (2007) Scales of spatial variation in Mediterranean subtidal sessile assemblages at different depths. **Mar Ecol Prog Ser**. 332: 25-39.

Videla, H.A. (2003) **Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de materiais**. São Paulo, Edgard Blücher.

Wahl, M. (1989) Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. **Mar Ecol Prog Ser**. 58: 175-189.

Williams, S.L.; Davidson, I.C.; Pasari, J.R.; Ashton, G.V.; Carlton, J.T.; Crafton, R.E.; Zabin, C.J. (2013) Managing multiple vectors for marine invasions in an increasingly connected world. **BioScience**. 63(12):

952-966.

Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI). **Marine fouling and its prevention**. 1952.

Yebra, D.M.; Kiiil, S.; Dam-Johansen, K. (2004) Review. Antifouling technology – past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Prog. Org. Coat.** 50: 75-104.



# BIORREMEDIAÇÃO

Mariana Esteves Campeão<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

## RESUMO

A introdução de petróleo nos ambientes marinhos pode ser dar tanto por causas naturais, em razão de afloramentos petrolíferos no fundo marinho, como em virtude de atividades antrópicas de extração e transporte desse recurso para fins econômicos. Em decorrência da grande profundidade desses afloramentos ou poços de extração (muitas vezes chegando a mais de 1000 metros), o conhecimento da microbiota associada a essas regiões foi por muito tempo desafiador, em razão da dificuldade de coleta, possibilidade de contaminação das amostras e dificuldade de reprodução das condições extremas do ambiente para cultivo. Atualmente, vários estudos têm demonstrado que a introdução de petróleo no ambiente marinho leva a uma dinâmica sucessional nas comunidades microbianas que induz o crescimento de micro-organismos capazes de extrair carbono e energia dos componentes do petróleo. Essa potencialidade natural do ambiente pode ser aproveitada para a biorremediação de áreas impactadas por atividades petrolíferas, através de estímulos da resposta dos micróbios endógenos para recuperação do ambiente impactado. Diversos estudos foram e vêm sendo realizados de modo a conhecer quais os micróbios envolvidos nesses processos, quais os fatores abióticos que interferem na sua resposta aos componentes do óleo, qual a dinâmica sucessional dessas populações e quais populações podem ser encontradas em diferentes ambientes sujeitos ou potencialmente sujeitos à exploração petrolífera.

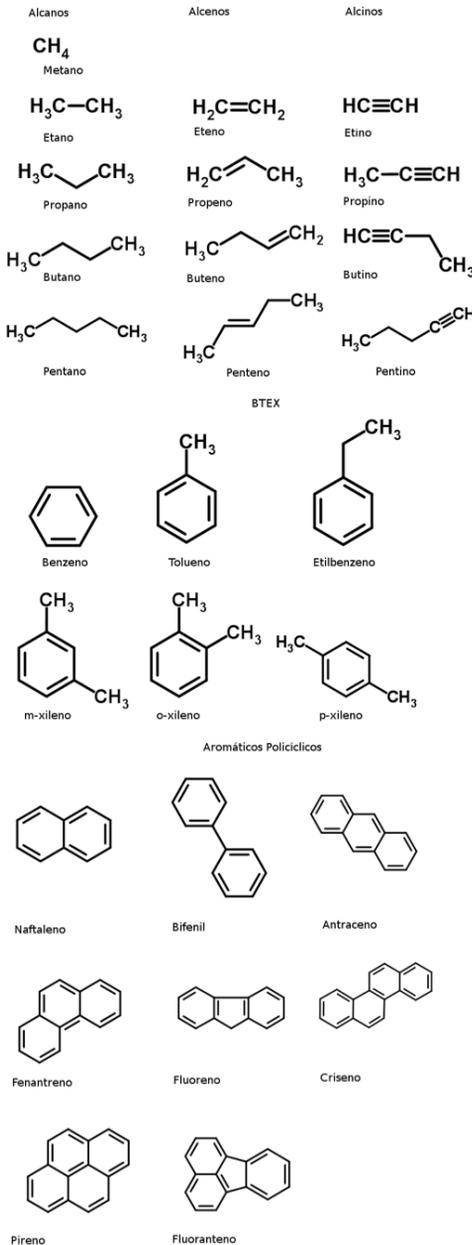
## 1 | FORMAÇÃO DO PETRÓLEO

Um sistema de petróleo é composto por uma rocha geradora, uma rocha selante e uma rocha reservatório, além dos processos formadores do petróleo, que são a formação de trapas e geração, migração e acumulação de hidrocarbonetos. A rocha geradora é onde o óleo se forma, em geral, por uma quebra térmica da matéria orgânica fóssil (querogênio) contida nos sedimentos que foram sedimentados sob condições específicas. O querogênio de diferentes rochas geradoras pode diferir na razão H/C (hidrogênio/carbono), o que influenciará na razão final gás/óleo dos fluidos do petróleo. O primeiro estágio do processo, a diagênese, ocorre com a degradação da matéria orgânica pela atividade bacteriana, gerando  $\text{CO}_2$  e liberando água. Esse estágio é relativamente curto, devido aos aumentos de temperatura, e a razão O/C (oxigênio/carbono) decresce mais rapidamente do que a razão H/C. No segundo estágio, a catagênese, ocorre a quebra e degradação térmica a uma temperatura entre  $50^\circ$  e  $150^\circ$  C e profundidade entre 1500 e 4000 metros, com um decréscimo mais rápido da razão H/C em relação à razão O/C. No terceiro estágio, a metagênese, as últimas ligações C-C são quebradas a temperaturas entre  $120^\circ$  e  $200^\circ$  C e a razão H/C decresce rapidamente. O fluido formado após esses três estágios é expelido pela rocha geradora e migra para a rocha reservatório através de fraturas na rocha. A rocha reservatório tem grande capacidade de armazenamento, a depender da sua porosidade, que pode variar em decorrência do processo de formação da rocha e por influência de parâmetros tais como pressão, temperatura e circulação de água. A quantidade total de óleo armazenado na rocha reservatório depende, por sua vez, da porosidade da rocha e da saturação. A saturação de óleo na rocha, medida em razão do volume do fluido pela unidade do volume de poro, nunca atinge 100%, devido a certa quantidade de água que sempre é drenada para a rocha reservatório e nunca pode ser completamente expelida durante a migração do fluido. A rocha selante impede a migração do óleo para a superfície, visto que este é menos denso que a água, e o mantém estocado na rocha reservatório. A rocha selante tem a capacidade de se deformar sem quebrar e é caracterizada por uma baixa porosidade e permeabilidade (Planckaert, 2005).

## 2 | COMPOSIÇÃO DO PETRÓLEO

Os fluidos do petróleo são compostos principalmente por hidrocarbonetos, que são substâncias orgânicas formadas por carbono e hidrogênio. Dentre os principais hidrocarbonetos do petróleo encontram-se os n-alcenos, os quais normalmente estão presentes em grandes concentrações, a menos que haja degradação. O primeiro alceno é o metano, composto por um único átomo de carbono e quatro átomos de hidrogênio. A substituição sucessiva de um átomo de hidrogênio por um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) resulta em outros alcenos de tamanho variável, consistindo em moléculas sempre saturadas (as ligações C-C são todas simples) e cuja estrutura pode

ser ramificada ou alifática. Os alcenos são hidrocarbonetos que possuem uma ou mais ligações duplas entre os átomos de carbono, enquanto os alcinos possuem uma ou mais ligações triplas entre os átomos de carbono, sendo, portanto, hidrocarbonetos insaturados. Os cicloalcanos são hidrocarbonetos que possuem um ou mais anéis. Os hidrocarbonetos aromáticos são moléculas que possuem um ou mais anéis aromáticos. Existem dois grupos de hidrocarbonetos aromáticos: BTEX, que corresponde aos hidrocarbonetos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, os quais possuem apenas um anel aromático; PAH, que correspondem aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (*polycyclic aromatic hydrocarbons*), dos quais o mais simples é o naftaleno.



**Figura 1.** Hidrocarbonetos do petróleo (alcanos, alcenos, alcinos, BTEX e PAH).

### 3 | ÁGUA PRODUZIDA DO PETRÓLEO

A indústria do petróleo é uma grande consumidora e produtora de água. No fim da vida de um campo de petróleo, os poços podem produzir até 95% de água. Essa água, chamada água produzida de petróleo, é proveniente do próprio reservatório, tendo sido drenada para o mesmo durante a sua formação, e deve ser tratada antes de ser reinjetada no reservatório ou despejada no mar. As características da água de produção são: nenhum oxigênio dissolvido, salidade significativa de até 300g/l (cloridos, sulfatos ou bicarbonatos), alta temperatura (40 a 90° C), pequena quantidade de partículas em suspensão, alta concentração de HC, alguns alcoóis (fenóis), alguns metais, tais como zinco ou chumbo, alguns ácidos e alguns compostos orgânicos nitrogenados ou fosforados. Há diferentes métodos para o tratamento da água de produção, os quais são de diferentes tipos para água dispensada em oceanos ou rios e aquela reinjetada no poço. O mais importante tratamento para a água dispensada nos oceanos e rios é a remoção de óleo, o qual deve atingir limites mínimos de concentração padronizados e estabelecidos normativamente para que a água possa ser dispensada. A reinjeção de água pode ser uma alternativa ecológica ou necessidade decorrente da exploração em meio terrestre, mas gera alguns problemas, como a necessidade de mistura com mais água e o aumento da quantidade de água a ser reinjetada. Os critérios para reinjeção de água englobam quantidade e tamanho máximo dos componentes sólidos, quantidade mínima de oxigênio para evitar problemas de corrosão, tratamento com biocida e a prevenção da precipitação e corrosão causada por minerais na água (Planckaert, 2005).

### 4 | MICROBIOTA DAS FORMAÇÕES GEOLÓGICAS DO PETRÓLEO

O primeiro estudo sobre ecologia microbiana em água de produção pode ser considerado o de Bastin et al., de 1926, que detectou bactérias redutoras de sulfato como habitantes comuns de aberturas de poços de campos de petróleo, ao analisar 67 amostras coletadas na Califórnia e em Illinois (Magot, 2005). Atualmente, sabe-se que existe grande diversidade de bactérias e arqueias redutoras de sulfato associada a campos de petróleo (Rees et al., 1995; Rozanova et al., 2001; Lien; Beeder, 1997; Galushko; Rozanova, 1991; Lien et al., 1998; Rozanova et al., 1988; Tardy-Jacquenod et al., 1996; Magot et al., 1992; Nga et al., 1996; Beeder et al., 1995; Miranda-Tello et al., 2003; Magot et al., 2004). O crescimento ótimo desses micro-organismos ocorre em temperaturas entre 23° e 85°C e faixas de salinidade que variam de condições de água doce a 6% de salinidade. Essa diversidade fisiológica, associada às condições geoquímicas e físico-química particulares desses ambientes, sugere que a população de sulfato-redutores é parte de um ecossistema microbiano complexo com um ciclo bioquímico ativo de carbono e sais minerais (Magot, 2005). Alcanos, alcenos e hidrocarbonetos aromáticos podem ser de

gradados por micróbios redutores de sulfato (Rabus et al., 1993; Harms et al., 1999; Morasch et al., 2004; Aeckersberg et al., 1998; So; Young, 1999; Davidova et al., 2006; Cravo-Laureau et al., 2004; Grossi et al., 2007; Kniemeyer et al., 2007). Contudo, o papel dos redutores de sulfato na degradação de hidrocarbonetos ainda requer estudos adicionais.

## 5 | DIVERSIDADE DE BIODEGRADADORES DE ÓLEO

É estimado que 600.000 toneladas de óleo entrem nos oceanos a partir dos afloramentos naturais (National Research Council, 2002), o que é aproximadamente equivalente à quantidade de óleo que entra nos oceanos em decorrência da atividade antropogênica. Essa quantidade de óleo seria suficiente para cobrir a superfície dos oceanos do mundo, o que de fato não ocorre, devido à biodegradação dos componentes do óleo pela microbiota marinha (Prince, 2005). Os componentes do petróleo fornecem carbono e energia para diversos grupos microbianos, englobando os três domínios da vida (Archaea, Bacteria e Eukarya).

### 5.1 BACTÉRIAS

A biodegradação dos componentes do óleo ocorre primariamente pela ação de bactérias. Mais de 75 gêneros de bactérias são capazes de se desenvolver em ambientes com hidrocarbonetos fornecidos como fonte de carbono e energia (Prince, 2005).

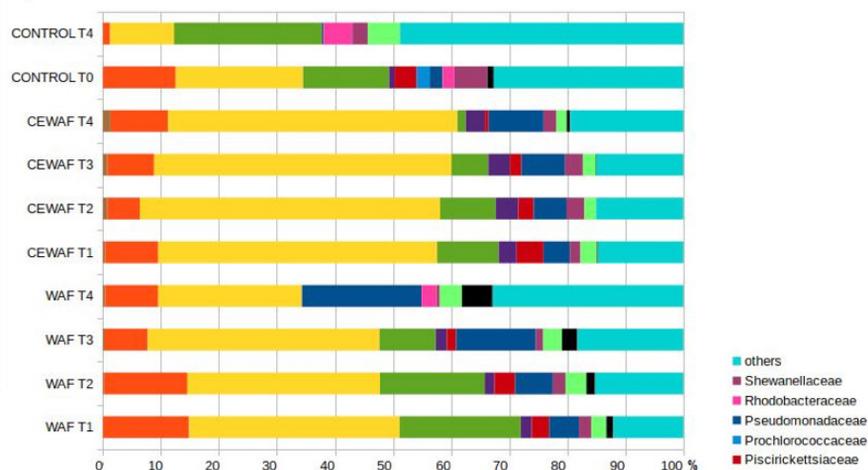
Em geral, experimentos ou estudos com comunidades microbianas degradadoras de óleo apresentam as mesmas famílias microbianas, diferindo apenas nos grupos dominantes nas amostragens ou pela presença/ausência de um ou outro gênero. Na pluma de óleo no Golfo do México, Oceanospirillales foram dominantes nas amostras do interior da pluma e representaram apenas uma pequena fração da amostra controle na região fora da pluma de óleo (Hazen et al., 2010). Em experimentos realizados com água profunda da foz do Amazonas e da bacia de Barreirinhas, Oceanospirillales não foram dominantes (Campeão et al., 2017). Diferenças entre grupos microbianos dominantes em diferentes experimentos podem estar relacionadas às comunidades microbianas endógenas de cada localidade, a diferenças na montagem dos experimentos e à natureza e composição do óleo usado. Não obstante, uma clara resposta do óleo sobre os biodegradadores microbianos é observada em todos os estudos, inclusive pelo aumento no número de contagens de células e pela diminuição da concentração dos componentes do petróleo.

#### 5.1.1. PRINCIPAIS GÊNEROS DEGRADADORES DE ÓLEO

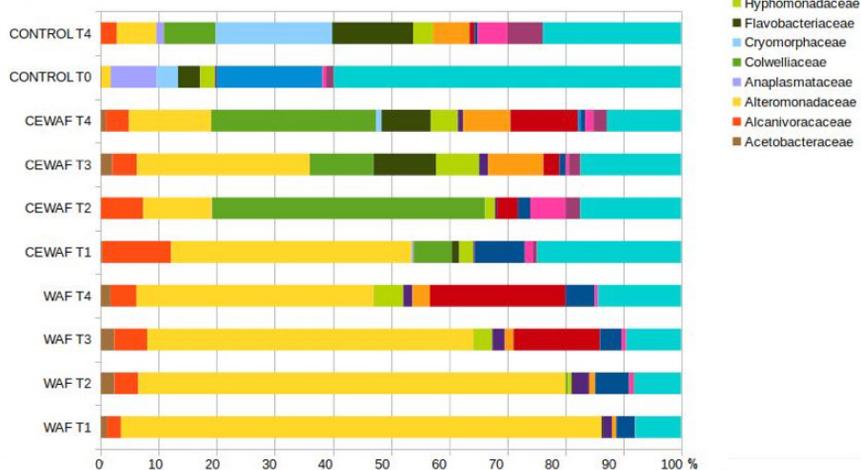
##### **Alcanivorax:**

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Alcanivoracaceae; *Alcanivorax*

## A) Foz do Amazonas



## B) Barreirinhas



**Figura 2.** Composição da comunidade bacteriana a nível de família para água tratada com óleo (WAF) e com óleo e dispersante (CEWAF) nos tempos  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  e  $T_4$ , determinada por análises metagenômicas, na foz do Amazonas e na bacia de Barreirinhas. A comunidade bacteriana para as amostras controle de água profunda (sem óleo) são mostradas nos tempos  $T_0$  e  $T_4$ . Fonte: Campeão et al., 2017.

Esse gênero foi descrito em 1998, isolado a partir de amostras de sedimento e água coletadas na Ilha de Borkum, no Mar do Norte, próximo à fronteira germano-holandesa (Yakimov et al., 1998). É amplamente distribuído ao redor do mundo em sedimentos e águas marinhas, possuindo 11 espécies: *Alcanivorax balearicum* (Rivas et al. 2007); *A. borkumensis* (Yakimov et al. 1998); *A. dieselolei* (Liu & Shao 2005); *A. gelatiniphagus* (Kyoung kwon et al. 2015); *A. hongdenensis* (Wu et al. 2009); *A. jadensis* (Fernández-Martínez et al. 2003); *A. marinus* (Lai et al. 2013); *A. pacificus* (Lai et al. 2011); *A. venustensis* (Fernández-Martínez et al. 2003); *A. xenomutans*

(Rahul et al. 2014), e *A. nanhaiticus* (Lai et al. 2016). O gênero *Alcanivorax* é composto por espécies Gram-negativas. Em geral, são aeróbios, mas alguns foram reportados como anaeróbios facultativos (*A. jadensis*, *A. xenomutans*). Possuem formato de bastonete e, enquanto alguns não possuem motilidade (*A. borkumensis*, *A. hongdengensis*, *A. jadensis*, *A. pacificus*, *A. nanhaiticus*), outros podem se mover por meio de flagelos polares ou subpolares (*A. balearicum*, *A. gelatiniphagus*, *A. marinus*, *A. venustensis*, *A. xenomutans*) ou lofotríquias (*A. dieselolei*). São halofílicos, quimioorganotróficos (capazes de utilizar ácidos graxos e alcanos como única ou principal fonte de carbono) e o pH ótimo de crescimento é em torno de 7. Algumas espécies podem crescer em faixas de temperatura com mínimos de 4°C e máximos de 45°C, sendo o crescimento ótimo, para as espécies em geral, em torno de 28-30°C. A maioria não é capaz de fermentar carboidratos. Algumas espécies são capazes de reduzir nitrato a nitrito (*A. balearicum*, *A. borkumensis*, *A. dieselolei*, *A. hongdengensis*, *A. jadensis*, *A. pacificus* e *A. xenomutans*), mas nenhuma é denitrificante. Possuem a capacidade de degradar uma grande variedade de alcanos, através de enzimas conhecidas como alcano-monooxigenases, tais como Alk1 e Alk2, responsáveis pela clivagem de alcanos médios na faixa de C5-C12 e C8-C16, respectivamente. São encontrados em baixa abundância nos oceanos de regiões não poluídas, mas tornam-se abundantes na presença de óleo e sem limitação de nitrogênio e fósforo, podendo corresponder a 80-90% da comunidade microbiana degradadora de óleo (Harayama et al., 1999; Yakimov et al., 2005; 2007). O genoma desse grupo é composto por um único cromossomo circular, variando de aproximadamente 3,12 (*A. borkumensis*) a 4,93Mb (*A. dieselolei*) (GenBank, 2017). Dentre as espécies desse gênero, *A. borkumensis* e *A. hongdengensis* podem produzir biossurfactantes. Os biossurfactantes podem ser extracelulares ou estar ligados à membrana e permitem emulsificar o óleo, facilitando sua degradação. Também auxiliam na formação de biofilme ao redor das gotas de óleo, permitindo melhor adesão a estas e, conseqüentemente, facilitando a quebra dos hidrocarbonetos ali presentes. O biossurfactante produzido por *A. borkumensis* consiste em um composto de glicolipídeos (Yakimov et al., 1998), enquanto aquele produzido por *A. hongdengensis* é formado por lipopeptídeos (Wu et al., 2009).

### **Colwellia:**

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Colwelliaceae; *Colwellia*

Esse gênero foi descrito em 1988, isolado sob condições de mar profundo a 2°C e pressão hidrostática de 740 atm, a partir de uma amostra de água do mar rica em partículas, coletada à profundidade de 7.410 metros, na fossa de Porto Rico, no Oceano Atlântico (Deming et al., 1988). Membros desse gênero foram isolados do ambiente marinho, a partir de água, sedimento ou outros organismos, tais como estrelas-do-mar e ascídias (Deming et al., 1988; Bowman et al., 1998; Jung et al., 2006; Choi et al., 2010; Yu et al., 2011; Kim et al., 2013; Liu et al., 2014). Possui 17 espécies: *Colwellia aestuarii* (Jung et al. 2006); *C. aquaemaris* (Liu et al. 2014); *C. arctica* (Wang et al. 2015); *C. asteriadis* (Choi et al. 2010); *C. chukchiensis* (Yu et al. 2011); *C. demingiae* (Bowman et al. 1998); *C. hadaliensis* (Deming et al. 1988); *C. hornerae* (Bowman et al. 1998); *C. maris* (Yumoto et al. 1998); *C. meonggei* (Kim et al. 2014); *C. mytili* (Kim et al. 2017); *C. piezophila* (Nogi et al. 2004);

*C. polaris* (Zhang et al. 2008); *C. psychrerythraea* (corrig. (ex D'Aoust; Kushner 1972) Deming et al. 1988, nom. rev., comb. nov.); *C. psychrotropica* (Bowman et al. 1998); *C. rossensis* (Bowman et al. 1998), e *C. sediminilitoris* (Park et al. 2016).

É Gram-negativo. A maioria é anaeróbia facultativa, mas alguns são aeróbios (*C. sediminilitoris*, *C. meonggei*, *C. mytili* e *C. polaris*). Alguns podem formar esporos (*C. hadaliensis*). Em geral, possuem forma de bastonete curvo ou linear, podendo, em alguns casos, formar filamentos (*C. demingiae*) ou apresentar forma ovoide (*C. meonggei*, *C. hornerae*, *C. rossensis*, *C. sediminilitoris*). A maioria possui motilidade, conferida por um flagelo polar, com exceção de *C. rossensis*. Muitas espécies de *Colwellia* reduzem nitrato a nitrito (*C. sediminilitoris*, *C. aestuarii*, *C. arctica*, *C. asteriadis*, *C. demingiae*, *C. hornerae*, *C. rossensis*, *C. psychrotropica*, *C. maris* e *C. meonggei*) e algumas são denitrificantes (*C. aquaemaris*, *C. chukchiensis* e *C. psychrerythraea*).

Quimioorganotróficos. Crescem em pH ótimo, geralmente, em torno de 7. Halofílicos, em geral, requerem NaCl, com crescimento ótimo em cerca de 2% de NaCl no meio, podendo algumas espécies tolerar mínimos de 0,5% (*C. arctica*, *C. chukchiensis* e *C. meonggei*) e outras, máximos de 10% (*C. asteriadis*). Associados a ambientes frios (Deming et al., 1988), sua temperatura de crescimento está entre mínimos de -15°C ou -10°C (*C. hornerae*, *C. psychrotropica*, *C. demingiae*) e máximos de 32°C (*C. aestuarii*), e algumas espécies têm crescimento ótimo na faixa de 10°C a 18°C (*C. arctica*, *C. asteriadis*, *C. demingiae*, *C. hornerae*, *C. rossensis*, *C. psychrotropica*, *C. piezophila*), enquanto outras na faixa de 20°C a 30°C (*C. sediminilitoris*, *C. aestuarii*, *C. aquaemaris*, *C. chukchiensis*, *C. meonggei*, *C. mytili*, *C. polaris*). Algumas espécies são barofílicas obrigatórias (*C. hadaliensis*, *C. psychrerythraea*). É capaz de formar biofilmes. Possui um cromossomo circular variando de 3,85 (*C. sediminilitoris*) a 5,72 Mb (*C. psychrerythraea*) (GenBan, 2017). Produz polissacarídeos extracelulares que têm função de proteger contra danos causados pelas baixas temperaturas (crioproteção). Possui enzimas para muitas vias metabólicas, podendo crescer em uma ampla gama de substratos, inclusive sendo capaz de quebrar compostos orgânicos de alto peso molecular. Dentre os hidrocarbonetos, são capazes de degradar BTEX e alcanos (Methe et al., 2005).

### **Marinobacter:**

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae; *Marinobacter*

Esse gênero foi descrito em 1992, isolado a partir de uma amostra de água do Mar Mediterrâneo, próximo à saída de uma refinaria de petróleo, no Golfo de Fos (Gauthier et al., 1992). Membros desse gênero foram isolados do ambiente marinho, da coluna d'água, de sedimentos marinhos ou em associação com outros organismos. O gênero *Marinobacter* é composto por espécies Gram-negativas, em forma de bastonete, marinhas, e possui 42 espécies: *Marinobacter adhaerens* (Kaepfel et al. 2012); *M. algicola* (Green et al. 2006); *M. antarcticus* (Liu et al. 2012); *M. aromaticivorans* (Cui et al. 2016); *M. bryozorum* (Romanenko et al. 2005); *M. confluentis* (Park et al. 2015); *M. daepoensis* (Yoon et al. 2004); *M. daqiaonensis* (Qu et al. 2011); *M. excellens* (Gorshkova et al. 2003); *M. flavimaris* (Yoon et al. 2004); *M. goseongensis* (Roh et al. 2008); *M. gudaonensis*

(Gu et al. 2007); *M. guineae* (Montes et al. 2008); *M. halophilus* (Zhong et al. 2015); *M. halotolerans* (Kim et al. 2017); *M. hydrocarbonoclasticus* (Gauthier et al. 1992); *M. koreensis* (Kim et al. 2006); *M. lacisalsi* (Aguilera et al. 2009); *M. lipolyticus* (Martín et al. 2003); *M. litoralis* (Yoon et al. 2003); *M. lutaoensis* (Shieh et al. 2003); *M. maritimus* (Shivaji et al. 2005); *M. mobilis* (Huo et al. 2008); *M. nitratireducens* (Vaidya et al. 2015); *M. oulmenensis* (Kharroub et al. 2011); *M. pelagius* (Xu et al. 2008); *M. persicus* (Bagheri et al. 2013); *M. psychrophilus* (Zhang et al. 2008); *M. salarius* (Ng et al. 2015); *M. salicampi* (Yoon et al. 2007); *M. salinus* (Rani et al. 2017); *M. salsuginis* (Antunes et al. 2007); *M. santoriniensis* (Handley et al. 2009); *M. sediminum* (Romanenko et al. 2005); *M. segnicrescens* (Guo et al. 2007); *M. shengliensis* (Luo et al. 2015); *M. similis* (Ng et al. 2015); *M. szutsaonensis* (Wang et al. 2009); *M. vinifirmus* (Liebgott et al. 2006); *M. xestospongiae* (Lee et al. 2012); *M. zhanjiangensis* (Zhuang et al. 2012), e *M. zhejiangensis* (Huo et al. 2008).

Seis espécies reconhecidas de *Marinobacter* são capazes de metabolizar aerobicamente hidrocarbonetos saturados ou hidrocarbonetos aromáticos, bem como de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em condições anóxicas, o que é favorecido por sua capacidade de desnitrificação (Lu et al., 2011, Cui et al., 2016). Essas espécies são: *M. hydrocarbonoclasticus*, degradador de uma grande variedade de n-alcenos e de BTEX (Gauthier et al. 1992,); *M. maritimus*, capaz de degradar n-alcenos (heptano, hexano, éter de petróleo) (Shivaji et al., 2005); *M. algicola*, que metaboliza n-alcenos (n-hexadecano e n-tetradecano) (Green et al. 2006); *M. nanhaiticus*, que degrada naftaleno, antraceno e fenantreno (PAH) (Gao et al. 2013); *M. aromaticivorans*, também degradador de naftaleno, antraceno e fenantreno (PAH) (Cui et al., 2016), e *M. vinifirmus*, metabolizador de BTEX (Liebgott et al., 2006, Berlendis et al., 2010). Dentre as espécies capazes de degradar hidrocarbonetos, todas possuem motilidade, conferida por um flagelo polar, cuja presença é influenciada pelas concentrações de NaCl do meio, de modo que, em concentrações muito baixas ou muito altas de NaCl, o flagelo estará ausente nessas bactérias (Gauthier et al., 1992). Apenas *M. hydrocarbonoclasticus* e *M. maritimus* são desnitrificantes dentre as *Marinobacter* hidrocarbonoclasticas. Em geral, são aeróbios, mas podem crescer anaerobicamente na presença de nitrato (*M. algicola*, *M. hydrocarbonoclasticus*), e não utilizam ampla faixa de substratos, não crescendo em carboidratos ou aminoácidos ou crescendo em pouca variedade de substâncias desse tipo. Contudo, são capazes de degradar diferentes tipos de hidrocarbonetos, especialmente n-alcenos, e usá-los como única fonte de carbono e energia (Gauthier et al., 1992). A faixa de temperatura de crescimento varia, sendo mínima de 4°C para *M. maritimus* e máxima de 50°C para *M. vinifirmus*, enquanto a temperatura ótima de crescimento, em geral, é de 25°C, exceto para *M. hydrocarbonoclasticus* (32°C) e para *M. maritimus* (22°C). Podem crescer em ampla faixa de concentração de NaCl, a qual varia para essas espécies, sendo a mais ampla com mínima de 0% e máxima de 20% para *M. vinifirmus*, ao passo que o crescimento ótimo varia na faixa de 1-6% para essas seis espécies. As bactérias hidrocarbonoclasticas do gênero *Marinobacter* possuem um cromossomo circular variando de 3,84 (*M. vinifirmus*) a 5,36Mb (*M. nanhaiticus*) (GenBank, 2017).

### **Thalassolitus:**

Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Oceanospirillaceae; *Thalassolitus*

Gram-negativo, aeróbico estrito, formato vibrióide a espiral, halófilos estritos (requer  $\text{Na}^+$  para crescimento), possui motilidade flagelar e quimiorgano-heterotrófico (Yakimov et al. 2004). Atualmente, esse gênero compreende duas espécies: *Thalassolituus oleivorans* e *T. marinus* (Euzéby, 2017).

*T. oleivorans* é uma bactéria polimórfica, que pode se apresentar com forma cocóide ou em bastonete curvo, e que possui motilidade conferida por flagelo, cujo número pode variar de um a quatro. É uma espécie marinha e requer pelo menos 25% de salinidade para crescimento, bem como íons  $\text{Na}^+$ . O crescimento dos indivíduos dessa espécie ocorre em concentrações de NaCl de 0,5 a 5,7%, com crescimento ótimo entre 2 e 3%, em temperaturas de 4-30°C, com temperatura ótima de 20-25°C; e em uma faixa de pH de 7,5 a 9, com crescimento ótimo em pH 8. Os únicos substratos em que essa espécie cresce são acetato, hidrocarbonetos com cadeias entre C7 e C20 e os derivados oxidados dessas substâncias (Yakimov et al., 2004).

*T. marinus* possui forma de bastonete curvo e motilidade conferida por um flagelo polar. O crescimento dos indivíduos dessa espécie ocorre em concentrações de NaCl de 0,5 a 5%, com crescimento ótimo em 2,5%; em temperaturas de 15-42°C, com temperatura ótima de 25°C; e em uma faixa de pH de 6 a 9, com crescimento ótimo em pH 7-8. N-tetradecano e n-hexadecano são utilizados como fonte de carbono. Reduz nitrato a nitrito (Choi; Cho, 2013).

### **Cycloclasticus:**

Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Thiotrichales; Piscirickettsiaceae; *Cycloclasticus*

Esse gênero, descrito por Dyksterhouse et al. (1995), é Gram-negativo, aeróbico obrigatório, possui forma de bastonete e tem motilidade conferida por um flagelo polar. Utiliza compostos aromáticos, incluindo bifenil, naftaleno, antraceno e fenantreno como únicas ou principais fontes de energia (Dyksterhouse et al., 1995). Atualmente, há apenas uma espécie descrita: *Cycloclasticus pugetii* (Euzéby, 2017). *C. pugetii* requer pelo menos 10% de salinidade para crescimento, o qual é pequeno em meio bacteriológico complexo sem compostos aromáticos. Usa compostos aromáticos, incluindo bifenil, naftaleno, fenantreno, antraceno e tolueno, como principal ou única fonte de carbono para o crescimento, sendo, portanto, uma importante bactéria degradadora de PAH. Também pode usar aminoácidos e ácidos graxos selecionados, incluindo acetato, propionato e glutamato. Reduz nitrato a nitrito e produz um composto amarelo difundível durante o crescimento em bifenil (Dyksterhouse et al., 1995).

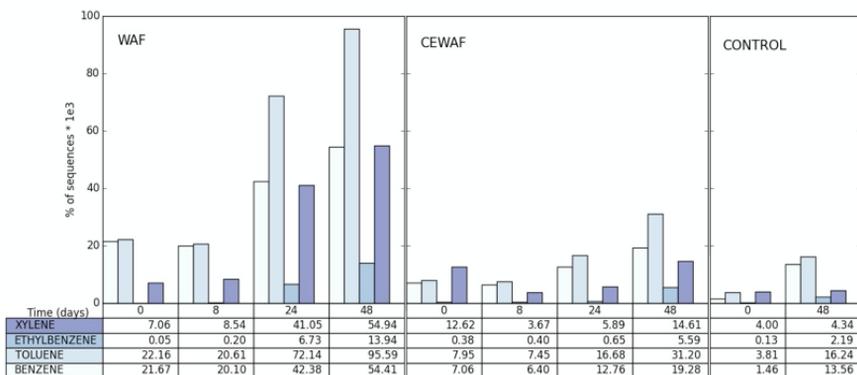
A biodegradação de diferentes tipos de hidrocarbonetos ao longo do tempo condiz com a proporção de sequências dos respectivos tipos de bactérias capazes de degradá-los, revelando uma dinâmica de sucessão ecológica. Alcanos e BTEX estão entre os primeiros compostos a serem degradados (Brakstad et al., 2015a; Hazen et al., 2010; Wang et al., 2016), enquanto PAH são os compostos de óleo mais recalcitrantes quando comparados a alcanos e BTEX (Mason et al., 2014b). *Cycloclasticus* (Piscirickettsiaceae), uma importante bactéria degradadora de PAH (Dyksterhouse et al., 1995), foi principalmente observada no final de experimentos de biodegradação de óleo, enquanto as proporções de sequências relacionadas à biodegradação de PAH ao longo do tempo se mostraram semelhantes aos padrões de crescimento de *Cycloclasticus* (Campeão et al., 2017).

**Tabela 1.** Outros gêneros bacterianos degradadores de óleo. Adaptado de Prince (2005).

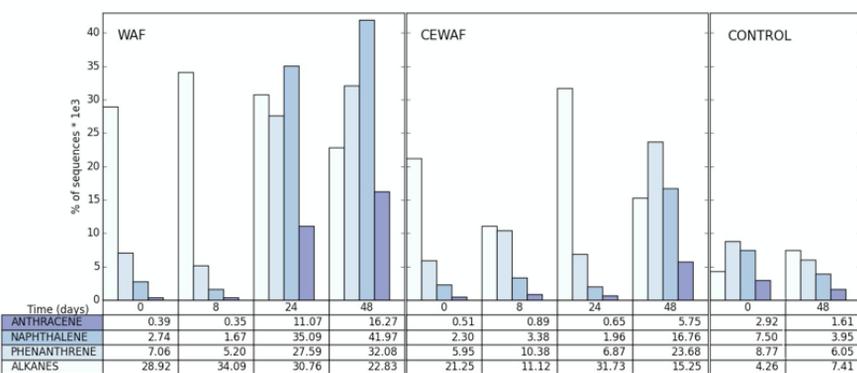
GÊNERO	LITERATURA	GÊNERO	LITERATURA
<i>Achromobacter</i>	Le Petit et al., 1975	<i>Klebsiella</i>	Odokumal and Dickson, 2003
<i>Acidocella</i>	Dore et al., 2003	<i>Lactobacillus</i>	Floodgate, 1984
<i>Acidovorax</i>	Meyer et al., 1999	<i>Leclercia</i>	Sarma et al., 2004
<i>Acinetobacter</i>	Le Petit et al., 1975	<i>Leucothrix</i>	Floodgate, 1984
<i>Actinomyces</i>	ZoBell, 1946	<i>Lutibacterium</i>	Chung and King, 2001
<i>Aeromonas</i>	Odokumal and Dickson, 2003	<i>Micrococcus</i>	Ilori et al., 2000
<i>Agrobacterium</i>	Prantera et al., 2002	<i>Moraxella</i>	Stucki and Alexander, 1987
<i>Alcaligenes</i>	Le Petit et al., 1975	<i>Mycobacterium</i>	Willumsen et al., 2001
<i>Alkanindiges</i>	Bogan et al., 2003	<i>Neptunomonas</i>	Hedlund et al., 1999
<i>Alteromonas</i>	Iwabuchi et al., 2002	<i>Nocardia</i>	Mikolasch et al., 2003
<i>Arthrobacter</i>	Le Petit et al., 1975	<i>Nocardioides</i>	Iwabuchi and Harayama, 1998
<i>Aureobacterium</i>	Giles et al., 2001	<i>Ochrobactrum</i>	Gaylarde et al., 1999
<i>Azoarcus b</i>	Hess et al., 1997	<i>Oleiphilus</i>	Golyshin et al., 2002
<i>Azospirillum</i>	Eckford et al., 2002	<i>Oleispira</i>	Yakimov et al., 2003
<i>Azotobacter</i>	Gradova et al., 2003	<i>Paenibacillus</i>	Meyer et al., 1999
<i>Bacillus</i>	ZoBell, 1946	<i>Pasteurella</i>	Sepic et al., 1997
<i>Beijerinckia</i>	Surovtseva et al., 1999	<i>Peptococcus</i>	Floodgate, 1984
<i>Blastochloris</i>	Zengler et al., 1999	<i>Planococcus</i>	Engelhardt et al., 2001
<i>Brevibacterium</i>	Pirnik et al., 1974	<i>Polaromonas</i>	Jeon et al., 2004
<i>Brevundimonas</i>	Chaineau et al., 1999	<i>Proteus</i>	Odokumal and Dickson, 2003
<i>Burkholderia</i>	Parales et al., 2000	<i>Pseudomonas</i>	Le Petit et al., 1975
<i>Clavibacter</i>	Dore et al., 2003	<i>Ralstonia</i>	Parales et al., 2000
<i>Comamonas</i>	Meyer et al., 1999	<i>Rhodococcus</i>	Meyer et al., 1999
<i>Corynebacterium</i>	Chineau et al., 1999	<i>Sarcina</i>	Bossert and Bartha, 1984
<i>Cytophaga</i>	Bossert and Bartha, 1984	<i>Serratia</i>	Odokumal and Dickson, 2003
<i>Dechloromonas</i>	Coates et al., 2001b	<i>Sphaerotilus</i>	Austin et al., 1977
<i>Desulfatibacillum</i>	Cravo-Laureau et al., 2004	<i>Sphingomonas</i>	Romine et al., 1999
<i>Desulfobacterium</i>	Harms et al., 1999	<i>Spirillum</i>	Bossert and Bartha, 1984
<i>Desulfobacula</i>	Rabus et al., 1993	<i>Staphylococcus</i>	Saadoun et al., 1999
<i>Desulfosarcina</i>	Harms et al., 1999	<i>Stenotrophomonas</i>	Juhasz et al., 2000
<i>Desulfosporosinus</i>	Robertson et al., 2001	<i>Streptomyces</i>	Barabas et al., 2001
<i>Dietzia</i>	Yumoto et al., 2002	<i>Thauera</i>	Shinoda et al., 2004
<i>Enterobacter</i>	Saadoun et al., 1999	<i>Thermoleophilum</i>	Zarilla and Perry, 1986
<i>Erwinia</i>	Saadoun et al., 1999	<i>Thermus</i>	Feitkenhauer et al., 2003

GÊNERO	LITERATURA	GÊNERO	LITERATURA
<i>Flavobacterium</i>	Stucki and Alexander, 1987	<i>Vibrio</i>	Hedlund and Staley, 2001
<i>Geobacillus</i>	Nazina et al., 2001	<i>Xanthobacter</i>	Padden et al., 1997
<i>Geobacter</i>	Coates et al., 2001a	<i>Xanthomonas</i>	Hamann et al., 1999
<i>Gordonia</i>	Kummer et al., 1999		

**A) Barreirinhas - BTEX genes:**



**B) Barreirinhas - Alkanes + PAH genes:**



**Figura 3.** Proporção (% de seqüências X 10<sup>3</sup>) de genes relacionados à biodegradação de óleo determinados por análises metagenômicas para degradação de BTEX, alcanos e PAH na bacia de Barreirinhas. Fonte: Campeão et al., 2017.

A capacidade das comunidades microbianas de metabolizar hidrocarbonetos é também, provavelmente, acoplada com a disponibilidade de nitrogênio (Mason et al., 2014b). Quedas na concentração de nitrato durante experimentos de degradação de óleo sugerem intenso processo de denitrificação, possivelmente mediado por *Colwellia* (Mason et al., 2014a; Methe et al., 2005) e *Marinobacter* (Gauthier et al., 1992).

**5.2 ARQUÉIAS**

**Tabela 2.** Meia-vida dos hidrocarbonetos do petróleo. Adaptado de Wang et al. (2016).

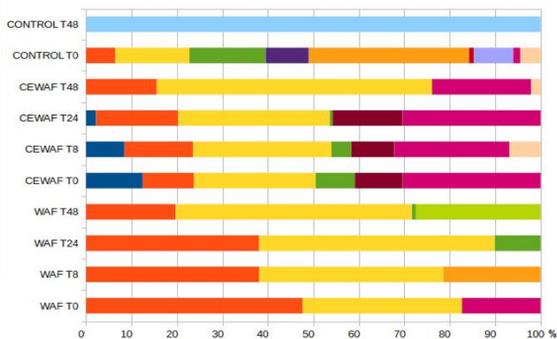
HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO	MEIA-VIDA
Alcanos (C9-C13)	~1-10 dias
Isoprenoides e alcanos (C14-C25)	~5-20 dias
Alcanos (>C25)	~15-70 dias
BTEX	~10 dias
PAH (2-3 anéis)	~10-70 dias
PAH (4-6 anéis)	~ 45-70 dias

A presença de arqueias redutoras de sulfato na subsuperfície de reservatórios de petróleo é reconhecida desde os primeiros estudos sobre comunidades microbianas nesses ambientes. A metanogênese, por sua vez, é um processo ubíquo em campos de óleo e várias arqueias metanogênicas já foram identificadas e isoladas de depósitos de óleo. Contudo, a descrição de degradação de óleo por arqueias é mais recente e descrita apenas para a família Halobacteraceae, que, de fato, mostrou-se como um dos mais importantes grupos de arqueias em estudos relacionados com a degradação de óleo (Al-Maillem et al., 2012; Bonfá et al., 2011; Erdoğmuş et al., 2013; Jurelevicius et al., 2014; Tapilatu et al., 2010; Wang et al., 2011b; Campeão et al., 2017). A participação de arqueias na biodegradação de óleo requer estudos adicionais, visto que os atuais estudos revelam tanto a capacidade de degradação de óleo dentro desse domínio, quanto a redução da diversidade e do crescimento. Apesar da habilidade de Halobacteraceae degradar compostos de óleo, incluindo alcanos e PAH, alguns grupos de arqueias podem ter diversidade e crescimento reduzido na presença de óleo (Röling et al., 2004). Por exemplo, *Nitrosopumillus maritimus* demonstrou sensibilidade a óleo em experimentos realizados com água do mar afetada pelo derramamento de óleo no Golfo do México em 2010 (Urakawa et al., 2012). Contudo, Redmond e Valentine (2012) não encontraram um efeito claro do óleo sobre a diversidade e o crescimento das arqueias, sugerindo que são necessários estudos adicionais para entender melhor o papel das arqueias na degradação de óleo (Al-Maillem et al., 2010; Bonfá et al., 2011; Erdoğmuş et al., 2013; Jurelevicius et al., 2014; Tapilatu et al., 2010; Wang et al., 2011a).

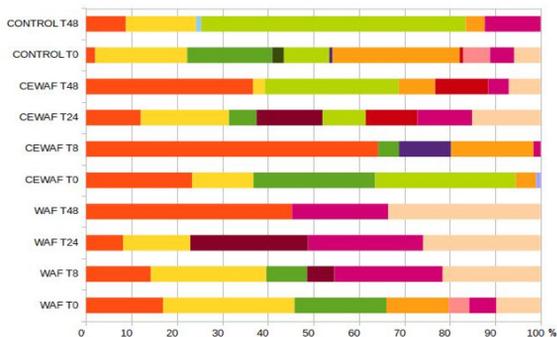
Bactérias quimiolitotróficas podem ser capazes de degradar hidrocarbonetos anaerobicamente ou utilizar subprodutos da degradação aeróbica de óleo como doadores de elétrons (Rabus, 2005). São escassos os estudos sobre arqueias degradadoras de óleo. A descoberta de vias anaeróbicas de degradação de óleo é relativamente recente em relação às aeróbicas e há certo foco na degradação aeróbica em decorrência das condições ambientais de requerimento de oxigênio em ambientes impactados. Esses fatores contribuem para que não se possa afirmar que exista a mesma relação entre arqueias quimiolitotróficas e degradação de óleo. Contudo, essa relação seria perfeitamente viável e coerente. Algumas arqueias quimiolitotróficas que são capazes de oxidar compostos orgânicos de enxofre, tais como Desulfurococcaceae e Thermoproteaceae (Burggraf et al., 1997; Zillig et al., 1982), bem como arqueias metanogênicas, incluindo Methanobacteraceae, Methanocellaceae, Methanoregulaceae, Methanosaetaceae, Methanosarcinaceae e Methanotermaceae (Garcia et al., 2000; Sakai et al., 2008; 2012), foram

abundantes em experimentos com óleo e com óleo e dispersante na foz do Amazonas e na bacia de Barreirinhas (Campeão et al., 2017). A presença de arqueias metanogênicas poderia significar uma restrição a um ambiente de condições anaeróbicas. Contudo, diversas espécies de arqueias metanogênicas (e.g. Halobacteraceae) são aeróbias ou anaeróbias facultativas. Além disso, embora níveis de oxigênio relativamente altos possam sugerir que tais processos não poderiam ocorrer, é possível que um microambiente subóxico possa ser gerado ao redor de partículas onde esses grupos de arqueias crescem. Este microambiente anaeróbico poderia ser resultado de uma intensa respiração de grupos que são observados em co-ocorrência com essas arqueias (arqueias conhecidas como degradadoras de óleo ou arqueias quimiolitotróficas que utilizam enxofre). Foi relatada a co-ocorrência de arqueias metanogênicas com Halobacteraceae, arqueia conhecida como degradadora de óleo, ao mesmo tempo que, na ausência de arqueias metanogênicas, Halobacteraceae só ocorreu no tratamento de óleo com dispersante (o qual possui um composto sulfurado) e na presença de arqueias quimiolitotróficas do enxofre (Campeão et al., 2017). A metanogênese é um processo já amplamente reconhecido como acoplado à biodegradação de óleo em comunidades sintróficas (Chang et al., 2006; Zengler et al., 1999; Mayumi et al., 2016). Por sua vez, a relação entre quimiolitotrofia e degradação de óleo ainda não é bem estabelecida. Contudo, a ampla distribuição de diversidade de quimiolitotróficos em ambientes de subsuperfície de reservatórios de óleo, bem como a sua expressividade em experimentos de degradação de óleo, sugere que essa relação é importante e requer estudos adicionais.

**A) Foz do Amazonas**



**B) Barreirinhas**

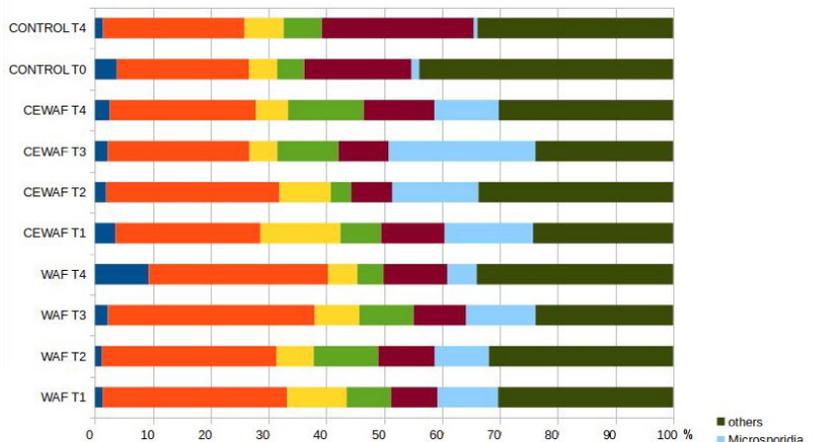


**Figura 4.** Composição da comunidade de arqueias a nível de família para água tratada com óleo (WAF) e com óleo e dispersante (CEWAF) nos tempos T1, T2, T3 e T4, determinada por análises metagenômicas na foz do Amazonas e na bacia de Barreirinhas. A comunidade de arqueias para as amostras controle de água profunda (sem óleo) são mostradas nos tempos T0 e T4. Fonte: Campeão et al., 2017.

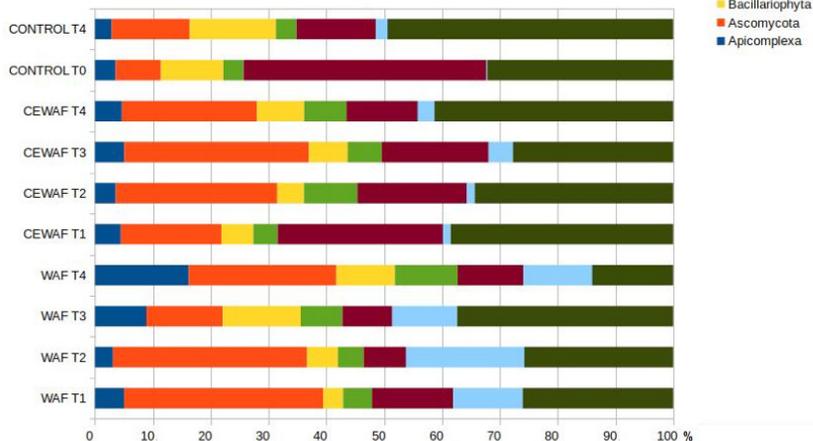
### 5.3 FUNGOS

É conhecida a capacidade dos fungos de metabolizar compostos de óleo, tais como alcanos (Van Hamme et al., 2003), BTEX (J. Yadav, 1993) e PAH (Cerniglia; Sutherland, 2001; 2006; 2010). Os principais filos conhecidos por metabolizar compostos de óleo são Microsporidia, Ascomycota e Basidiomycota (Harms et al., 2011). Fungos filamentosos tornam mais eficiente a utilização de óleo por bactérias através da formação de hifas que atuam como vias contínuas para bactérias com motilidade, ligando agregados de óleo (Banitz et al., 2011; Kohlmeier et al., 2005; Wick et al., 2007). Fungos lignolíticos e não lignolíticos podem metabolizar PAH, mas poucos são capazes de crescer com esses compostos como única fonte de carbono e energia (Cerniglia; Sutherland, 2010). A assembleia de fungos e bactérias parece facilitar a biodegradação de PAH (Boonchan et al., 2000; Wang et al., 2012). Contudo, a maioria dos estudos sobre fungos que metabolizam compostos de óleo foram realizados em solos e sedimentos. O principal filo conhecido por metabolizar compostos de óleo, Basidiomycota, habita ambientes terrestres e é raro em sistemas marinhos (Shearer et al., 2007). Pouco se sabe sobre fungos que podem degradar óleo em águas profundas e as possíveis relações ecológicas entre fungos e comunidades bacterianas (Harms et al., 2011; Leahy; Colwell, 1990; Passarini et al., 2011). O crescimento de fungos é induzido na presença de óleo e a abundância dos mesmos está relacionada ao tipo de composto metabolizado por eles. Ascomycota é extremamente versátil e capaz de metabolizar alcanos, BTEX e PAH (Harms et al., 2011), enquanto Microsporidia e Basidiomycota são conhecidos por metabolizar PAH (Cerniglia; Sutherland, 2001; 2006; 2010; Sutherland, 2004; Verdin et al., 2004; Harms et al., 2011), não obstante este último geralmente não possa usar PAHs como única fonte de carbono e energia (Cerniglia; Sutherland, 2001). Em estudos de degradação de óleo com águas profundas da foz do Amazonas e da bacia de Barreirinhas, a capacidade de metabolizar uma ampla gama de hidrocarbonetos foi condizente com a observada estabilidade na abundância relativa de Ascomycota durante o curso de experimentos de degradação de óleo, enquanto tendências a aumento na abundância relativa de Microsporidia e Basidiomycota no final dos mesmos experimentos estiveram em conformidade com o momento em que os PAH começam a ser degradados, considerando ainda que a menor expressividade na abundância de Basidiomycota pode ter sido decorrente da ausência de nutrientes adicionais (Campeão et al., 2017). Em geral, fungos não possuem vias especializadas de degradação de óleo, mas sim produzem enzimas multifuncionais envolvidas na degradação de uma ampla variedade de moléculas orgânicas, incluindo hidrocarbonetos aromáticos, compostos orgânicos clorados, bifenilos policlorados, aromáticos contendo nitrogênio e muitos outros pesticidas, corantes e xenobióticos (Harms et al., 2011). Entretanto, fungos e bactérias podem estabelecer parcerias para degradar óleo mais eficientemente. Algumas correlações positivas entre a abundância de sequências metagenômicas de bactérias conhecidas como degradadoras de óleo (e.g. Alcanivoracaceae e Alteromonadaceae) e fungos (e.g. Ascomycota e Basidiomycota) foi observada em experimentos de degradação de óleo (Campeão et al., 2017).

A) Foz do Amazonas



B) Barreirinhas



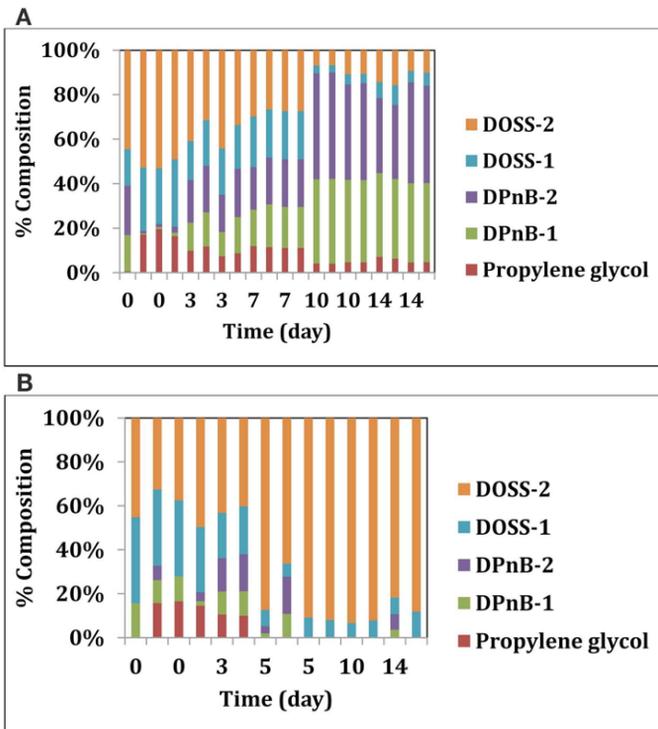
**Figura 5.** Composição da comunidade eucariótica a nível de família para água tratada com óleo (WAF) e com óleo e dispersante (CEWAF) nos tempos  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  e  $T_4$ , determinada por análises metagenômicas, na foz do Amazonas e na baía de Barreirinhas. A comunidade eucariótica para as amostras controle de água profunda (sem óleo) são mostradas nos tempos  $T_0$  e  $T_4$ . Fonte: Campeão et al., 2017.

6

VAZAMENTOS, DISPERSANTE E BIODEGRADAÇÃO

Abordagens ambientais desenhadas para acelerar a biodegradação de óleo são requeridas para mitigar o dano causado por derramamentos de óleo. Dispersantes são importantes ferramentas de resposta a vazamentos de óleo para estimular a biodegradação e são requeridos para mitigar os impactos causados no ecossistema pelos derramamentos de óleo. Eles aceleram

o processo natural de degradação microbiana de óleo através da dispersão do óleo em gotas de tamanho micron que se tornam sobrenadantes e diluídas o suficiente na coluna d'água de modo que os níveis naturais de oxigênio, fósforo e nitrogênio biologicamente disponíveis são suficientes para iniciar e sustentar o crescimento microbiano. A aplicação de dispersante reduz a tensão superficial do óleo e cria gotas menores do que aquelas formadas por dispersões naturais ou liberadas de afloramentos naturais, permitindo uma rápida biodegradação. O pequeno tamanho das gotas de óleo formadas também aumenta a área de superfície disponível para colonização microbiana e significativamente estimula a biodegradação; este foi o mais importante processo de remoção do óleo liberado no Grande Vazamento do Golfo do México – Deep Water Horizon (DWH) Oil Spill (Atlas; Hazen, 2011; Meckenstock et al., 2014; Vilcáez et al., 2013). Segundo a Corte Distrital dos Estados Unidos do Distrito Leste da Louisiana, 3,19 milhões de barris de petróleo foram liberados pelo poço de Macondo, no Golfo do México, em 2010 (Order issued by the United States District Court for the Eastern District of Louisiana, In re: Oil Spill by the Oil Rig “Deepwater Horizon” in the Gulf of Mexico on April 20, 2010, 2015). Aproximadamente 1,8 milhões de galões de dispersantes químicos, primariamente Corexit 9500, foram injetados na entrada do poço ou aplicados na superfície da água. Depois de um período de teste, o dispersante foi injetado na entrada do poço entre 15 de maio e 15 de julho de 2015, em um esforço para prevenir a formação de grandes manchas de superfície até o fechamento do poço (OSAT, 2010). Brevemente, após dois períodos de teste, o dispersante foi injetado continuamente, após 15 de maio, na entrada do poço MC252, até que o poço fosse fechado, em 15 de julho, 61 dias depois, para reter o óleo na coluna d'água e prevenir a formação de grandes manchas na superfície (Kujawinski et al., 2011). Estudos recentes de laboratório demonstraram que após um período de aproximada-



**Figura 6.** (A) Degradação de compostos do dispersante Corexit 9500 por *Colwellia RC25*. (B) Degradação de compostos do dispersante Corexit 9500 por *Alcanivorax 31*. Fonte: Chakraborty et al., 2012.

mente 60 dias, os micro-organismos endógenos do Golfo do México foram capazes de degradar completamente o óleo na presença de Corexit 9500 sob condições controladas de laboratório (Wang et al., 2016). O dispersante Corexit 9500 parece acelerar o processo de biodegradação, aumentando o número de micro-organismos degradadores de óleo, tais como *Oceanospirillales* e *Cycloclasticus*, levando à rápida degradação de hidrocarbonetos (Brakstad et al., 2015b). Contudo, estudos recentes indicaram que o dispersante Corexit 9500, na concentração de aproximadamente 19µg/L, pode afetar negativamente as bactérias degradadoras de óleo (Kleindienst et al., 2015). Adicionalmente, a viabilidade de colônias de *Marinobacter* foi testada sob a presença do dispersante e mostrou-se bastante reduzida, sugerindo que o dispersante pode ter um efeito tóxico sobre a microbiota (Hamdan; Fulmer, 2011). Por outro lado, o principal componente do dispersante Corexit é o dioctil-sulfossucinato de sódio (DOSS) (Kujawinski et al., 2011; Place et al., 2010; 2014), um substrato que pode ser metabolizado por *Colwellia* (Kleindienst et al., 2015). Assim, a partir de estudos prévios, não está claro se o dispersante Corexit 9500 poderia interferir na diversidade da comunidade microbiana e na velocidade da biodegradação de óleo.

## REFERÊNCIAS

- Al-Mailem, D.M.; Eliyas, M.; Radwan, S.S. (2012) Enhanced haloarchaeal oil removal in hypersaline environments via organic nitrogen fertilization and illumination. **Extremophiles**. 16, 751-758. doi:10.1007/s00792-012-0471-y.
- Al-Mailem, D.M.; Sorkhoh, N.A.; Al-Awadhi, H.; Eliyas, M.; Radwan, S.S. (2010) Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. **Extremophiles**. 14, 321-328. doi:10.1007/s00792-010-0312-9.
- Atlas, R.M.; Hazen, T.C. (2011) Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history. **Environ. Sci. Technol.** 45, 6709-6715.
- Banitz, T.; Fetzer, I.; Johst, K.; Wick, L.Y.; Harms, H.; Frank, K. (2011) Assessing biodegradation benefits from dispersal networks. **Ecol. Modell.** 222, 2552-2560. doi:10.1016/j.ecolmodel.2010.07.005.
- Bonfá, M.R.L.; Grossman, M.J.; Mellado, E.; Durrant, L.R. (2011) Biodegradation of aromatic hydrocarbons by Haloarchaea and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water. **Chemosphere**. 84, 1671-1676. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.05.005.
- Boonchan, S.; Britz, M.L.; Stanley, G.A. (2000) Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 1007-1019. doi:10.1128/AEM.66.3.1007-1019.2000.
- Brakstad, O.G.; Nordtug, T.; Throne-Holst, M. (2015a) Biodegradation of dispersed Macondo oil in seawater at low temperature and different oil droplet sizes. **Mar. Pollut. Bull.** 93, 144-152. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.02.006.
- Brakstad, O.G.; Throne-Holst, M.; Netzer, R.; Stoeckel, D.M.; Atlas, R.M. (2015b) Microbial communities related to biodegradation of dispersed Macondo oil at low seawater temperature with Norwegian coastal seawater. **Microb. Biotechnol.** 8, 989-998. doi:10.1111/1751-7915.12303.
- Burggraf, S.; Huber, H.; Regensburg, U. (1997) Reclassification of the Crenarchaeal orders and families.

**Int. J. Syst. Bacteriol.** 47, 657-660. doi:0020-7713/97/\$04.00+0.

Campeão, M.E.; Reis, L.; Leomil, L.; Oliveira, L.; Otsuki K.; Gardinali, P.; Pelz, O.; Valle, R.; Thompson, F.; Thompson C.C. (2017) The deep-sea microbial community from the Amazonian basin associated with oil degradation. **Frontiers in Microbiology**.

Cerniglia, C.E.; Sutherland, J.B. (2001) **Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi.**

Cerniglia, C.E.; Sutherland, J.B. (2006) Relative roles of bacteria and fungi in polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and bioremediation. **Fungi Biogeochem. Cycles.** 24, 182.

Cerniglia, C.E.; Sutherland, J.B. (2010) **Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi.** Springer.

Chang, W.; Um, Y.; Holoman, T.R.P. (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. **Biotechnol. Lett.** 28, 425-430. doi:10.1007/s10529-005-6073-3.

Chakraborty, R.; Borglin, S.E.; Dubinsky, E.A.; Andersen, G.L.; Hazen, T.C. (2012) Microbial response to the MC-252 oil and Corexit 9500 in the Gulf of Mexico. **Frontiers in Microbiology.** 3, 1-6. doi: 10.3389/fmicb.2012.00357.

Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects, N.R.C. (2003). **Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects.** Washington (DC): National Academies Press (US). doi:10.17226/10388.

Dyksterhouse, S.E.; Gray, J.P.; Herwig, R.P. (1995) *Cycloclasticus pugetii*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45, 116-123. doi:0020-7713/95/\$04.00+0.

Erdoğmuş, S.F.; Mutlu, B.; Korcan, S.E.; Güven, K.; Konuk, M. (2013) Aromatic hydrocarbon degradation by halophilic archaea isolated from Çamaltı Saltern, Turkey. **Water. Air. Soil Pollut.** 224. doi:10.1007/s11270-013-1449-9.

Garcia, J.L.; Patel, B.K.; Ollivier, B. (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. **Anaerobe.** 6: 205-226. doi:10.1006/anae.2000.0345.

Gauthier, M.J.; Christen, B.R.; Fernandez, L.; Acquaviva, M.; Bonin, J.-C.B. (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 42, 568-576.

Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O.P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 67, 503-549. doi:10.1128/MMBR.67.4.503.

Harms, H.; Schlosser, D.; Wick, L.Y. (2011) Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nat. Rev. Microbiol.** 9, 177-192. doi:10.1038/nrmicro2519.

Hazen, T.C.; Dubinsky, E.A.; DeSantis, T.Z.; Andersen, G.L.; Piceno, Y.M.; Singh, N. et al. (2010) Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. **Science.** (80-). 330, 204-208. doi:10.1126/science.1195979.

J. Yadav, C.R. (1993). Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59, 756-762.

Jurelevicius, D.; Almeida Couto, C.R.; Alvarez, V.M.; Vollú, R.E.; Almeida Dias, F.; Seldin, L. (2014) Response of the archaeal community to simulated petroleum hydrocarbon contamination in marine and hypersaline ecosystems. **Water. Air. Soil Pollut.** 225. doi:10.1007/s11270-014-1871-7.

Kniemeyer, O.; Musat, F.; Sievert, S.M.; Knittel, K.; Wilkes H.; Blumenberg, M.; Michaelis, W.; Classen, A.; Bolm, C.; Joye, S.B.; Widdel, F. (2007) Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. **Nature.** 449(7164), 898-901. doi: 10.1038/nature06200.

Kleindienst, S.; Seidel, M.; Ziervogel, K.; Grim, S.; Loftis, K.; Harrison, S. et al. (2015) Chemical dispersants can suppress the activity of natural oil-degrading microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 112, 14900-14905. doi:10.1073/pnas.1507380112.

Kohlmeier, S.; Smits, T.H.M.; Ford, R.M.; Keel, C.; Harms, H.; Wick, L.Y. (2005) Taking the fungal highway: Mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. **Environ. Sci. Technol.** 39, 4640-4646. doi:10.1021/es047979z.

Kujawinski, E.B.; Kido Soule, M.C.; Valentine, D.L.; Boysen, A.K.; Longnecker, K.; Redmond, M.C. (2011) Fate of dispersants associated with the Deepwater Horizon Oil Spill. **Environ. Sci. Technol.** 45, 1298-1306. doi:10.1021/es103838p.

Leahy, J.G.; Colwell, R.R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiol. Rev.** 54, 305-315. doi:0146-0749.

Louisiana, U.S.D.C.F.T.E.D.O. (2010) **Findings of fact and conclusions of law phase two trial.** 1-44. Available at: <<http://www.laed.uscourts.gov/sites/default/files/OilSpill/Orders/1152015FindingsPhaseTwo.pdf>>.

Magot, M. (2005) Indigenous microbial communities in oil fields. In: **Petroleum Microbiology.** American Society of Microbiology. 21-33.

Mason, O.U.; Han, J.; Woyke, T.; Jansson, J.K. (2014a) Single-cell genomics reveals features of a *Colwellia* species that was dominant during the Deepwater Horizon oil spill. *Front. Microbiol.* 5, 1-8. doi:10.3389/fmicb.2014.00332.

Mason, O.U.; Scott, N.M.; Gonzalez, A.; Robbins-Pianka, A.; Bælum, J.; Kimbrel, J. et al. (2014b) Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. **ISME J.** 8, 1464-1475. doi:10.1038/ismej.2013.254.

Mayumi, D.; Mochimaru, H.; Tamaki, H.; Yamamoto, K.; Yoshioka, H.; Suzuki, Y.; Kamagamayumi, D.; Mochimaru, H.; Tamaki, H.; Yamamoto, K.; Yoshioka, H.; Suzuki, Y.; Kamagata, Y.; Sakata, S. (2016) Methane production from coal by a single methanogen. **Science.** 354(6309), 222-225. doi:10.1126/science.aaf8821.

Meckenstock, R.U.; Von Netzer, F.; Stumpp, C.; Lueders, T.; Himmelberg, A.M.; Hertkorn, N. et al. (2014) Water droplets in oil are microhabitats for microbial life. **Science.** (80-. ). 345, 673-676.

Methe, B.A.; Nelson, K.E.; Deming, J.W.; Momen, B.; Melamud, E.; Zhang, X.J. et al. (2005) The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 102, 10913-10918. doi: 10.1073/Pnas.0504766102.

National Response Team (US) (2011) **On scene coordinator report - Deepwater Horizon oil spill.**

O.S.A.T. (2010) **Summary report for sub sea and sub surface oil and dispersant detection.** US Coast Guard.

Order issued by the United States District Court for the Eastern District of Louisiana (2015). In re: **Oil Spill by the Oil Rig "Deepwater Horizon" in the Gulf of Mexico on April 20, 2010.** 1-44. Available at: <<http://www.laed.uscourts.gov/sites/default/files/OilSpill/Orders/1152015FindingsPhaseTwo.pdf>>.

Passarini, M.R.Z.; Rodrigues, M.V.N.; Silva, M.; Sette, L.D. (2011) Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Mar. Pollut. Bull.** 62, 364-370. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.10.003.

Place, B.; Anderson, B.; Mekebr, A.; Furlong, E.T.; Gray, J.L.; Tjeerdema, R. et al. (2010) A role for analytical chemistry in advancing our understanding of the occurrence, fate, and effects of Corexit oil dispersants. **Environ. Sci. Technol.** 44, 6016-6018. doi:10.1021/es102319w.

Place, B.J.; Perkins, M.J.; Sinclair, E.; Barsamian, A.L.; Blakemore, P.R.; Field, J.A. (2014) Trace analysis of surfactants in Corexit oil dispersant formulations and seawater. **Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.** 129, 273-281. doi:10.1016/j.dsr2.2014.01.015.

Planckaert, M. (2005) Oil reservoirs and oil production. In: Petroleum microbiology. **American Society of Microbiology.** 3-19.

Prince, R.C. (2005) The microbiology of marine oil spill bioremediation. In: **Petroleum microbiology.** American Society of Microbiology. 317-335.

Redmond, M.; Valentine, D. (2012) Natural gas and temperature structured a microbial community response to the Deepwater Horizon oil spill. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 109, 20292-20297. doi:10.1073.

Röling, W.F.M.; Couto de Brito, I.R.; Swannell, R.P.J.; Head, I.M. (2004) Response of archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. **Appl. Environ. Microbiol.** 70, 2614-2620. doi:10.1128/AEM.70.5.2614-2620.2004.

Sakai, S.; Ehara, M.; Tseng, I.C.; Yamaguchi, T.; Bräuer, S.L.; Cadillo-Quiroz, H. et al. (2012) *Methanolinea mesophila* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil, and proposal of the archaeal family Methanoregulaceae fam. nov. within the order Methanomicrobiales. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 62, 1389-1395. doi:10.1099/ijs.0.035048-0.

Sakai, S.; Imachi, H.; Hanada, S.; Ohashi, A.; Harada, H.; Kamagata, Y. (2008) *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage "Rice Cluster I", and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58, 929-936. doi:10.1099/ijs.0.65571-0.

Shearer, C.A.; Descals, E.; Kohlmeyer, B.; Kohlmeyer, J.; Marvanová, L.; Padgett, D. et al. (2007) Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodivers. Conserv.** 16, 49-67. doi:10.1007/s10531-006-9120-z.

Silva, A.; Araujo, M.; Medeiros, C.; Silva, M.; Bourles, B. (2005) Seasonal changes in the mixed and barrier layers in the Western Equatorial Atlantic. **Brazilian J. Oceanogr.** 53, 83-98. doi:10.1590/S1679-87592005000200001.

Sutherland, J.B. (2004) Degradation of hydrocarbons by yeast and filamentous fungi. **Fungal Biotechnol. Agric. Food Environ. Appl.**

Tapilatu, Y.H.; Grossi, V.; Acquaviva, M.; Militon, C.; Bertrand, J.C.; Cuny, P. (2010) Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). **Extremophiles.** 14, 225-231. doi:10.1007/s00792-010-0301-z.

Urakawa, H.; Garcia, J.C.; Barreto, P.D.; Molina, G.A.; Barreto, J.C. (2012) A sensitive crude oil bioassay indicates that oil spills potentially induce a change of major nitrifying prokaryotes from the Archaea to the Bacteria. **Environ. Pollut.** 164, 42-45. doi:10.1016/j.envpol.2012.01.009.

Verdin, A.; Sahraoui, A.L.H.; Durand, R. (2004) Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 53, 65-70. doi:10.1016/j.ibiod.2003.12.001.

Vilcáez, J.; Li, L.; Hubbard, S.S. (2013) A new model for the biodegradation kinetics of oil droplets: application to the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico. **Geochem. Trans.** 14, 1-14. doi:10.1186/1467-4866-14-4.

Wang, J.; Sandoval, K.; Ding, Y.; Stoeckel, D.; Minard-Smith, A.; Andersen, G.; et al. (2016) Biodegradation of dispersed Macondo crude oil by indigenous Gulf of Mexico microbial communities. **Sci. Total Environ.** 557-558, 453-468. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.03.015.

Wang, S.; Nomura, N.; Nakajima, T.; Uchiyama, H. (2012) Case study of the relationship between fungi

and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. **J. Biosci. Bioeng.** 113, 624-630. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.01.005.

Wang, X.; Han, Z.; Bai, Z.; Tang, J.; Ma, A.; He, J.; et al. (2011) Archaeal community structure along a gradient of petroleum contamination in saline-alkali soil. **J. Environ. Sci.** 23, 1858-1864. doi:10.1016/S1001-0742(10)60640-7.

Wick, L.Y.; Remer, R.; Würz, B.; Reichenbach, J.; Braun, S.; Schäfer, F. et al. (2007) Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. **Environ. Sci. Technol.** 41, 500-505. doi:10.1021/es061407s.

Yakimov, M.M.; Moore, E.R.B. (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 339-348.

Yakimov, M.M.; Timmis, K.N.; Golyshin, P.N. (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.** 18: 257-266. doi:10.1016/j.copbio.2007.04.006.

Zengler, K.; Richnow, H.H.; Rosselló-Mora, R.; Michaelis, W.; Widdel, F. (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. **Nature.** 401(6750): 266-9. doi:10.1038/45777.

Zillig, W.; Stetter, K.O.; Prangishvili, D.; Schäfer, W.; Wunderl, S.; Janekovic, D. et al. (1982) Desulfurococcaceae, the second family of the extremely thermophilic, anaerobic, sulfur-respiring Thermoproteales. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abteilung, Originalien, Angewandte und Ökologische Mikrobiologie.** 3: 304-317. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0721-9571(82)80044-6.





# MEDIÇÃO E MONITORAMENTO EM OCEANOGRAFIA

Carina Stefoni Böck<sup>a</sup>

Raquel Toste<sup>a</sup>

Daiane Gracieli Faller<sup>a</sup>

Luiz Paulo de Freitas Assad<sup>a</sup>

Luiz Landau<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

## RESUMO

Os oceanos representam uma fonte inesgotável de estudos para a biotecnologia marinha. Diversos compostos derivados de organismos marinhos têm sido utilizados em aplicações farmacêuticas, nutricionais, médicas, cosméticas e tecnológicas. As recentes descobertas biotecnológicas aliadas ao potencial, ainda subexplorado, do oceano e dos seus recursos têm impulsionado muitos cientistas a desenvolver pesquisas relacionadas à caracterização e ao entendimento sobre as propriedades e os processos que ocorrem no oceano. O objetivo deste capítulo é fornecer uma visão geral sobre as técnicas que podem ser utilizadas para medir e monitorar algumas das mais importantes variáveis oceanográficas. Inicialmente, são explicados os principais processos físicos associados à circulação oceânica. Em seguida, são descritos os métodos de medição e de monitoramento mais empregados em pesquisas oceanográficas. Ao final do capítulo, apresentam-se as perspectivas em relação aos avanços tecnológicos na área de observação oceânica e dos aspectos que os integram à biotecnologia marinha.

# 1 | PROCESSOS FÍSICOS NO OCEANO

Duas das mais importantes propriedades físicas da água do mar são a temperatura e a salinidade. Juntamente com a pressão hidrostática, que é a pressão exercida em um determinado nível (ou profundidade) pela coluna d'água acima dele, controlam a densidade da água do mar. Em profundidades próximas à superfície, as variações de temperatura são causadas principalmente pelos fluxos de calor na interface ar-água, o que pode ser causado por aquecimento, resfriamento ou difusão. Variações de salinidade são provocadas através da adição, pela precipitação, ou através da remoção, pela evaporação, de água doce nos oceanos. O influxo e o efluxo também podem ocorrer pela mudança de estado físico da água, como, por exemplo, no derretimento e na formação de gelo em regiões polares. A temperatura (potencial) e a salinidade são chamadas de propriedades conservativas da água do mar, uma vez que abaixo das camadas superficiais do oceano, onde ambas estão sujeitas às influências atmosféricas, o único processo capaz de alterar suas propriedades é a mistura entre águas.

Variações na temperatura, na salinidade e na pressão promovem modificações na densidade da água do mar. Em águas superficiais, a temperatura e a salinidade são os principais fatores que influenciam essa densidade. A importância da pressão sobre a densidade aumenta com o aumento de profundidade, uma vez que a água do mar não é totalmente incompressível. De uma forma bastante simplificada, a densidade diminui com o aumento de temperatura e aumenta com o aumento de salinidade e pressão.

A distribuição da densidade na coluna d'água, caracterizada pelo aumento de densidade com o aumento de profundidade, proporciona a estabilidade vertical do oceano. No meio fluido, qualquer porção que seja mais densa do que o fluido ao seu redor tende a afundar até encontrar uma zona onde a densidade seja a mesma da partícula que está afundando. Se há um aumento de densidade com a profundidade, como ocorre na maior parte do oceano, não há tendência para misturas verticais espontâneas, portanto há a estabilidade.

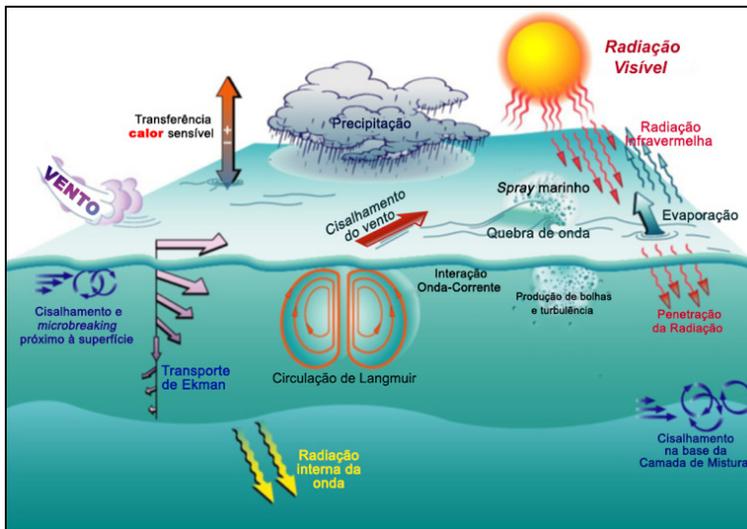
Muito do comportamento do oceano é resultado desse estado de estabilidade vertical, o qual é o fator mais importante no controle dos movimentos verticais das águas oceânicas. Para promover a circulação do oceano, portanto, são necessárias condições capazes de romper sua estabilidade vertical. Essas condições ocorrem através dos efeitos de agentes externos, como o Sol e a atmosfera, sentidos nas camadas superficiais do oceano, e de processos internos, como a mistura turbulenta, que ocorrem em todas as profundidades (Figura 1).

Dentre os movimentos que ocorrem no oceano, podem ser destacados os movimentos horizontais, relacionados às correntes e às ondas, e os movimentos verticais, associados aos marés. De maneira geral, eles resultam e são influenciados pela distribuição das propriedades físicas da água do mar, temperatura e salinidade, e pela força exercida por agentes externos, como o vento, o Sol e a Lua, sobre o oceano.

Correntes são associadas a parcelas d'água que possuem relativa uniformidade de velocidade e transporte líquido em uma direção definida. São formadas através dos efeitos da

radiação solar, do estresse exercido pelo vento sobre a superfície do oceano e dos movimentos horizontais gerados pelas marés. Por isso, podem ser classificadas como: correntes de convecção, que ocorrem em função da distribuição de densidade e de pressão; correntes de deriva, iniciadas e mantidas pelo arrasto friccional entre o vento e a superfície oceânica, e correntes de maré, formadas pelas marés.

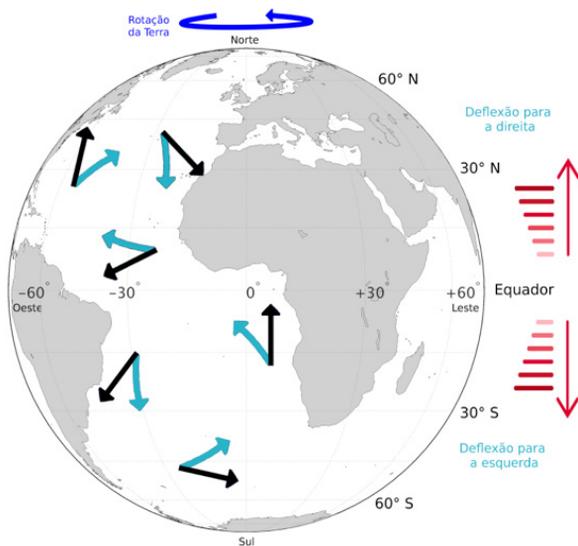
Todas as correntes, tanto superficiais como subsuperficiais, existem como resultado da ação de forças físicas, que podem ser divididas nas forças que impulsionam o movimento ou forças primárias (gravidade, distribuição de massa ou diferenças de pressão e o estresse tangencial do vento sobre a superfície) e nas forças que surgem como resultado do movimento ou forças secundárias (o arrasto friccional entre as partículas de água e entre a água e outras superfícies, como o fundo oceânico, a força centrífuga e a Força de Coriolis).



**Figura 1.** Representação esquemática dos diversos processos físicos que ocorrem nas camadas superficiais dos oceanos, devido à interação oceano-atmosfera, ao movimento de rotação da Terra e à incidência solar, e nas camadas profundas, gerados pela interação entre diferentes forças. Modificado de: Chereskin e Howe (2007).

Dentre as forças secundárias, cabe ressaltar a força de Coriolis (Figura 2), a força de deflexão causada pelo movimento de rotação da Terra. A força de Coriolis é nula ou quase nula no Equador e aumenta com o aumento de latitude. Isso quer dizer que um volume de água transportado ao longo da linha do Equador continuará seu percurso sem que haja uma deflexão aparente de sua direção. Porém, ao norte ou ao sul da linha equatorial, esse percurso é desviado. Nos polos ocorre o maior grau de deflexão nas correntes. Muitas das maiores correntes do oceano circulam em torno de áreas quentes e de alta pressão, chamadas de giros oceânicos, que ocorrem em função da deflexão dessas correntes causada pelo efeito Coriolis.

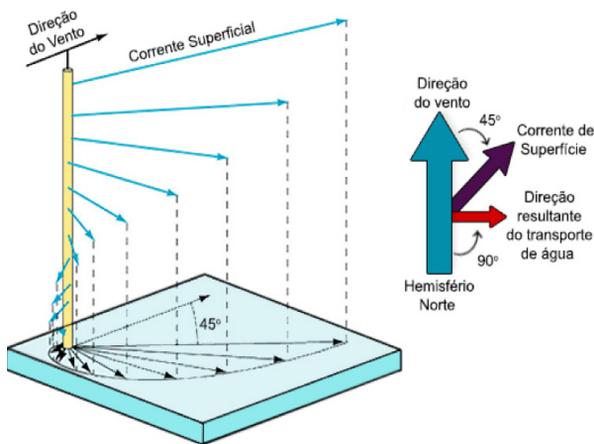
As correntes de convecção são as principais componentes da circulação oceânica de grande escala. Os processos de movimentos convectivos ocorrem mais intensamente em regiões polares. O aumento da densidade da água superficial nessas regiões, resultante do intenso resfriamento da água ou do aumento de salinidade causado pela formação do gelo, favorece a circulação vertical, uma vez que essa água densa afundará até atingir uma profundidade de mesma densidade. Esse processo é responsável pela origem de algumas massas d'água, que são porções de água que apresentam temperatura e salinidade características, que somente serão



**Figura 2.** Representação esquemática do efeito de Coriolis sobre as correntes oceânicas através da deflexão (setas azuis) à esquerda da direção original do movimento (setas pretas) no Hemisfério Sul e à direita no Hemisfério Norte. As setas em vermelho ressaltam a variação na intensidade da força ao longo das latitudes, sendo nula no Equador e máxima nos polos.

alteradas caso ocorra a mistura com águas adjacentes.

O comportamento das correntes de deriva, desconsiderando qualquer outra força que possa produzir correntes, pode ser descrito pela teoria de Ekman (Figura 3). Segundo essa teoria, o estresse tangencial exercido pelo vento sobre a superfície do oceano resulta em um movimento da camada de água superficial em um ângulo aproximado de 45° à direita, no Hemisfério Norte, ou à esquerda, no Hemisfério Sul, da direção do vento. Com o movimento superficial da água é desenvolvida uma tensão de atrito com a camada imediatamente abaixo dela, que por sua vez também irá se mover para a direita (Hemisfério Norte) ou esquerda (Hemisfério Sul) em relação à camada superior, porém com uma velocidade menor e em um ângulo maior. Isso acontecerá ao longo das profundidades até que a velocidade seja nula. A camada onde se desenvolve esse padrão é chamada de camada de Ekman, que é a camada friccional onde ocorrem somente os processos físicos de atrito e aceleração de Coriolis. Por se assemelhar com uma espiral, esse comportamento é chamado de espiral de Ekman.



**Figura 3.** Representação esquemática da espiral de Ekman, que caracteriza o perfil vertical de velocidades na coluna d'água gerado a partir de ação do vento sobre a superfície oceânica. Na figura, a circulação resultante para o Hemisfério Norte.

As correntes de maré são movimentos horizontais gerados pelas marés. As marés são definidas como movimentos verticais periódicos da superfície do mar diretamente relacionados aos efeitos gravitacionais da Lua e do Sol. Em um determinado local, a maré é a manifestação local de movimentos de ondas de larga escala e de longo período, chamadas de ondas de maré. Um período de maré inclui tanto o aumento como a diminuição do nível do mar, fazendo com que durante um período de maré seja observada a reversão da direção das correntes de maré. Considerando a direção de propagação de ondas de maré progressivas, que ocorrem na maior parte dos oceanos e correspondem a ondas superficiais onde há o movimento horizontal de cristas (pontos mais altos da onda) e cavados (pontos mais baixos da onda), as correntes de maré promovem o transporte de água em direção à crista da onda e em direção oposta ao cavado.

Ondas, ao contrário das correntes, são caracterizadas pelo movimento horizontal onde não há transporte líquido, ou seja, o vetor soma das velocidades instantâneas individuais de uma dada partícula ao longo de um intervalo de tempo será zero. As ondas são deformações periódicas em uma interface como, por exemplo, a superfície do mar. O estímulo causado através de um determinado distúrbio irá criar uma deformação da superfície do oceano através da perturbação do equilíbrio inicial das partículas de água. Nas ondas não ocorre transporte de matéria, mas sim a propagação da energia que ocasionou a deformação. Ao sofrer o desequilíbrio, as partículas irão desenvolver um movimento oscilatório ou orbital (circular em águas profundas e elipsoidal em águas rasas), permanecendo, em média, na mesma posição. Após a perturbação, as partículas tendem a voltar ao equilíbrio novamente através de um mecanismo de restauração.

As ondas podem ser classificadas através das forças de distúrbio e das forças restauradoras que nelas atuam. As forças de distúrbio, que representam a energia que forma as ondas, podem ser o vento, eventos geológicos e a atração gravitacional e a rotação da Terra. As forças restauradoras podem ser a coesão entre as moléculas de água ou a gravidade, e representam as forças que trazem as partículas de água para a sua posição original na coluna d'água. Através dessas forças, distinguem-se as ondas oceânicas como ondas capilares (vento/coesão entre as moléculas de água), ondas geradas pelo vento (vento/gravidade), ondas sísmicas (eventos sísmicos/gravidade) e maré (atração gravitacional e rotação da Terra/gravidade), esta última apresentada nos parágrafos anteriores.

A descrição de uma feição, processo ou movimento do oceano pode ser feita em termos dos atributos ou variáveis que os caracterizam. Genericamente, por exemplo, as correntes podem ser descritas em termos de velocidade e direção, que são indicativos da intensidade da corrente; as marés, em termos da variação do nível do mar; as massas d'água, através da distribuição de temperatura e salinidade; e as ondas, pelo seu período, que representa o intervalo de tempo que duas cristas (ou cavados) sucessivas levam para passar em um ponto fixo, e a sua altura, que é a distância vertical entre a base do cavado e o topo da crista.

Para a caracterização de uma determinada variável físico-química da água do mar ou da hidrodinâmica do oceano, como a temperatura em uma determinada profundidade ou a velocidade de uma corrente, por exemplo, deve ser considerado que estas variam ao longo do tempo e do espaço. Próximo à superfície oceânica, onde há a maior influência dos agentes externos

(como a radiação solar e as condições atmosféricas) sobre o oceano, as propriedades variam mais rapidamente e, em função das mudanças regionais que esses agentes possuem, são observadas diferenças regionais nas propriedades. Em profundidade, por outro lado, as propriedades são mais uniformes, principalmente em grandes profundidades. Além disso, flutuações periódicas (ou cíclicas), como os ciclos anuais e diurnos da insolação solar e os ciclos diurnos e semidiurnos das marés, e aperiódicas dos agentes externos imprimem variações similares nas propriedades oceânicas.

O entendimento sobre a distribuição e o comportamento de uma determinada variável oceânica ao longo do tempo e do espaço, bem como dos fatores ou processos que os proporcionam e os mantêm, depende de investigações teóricas, experimentais e observacionais. As investigações observacionais podem proporcionar uma descrição quantitativa e sistemática das características do oceano. Tais informações são essenciais, uma vez que possibilitam o aumento dos conhecimentos científicos sobre os processos físico-químicos e hidrodinâmicos e fornecem informações para o desenvolvimento de novas teorias sobre seus aspectos, que podem sugerir melhores e mais eficazes formas para as medições do oceano.

## 2

## O QUE SÃO A MEDIÇÃO E O MONITORAMENTO OCEANOGRÁFICO

O oceano é dinâmico e, portanto, suas propriedades, seus processos e os fenômenos que nele ocorrem variam espacialmente, tanto em superfície quanto em profundidade, e em diversas escalas de tempo, como sazonais, interanuais e interdecadais. O conhecimento sobre seu comportamento nos leva a entender uma série de importantes processos, tais como as causas, a frequência e o comportamento de florações (*blooms*) de algas tóxicas e de ressurgências costeiras, e de variações de parâmetros oceanográficos, como o nível do mar e a temperatura da água, provocadas por fenômenos climáticos naturais, como o ENSO (*El Niño Southern Oscillation*), e por mudanças climáticas causadas pelo aquecimento global.

Nesse contexto, o monitoramento oceanográfico consiste no acompanhamento da variação, no tempo e/ou no espaço, de um determinado parâmetro físico (como transparência e temperatura), químico (como pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido) ou biológico (como o zooplâncton e o fitoplâncton) da água do mar ou de alguma variável que descreva a dinâmica do oceano, como a direção e a velocidade de correntes. Para que o monitoramento possa ser realizado, é necessária a observação do parâmetro oceanográfico de interesse, através de coletas ou medições, em escalas ou resoluções temporal e espacial adequadas, que podem ser combinadas a modelos numéricos computacionais para simular e prever o comportamento do fenômeno associado.

As técnicas utilizadas para a detecção de parâmetros oceanográficos podem ser divididas em: medições *in situ*, em que o equipamento ou sensor que faz a medição está posicionado diretamente no ponto de interesse e em contato com o meio no qual o parâmetro será medido, e medições remotas, aquelas em que o medidor está localizado a alguma distância do meio.

Dentre os inúmeros sensores que realizam medições remotas e *in situ* utilizados para estudos oceanográficos atuais, especialmente aqueles associados ao ramo crescente da Oceanografia Operacional, destacam-se os sensores instalados em satélites, derivadores de superfície e veículos autônomos subaquáticos (AUVs, *autonomous underwater vehicles*). As medições realizadas pelos sensores instalados nesses equipamentos permitem obter informações sobre a temperatura e a salinidade da água, correntes, ondas e diversos outros parâmetros, tanto na superfície como em diferentes profundidades da coluna d'água, conforme será apresentado ao longo do presente capítulo.

## 2.1 HISTÓRICO

Desde a metade do século XIX, quando os cientistas começaram a observar o oceano e desenvolver estudos sobre seus aspectos, diversos tipos de instrumentos passaram a ser criados com o intuito de observar e registrar os fenômenos oceanográficos e caracterizar a estrutura da coluna d'água em termos de suas propriedades físicas, especialmente temperatura e salinidade, químicas e biológicas e dos movimentos oceânicos.

As primeiras medições dessas propriedades ficaram restritas à superfície. Nas amostras, coletadas com balde, a temperatura era medida com termômetros de mercúrio simples e a salinidade era determinada através de titulação. Aos poucos esse método foi sendo aperfeiçoado, até que esses tipos de termômetros fossem substituídos por termômetros de máxima e mínima e a água passasse a ser coletada em garrafas de amostragem.

Para entender o oceano como um todo, além da camada superficial, é necessário entender também como suas propriedades variam em função da profundidade, em toda a extensão da coluna d'água. A primeira amostragem sistemática, ou monitoramento, das propriedades de subsuperfície do oceano, foi feita por volta de 1910, por meio de garrafas de fechamento automático capazes de coletar amostras de água em uma determinada profundidade, como a garrafa de Nansen, e termômetros. Os equipamentos eram fixados a diversos níveis de um cabo, que era mergulhado na coluna d'água desde a superfície até a profundidade máxima desejada, em um determinado ponto, normalmente a partir de navios. A recuperação das amostras de água a partir de profundidades definidas permitia a determinação laboratorial de outras propriedades da água oceânica, tais como salinidade, nutrientes (nitratos dissolvidos, nitritos, fosfatos e silicatos) e oxigênio dissolvido. Nesse método de monitoramento, a profundidade na qual a amostra de água havia sido coletada era estimada através da diferença entre as temperaturas de dois termômetros: um selado a vácuo e, portanto, protegido da pressão exercida pela coluna d'água do oceano, e outro exposto à pressão.

Registros contínuos ao longo da coluna d'água, e não apenas em pontos discretos de amostragem, foram alcançados a partir de 1940, através da invenção do batitermógrafo mecânico. Esse instrumento era uma espécie de registrador de temperatura da água, utilizado para medir a temperatura e a pressão hidrostática a até 200 metros de profundidade. Na década de 1960 foi desenvolvido o batitermógrafo descartável, que substituiu o batitermógrafo mecânico.

A instrumentação oceanográfica eletrônica foi introduzida a partir de meados da década de 1960. Os aparelhos conhecidos como STD (*salinity, temperature and depth*) e CTD (*con-*

*ductivity, temperature and depth*) revolucionaram esse campo, possibilitando a obtenção de medições de perfis verticais, de alta resolução, de temperatura, condutividade (salinidade) e profundidade. Atualmente o CTD ainda é amplamente utilizado em levantamentos oceanográficos com a mesma finalidade.

Em 1964, pesquisadores se reuniram na Woods Hole Oceanographic Institution para a primeira conferência sobre a Oceanografia Espacial, discutindo os aspectos e os métodos que possibilitariam a medição remota de parâmetros do oceano através de sensores instalados em satélites. Após alguns anos, no final da década de 1970, a temperatura da superfície do mar (TSM) foi o primeiro parâmetro oceanográfico medido e monitorado globalmente a partir de satélites de sensoriamento remoto.

No final da década de 1980, quando surgiu a técnica de altimetria espacial, que possibilitou a medição remota da altura da superfície do mar (ASM), o monitoramento global e operacional dos oceanos foi impulsionado, levando ao desenvolvimento da Oceanografia Operacional e dos métodos associados, tais como a assimilação de dados em modelos numéricos oceânicos.

Atualmente, os avanços científicos e tecnológicos possibilitaram o desenvolvimento de equipamentos sofisticados e a medição local e remota de alta resolução espacial e temporal de uma variedade de importantes parâmetros oceanográficos, tais como a temperatura e a cor da água do mar, a direção e a velocidade das correntes oceânicas em superfície e em diferentes profundidades da coluna d'água, que alimentam, em tempo real ou quase-real, modelos numéricos computacionais, os quais podem representar e prever o estado do oceano, possibilitando uma visão integrada de seus aspectos.

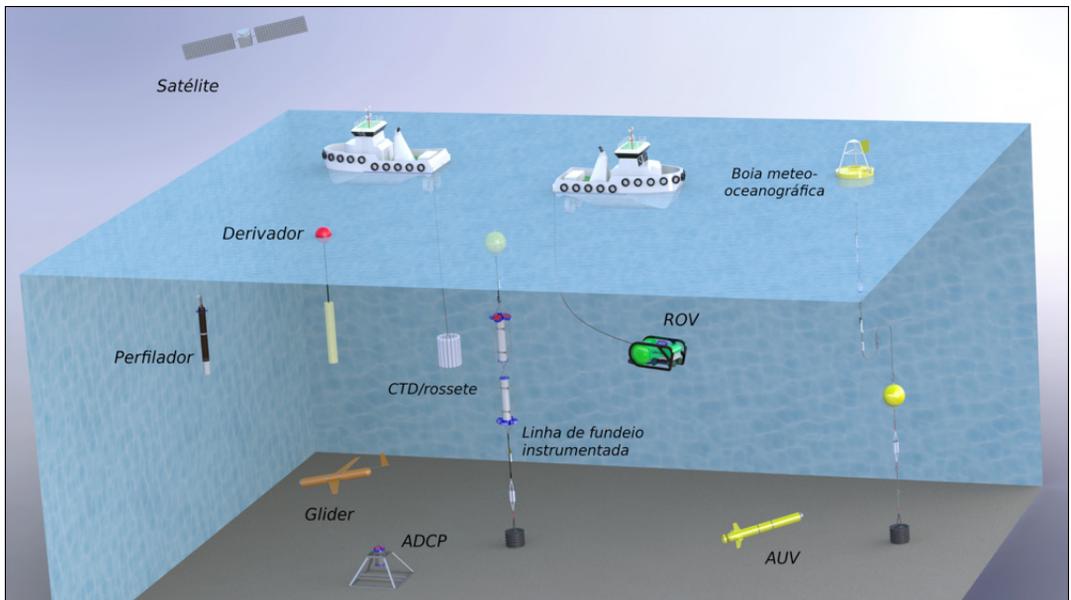
## **2.2 ALGUNS EXEMPLOS DE ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA**

Biossensores são dispositivos analíticos compactos, construídos através da associação ou da integração entre elementos biológicos sensíveis, tais como enzimas, anticorpos, micro-organismos ou ácido nucléico, e um transdutor físico-químico (eletroquímico, ótico, colorimétrico ou piezelétrico), com o objetivo de obter um sinal mensurável. Nesse sistema, o transdutor converte o sinal biológico, resultante de uma reação bioquímica específica entre o elemento biológico imobilizado na superfície do sensor e o elemento a ser detectado, em um sinal elétrico mensurável. Esse sinal normalmente é proporcional à concentração da substância (ou grupo de substâncias) a qual o biossensor é específico. O desempenho e a especificidade de um biossensor dependem do método e da eficiência da imobilização do elemento biológico ao transdutor, uma vez que é essa ligação que efetivamente permitirá a transformação da resposta bioquímica em sinal físico. Métodos tradicionais de imobilização de biomoléculas incluem ligação covalente, adsorção física e química, encapsulamento, oclusão e interações cruzadas. A adsorção física é o método mais simples de imobilização, no qual as células microbianas são imobilizadas em função de interações adsorptivas, tais como iônica, polar, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, entretanto um dos métodos de imobilização mais utilizados para a construção de biossensores é a ligação covalente.

Apesar de a maioria dos biossensores ainda ser utilizados para medições em laboratório, desde a década de 1970, pesquisas buscam desenvolver biossensores adequados para medições *in situ* em sistemas aquáticos, como rios, lagos e oceanos. Medições *in situ* de algumas propriedades na coluna d'água, como concentração de oxigênio dissolvido, gás carbônico, sulfeto de hidrogênio, nitrito, nitrato e metais-traços, já foram realizadas por biossensores. Para o monitoramento oceanográfico operacional, biossensores adequados podem ser integrados ao sistema de observação, realizando medições de alta resolução e aplicadas a estudos sobre diferentes aspectos oceanográficos, tais como eutrofização (nitrato, nitrito e fosfato), segurança alimentar (toxinas de algas e patógenos), detecção e/ou taxonomia de organismos marinhos (ácidos nucleicos) e detecção de poluentes ambientais (pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, esteroides, entre outros) e metais-traço (como cádmio, cobre, mercúrio, ferro e zinco).

### 2.3 ABORDAGENS METODOLÓGICAS

Nos tópicos subsequentes, são apresentadas algumas das técnicas de medição de variáveis oceanográficas, também chamadas de métodos de observação do oceano, de maior relevância para os estudos e os desenvolvimentos atuais da área da Oceanografia. Essas técnicas foram divididas em técnicas remotas e *in situ* e podem ser aplicadas para a medição das mais importantes variáveis utilizadas para descrever o estado do oceano em superfície e em profundidade. A figura 4 traz uma visão geral esquemática sobre as plataformas de medição de dados oceanográficos apresentadas neste item.



**Figura 4.** Figura esquemática de algumas das plataformas remotas e *in situ* utilizadas para a medição de parâmetros oceanográficos.

### 2.3.1 MEDIÇÃO REMOTA

A detecção remota, também conhecida como sensoriamento remoto, é definida como a ciência e a arte de obter informações sobre um objeto, área ou fenômeno através da análise de dados adquiridos por um dispositivo que não está em contato com o objeto, área ou fenômeno sob investigação.

As técnicas de sensoriamento remoto podem ser classificadas de acordo com o tipo da técnica de detecção utilizada pelo sensor; com a resolução espacial; com o tipo de plataforma onde o sensor está instalado, entre outras. Dentre as diversas plataformas que podem ser utilizadas para o sensoriamento remoto, tais como navios, aeronaves, balões meteorológicos e sondas, para a Oceanografia destacam-se as medições realizadas através de sensores a bordo de satélites artificiais. Esse tipo de medição possibilita um monitoramento contínuo, global, de alta resolução espacial e temporal e em tempo quase-real de variáveis extremamente importantes para diversos estudos associados ao entendimento sobre a variabilidade e a dinâmica dos oceanos: TSM, ASM, velocidade dos ventos sobre a superfície do mar, cor dos oceanos, salinidade em superfície, altura de ondas e extensão do gelo marinho.

A técnica pode ainda ser classificada como ativa, quando o sensor utilizado irradia um pulso de energia artificial e mede o eco, para monitorar algum aspecto sobre a superfície terrestre ou atmosfera, e passivo, quando os sensores captam a energia refletida ou emitida por um alvo que foi iluminado por uma fonte de radiação externa, geralmente o Sol. A energia utilizada tanto nos sensores ativos quanto nos passivos é, normalmente, a energia ou radiação eletromagnética.

A onda eletromagnética pode ser caracterizada pelo seu comprimento de onda e as informações obtidas pelos sensores remotos são adquiridas a partir de diferentes faixas ou bandas do espectro eletromagnético. Por isso, as técnicas de sensoriamento remoto podem também ser classificadas de acordo com o intervalo de comprimento de onda utilizado para a medição. Na banda do visível, entre 400 e 700 nm, podem ser obtidas as medidas de cor do oceano e de fluxo de radiação solar em superfície. Na banda do infravermelho (0,7 – 20  $\mu\text{m}$ ), são realizadas as medidas de TSM. A cobertura de nuvens é uma grande limitação para as medições realizadas nessas duas bandas, impedindo que os parâmetros sejam medidos nessas condições.

Sensores passivos, como radiômetros, na banda de micro-ondas (1 – 30 cm) podem realizar medições de TSM em períodos em que haja cobertura de nuvens, velocidade e direção do vento, cobertura de gelo e salinidade em superfície. Radares, que são um dos tipos de sensores ativos que operam na faixa do micro-ondas, fornecem medições de ASM, velocidade e direção do vento, espectro de ondas, cobertura e tipo de gelo e rugosidade de superfície.

A TSM é uma das principais variáveis para estudos sobre o oceano, pois através de suas variações, no tempo e no espaço, podem ser identificados importantes processos oceanográficos, como ressurgências, frentes termais e vórtices, e os efeitos das mudanças climáticas. A distribuição da TSM nos oceanos tende a ser zonal, ou seja, dependente da latitude. Na região equatorial são encontradas as águas mais quentes em superfície, enquanto nos polos são observadas as menores TSM. As variações de TSM em todos os oceanos podem ser medidas pelo

sensoriamento remoto através de radiômetros de infravermelho e de micro-ondas.

A salinidade é definida como a quantidade total de sais dissolvidos, em gramas, em 1 kg de água do mar. Na superfície dos oceanos, a distribuição da salinidade se comporta de forma zonal, semelhantemente ao observado com a TSM. As águas com maiores salinidades, ou seja, mais salinas, são observadas em latitudes médias, onde a evaporação é alta. As águas menos salinas são observadas próximo ao Equador, já que nessa região a taxa de precipitação é maior do que a taxa de evaporação, e nos polos, onde o derretimento do gelo gera afluxo de grandes volumes de água doce. Radiômetros de micro-ondas são usados no sensoriamento remoto para medições de salinidade em superfície e representam um dos grandes avanços da Oceanografia por satélites nos últimos anos.

A circulação oceânica e a gravidade determinam a ASM, cuja distribuição sobre todos os oceanos pode ser entendida como uma espécie de topografia oceânica superficial. Medições de ASM são importantes para estudos relacionados às marés, circulação oceânica e conteúdo de calor armazenado pelos oceanos. Radares altimétricos são utilizados para medições precisas de ASM. Eles emitem pulsos na faixa de micro-ondas que atingem a superfície do oceano e medem o tempo de retorno desse sinal. A partir do tempo de retorno do sinal ao sensor é determinada a topografia do oceano.

O movimento do oceano em superfície, desde ondas individuais a sistemas completos de correntes oceânicas, é determinado em grande parte pela direção e intensidade dos ventos que fluem próximo à superfície. Os ventos superficiais influenciam também as trocas de calor entre o ar e o oceano. A velocidade e direção dos ventos em superfície podem ser determinadas por medições realizadas com escaterômetro, que é um radar de micro-ondas ativo não imageador, e com radiômetro de micro-ondas. A altura e a direção de ondas geradas pela influência do vento podem ser determinadas por medições do espectro realizadas com radar altimétrico e com radar de abertura sintética (SAR, *synthetic aperture radar*), que é um tipo de sistema de radar imageador.

A cor do oceano, em superfície e em poucos metros da parte superior da coluna d'água, pode ser medida através de radiômetros multiespectrais na faixa do visível. A medição de cor do oceano fornece informações sobre a concentração de clorofila, de material orgânico dissolvido e de partículas em suspensão na água do mar, já que esses componentes mudam a cor do oceano. Por exemplo, águas muito produtivas, ou seja, aquelas com altas concentrações de fitoplâncton, apresentam coloração esverdeada. Na ausência de material em suspensão, a cor da água é azul profundo com traço de violeta. Em regiões subtropicais e latitudes médias mais próximas da costa, a água do mar contém mais fitoplâncton do que as águas do oceano central. A luz é absorvida pelos pigmentos de clorofila no fitoplâncton, ao mesmo tempo em que é refletida pelo próprio fitoplâncton em si.

O gelo marinho, que é a água do mar congelada, é encontrado nas remotas e inacessíveis regiões polares. Nas épocas mais frias do ano, o gelo marinho também pode ser encontrado em latitudes mais baixas, tais como no Mar Báltico e nos fiordes da Escandinávia. A extensão da área coberta por gelo marinho pode ser detectada e monitorada através de radiômetros do espectro visível e do infravermelho. A deriva de gelo em larga escala pode ser estimada a partir de radiômetros de micro-ondas e de dados de escaterômetros. A deformação e o crescimento

do gelo podem ser derivados da cobertura SAR sistemática, enquanto a espessura do gelo pode ser obtida através de altímetros.

Dentre as missões espaciais ainda em operação e que fornecem dados sobre o oceano, podem ser citadas as missões Aquarius e SMOS (*Soil Moisture and Ocean Salinity*). Ambas fornecem, por exemplo, medições sobre a salinidade superficial do oceano, espessura do gelo marinho e estado do oceano. A TSM tem sido medida operacionalmente através dos satélites de órbita polar da série NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*) e geoestacionários como o GOES (*Geostationary Operational Environmental Satellite*), e os dados de ASM têm sido inferidos a partir das medições provenientes de altímetros posicionados nos satélites TOPEX/Poseidon e Jason-1. Como exemplo de satélites com sensores de cor do oceano podem ser citados o SeaWiFS (*Sea-viewing Wide Field-of-view Sensor*) e Aqua (EOS PM – *Earth Observing System PM*), ambos lançados pela NASA (*National Aeronautics and Space Administration*). Já as informações sobre velocidade e direção do vento têm sido obtidas através dos satélites QuikSCAT (*Quick Scatterometer*) e MetOp-A (*Meteorological Operational Satellite Programme*).

### **2.3.2** MEDIÇÃO *IN SITU*

As observações realizadas por sensores em satélites necessariamente devem ser complementadas por observações *in situ*, uma vez que estas são utilizadas para calibrar e validar as medições realizadas remotamente. Além disso, apesar de o sensoriamento remoto possibilitar uma visão global sobre os parâmetros na superfície do oceano, as medições *in situ* fornecem informações sobre as propriedades abaixo da superfície oceânica, ao longo da coluna d'água. Considerando ainda a superfície do oceano, técnicas *in situ* permitem o monitoramento de eventos oceanográficos de alta frequência, o que muitas vezes é limitado pelo tempo de revisita de cada satélite.

Vários tipos de equipamentos são utilizados atualmente para as pesquisas em Oceanografia Física. A escolha do sensor e/ou do equipamento a ser utilizado depende primariamente do tipo e da natureza da variável a ser mensurada, da disponibilidade de recursos para a compra, manutenção e utilização do equipamento, do ambiente onde o equipamento fará as medições (águas rasas, águas profundas ou regiões costeiras, por exemplo) e da escala temporal e espacial necessária para representar corretamente o fenômeno oceanográfico associado.

Os sensores necessitam estar instalados em plataformas de coleta de dados para realizar as suas medições. O casco de um barco ou navio, por exemplo, pode ser usado como plataforma para a instalação de ADCPs (*acoustic Doppler current profiler*), que são sensores acústicos cujo princípio de funcionamento é o do efeito Doppler, utilizados para medição da direção e da velocidade de corrente em superfície ou em profundidade. Assim, ao longo da rota da embarcação, o ADCP pode medir os parâmetros de corrente em diversas profundidades, predeterminadas pelo usuário.

Quando observações pontuais (em um ponto fixo do oceano) são desejadas, boias de fundeio ou linhas de fundeio instrumentadas, por exemplo, podem ser utilizadas para reunir diversos tipos de sensores. As plataformas fixas são sistemas Eulerianos de coleta de dados. As linhas de fundeio, por exemplo, podem conter uma gama de diferentes equipamentos posicio-

nados em profundidades específicas, permitindo medições desde a superfície até grandes profundidades. Dentre os equipamentos que podem ser integrados a uma linha de fundeio podem ser destacados os CTDs, utilizados para medições de temperatura e salinidade do mar; os ADCPs; os ondógrafos direcionais, que através da aceleração da água são capazes de fornecer parâmetros de ondas, como altura e direção, em superfície; sensores ópticos, para medição de radiação, clorofila e oxigênio; sensores químicos; contadores ópticos de plâncton, e instrumentos de vídeo, entre outros. O emprego das plataformas fixas e seus sensores é relativamente oneroso, uma vez que, além do custo associado a cada sensor, também há o gasto relativo à montagem da plataforma e às dispendiosas visitas técnicas regulares.

Os derivadores são equipamentos transportados passivamente pelas correntes superficiais do oceano, portanto são utilizados para medir parâmetros oceanográficos e meteorológicos na superfície, tais como temperatura da água e pressão atmosférica. Este é um dos tipos mais básicos de equipamentos associados a técnicas Lagrangeanas de monitoramento, onde a posição do instrumento varia ao longo do tempo e, a partir dessa relação, a velocidade pode ser calculada. Dentre os diferentes modelos utilizados, o mais comum é composto por uma boia ou flutuador conectado, através de um cabo de ligação, a uma vela submersa, geralmente posicionada em profundidades inferiores a 30 metros, utilizada com a finalidade de reduzir o arrasto do derivador pelo vento. São equipados com GPS ou com o sistema Argos, para que a sua posição possa ser rastreada, e com sensores específicos para medir os dados a ser estudados. São munidos também de bateria, para que os dados sejam transmitidos por satélite. Atualmente, a maior parte dos derivadores transmite os dados por satélite pelos sistemas Argos e Iridium. As vantagens desse tipo de equipamento são a facilidade de utilização, já que normalmente os derivadores são leves e pequenos, e o baixo custo em comparação aos outros equipamentos de medição de dados oceanográficos.

Outro tipo de equipamento Lagrangeano é o perfilador. Esse instrumento é composto, normalmente, por um sistema hidráulico que controla a flutuabilidade do equipamento, permitindo que submerja ou emerja na coluna d'água; pelos sensores que medem os parâmetros oceanográficos (pressão, temperatura e condutividade são os sensores mais comuns, mas oxigênio dissolvido, clorofila e turbidez são também medidos) e pela parte eletrônica que controla o seu funcionamento; e o sistema de transmissão de dados, que se comunica por satélite para enviar os dados para uma estação terrestre. Após o lançamento, o derivador desce até a profundidade para a qual foi programado e deriva com as correntes nessa profundidade por um tempo pré-programado. Em seguida, ascende à superfície, medindo os parâmetros ambientais. Uma vez em superfície, o perfilador transmite por algumas horas os dados do perfil medido codificados para os satélites de passagem, antes de descer novamente, iniciando um novo ciclo.

Técnicas de robótica marinha possibilitaram o desenvolvimento de equipamentos de navegação autônoma ou AUVs. Integrados a sensores de medição, esses veículos são capazes de realizar medições na coluna d'água de forma automatizada. Alguns AUVs utilizam propulsores, como os AUVs do tipo torpedo, e outros não, como os do tipo *glider*. Este último é um planador autônomo submarino. Seu deslocamento é controlado por mudanças em sua flutuabilidade e através das asas que permitem que o veículo deslize no plano horizontal. Esses veículos

deslizam lentamente, mergulhando até uma profundidade especificada e, em seguida, voltam à superfície, traçando uma trajetória senoidal. Durante a trajetória realizam as medições associadas aos sensores presentes, como temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido, clorofila, entre outros. Os AUVs são comandados remotamente via satélite e as transmissões de dados são realizadas em tempo real quando o veículo está na superfície.

Além dos AUVs, outro tipo de veículo subaquático não tripulado utilizado em medições oceanográficas em ambientes profundos é o ROV (*remotely operated vehicle*). Esse veículo é operado remotamente e tem uma ligação física com o exterior, através da qual são realizadas as operações que o controlam. Normalmente o ROV é equipado com câmeras de vídeo e luzes e diversos outros equipamentos adicionais, tais como sensores para a medição da temperatura e salinidade da água, braço manipulador, amostradores de água e de sedimento, sonares, magnetômetros, entre outros.

### 2.3.3 MONITORAMENTO DOS OCEANOS

Um dos métodos mais amplamente utilizados para o monitoramento do oceano é a medição em estações oceanográficas, as quais constituem a base de um cruzeiro oceanográfico de pesquisa. Nesse tipo de monitoramento, a região de estudo é amostrada em seções compostas por estações oceanográficas. Em cada estação oceanográfica são obtidos perfis verticais das propriedades oceanográficas desejadas. Em um mesmo cruzeiro podem ser feitas medições em várias seções. O número de estações oceanográficas, o espaçamento entre elas, a posição e a forma das seções e os instrumentos utilizados são determinados de acordo com o tipo de questão científica para a qual se deseja obter respostas e com as limitações orçamentárias. Além disso, para a mesma região, podem ser realizados cruzeiros oceanográficos em diferentes estações do ano, com a finalidade de observar as variações sazonais das propriedades medidas.

O monitoramento do oceano é limitado pelas escalas do tempo e do espaço e pelo próprio desenvolvimento tecnológico dos equipamentos de medição. Por isso, para se observar e entender um fenômeno oceanográfico específico, normalmente são combinados diferentes métodos de medição, *in situ* e remotos. Considerando as vantagens e limitações de cada um deles, esses métodos acabam complementando as informações necessárias para a caracterização de um dado processo.

Além desses aspectos, alguns estudos necessitam também que as medições sejam realizadas continuamente e em tempo real ou quase-real, o que foi possibilitado com os avanços em recursos eletrônicos, computacionais e de transmissão de dados. Assim, novas formas de observar e de monitorar os oceanos foram desenvolvidas, contribuindo decisivamente para o surgimento e para a expansão da Oceanografia Operacional.

A Oceanografia Operacional pode ser definida como o fornecimento de informações científicas e de previsões sobre o estado do mar, de forma rotineira, e com rapidez suficiente para que os usuários possam utilizar tais informações para tomar decisões, antes que as condições relevantes tenham mudado ou tenham se tornado imprevisíveis. Através dela é possível obter estimativas sobre variáveis oceanográficas, como nível do mar, temperatura, correntes

e variáveis bioquímicas, para o passado, o presente e para o futuro. Seus produtos podem ser utilizados para uma vasta gama de aplicações, como gestão de pesca e recursos marinhos, segurança marítima, logística para a indústria *offshore*, planejamento de rotas de navegação, monitoramento costeiro e previsão de ressacas.

Três componentes básicos formam a Oceanografia Operacional: um sistema de monitoramento do oceano através de medições *in situ* e remotas de dados; um sistema de previsão oceânica capaz de fornecer diagnósticos, o que significa investigar o comportamento de um determinado fenômeno, e previsões do oceano; e um sistema operacional de pós-processamento e armazenamento dos dados e disponibilização para a comunidade.

Para compor um sistema de monitoramento do oceano operacional, além da alta cobertura espacial e temporal alcançada pelo sensoriamento remoto, são necessários, entre outros aspectos, instrumentos autônomos, como os derivadores, perfiladores e *gliders*, para monitorar longos períodos de tempo, e um sistema integrado e operacional de gerenciamento para a pronta disponibilização e utilização dos dados medidos.

Os dados adquiridos pelo sistema de observação, após passarem pelos processamentos e controles de qualidade adequados, são então disponibilizados diretamente para os usuários finais, em tempo real ou quase-real, e são utilizados no sistema de previsão oceânica, para a validação dos resultados dos modelos numéricos computacionais e para a assimilação de dados em modelos oceânicos, técnica esta utilizada para integrar os dados medidos *in situ* e remotos e diminuir o erro entre os resultados do modelo e os dados observacionais.

O aumento da demanda por informações oceânicas, em diversas escalas de tempo e espaço aplicadas a finalidades distintas, desde previsões imediatas para ser utilizadas na contenção de derrame de óleo até previsões de longo prazo para estudos sobre fenômenos climáticos, permitiu que sistemas operacionais de Oceanografia se multiplicassem. Atualmente é possível encontrar redes ou programas de observação do oceano globais, regionais e locais, fazendo com que o entendimento sobre os processos oceânicos em diversas escalas seja cada vez maior.

## 2.4 APLICAÇÕES DA MEDIÇÃO E DO MONITORAMENTO OCEANOGRÁFICO NA BIOTECNOLOGIA MARINHA

Inúmeras são as pesquisas na área de biotecnologia marinha associadas à utilização de organismos de origem marinha e de seus compostos para o desenvolvimento e a produção de fármacos, cosméticos, enzimas específicas e outras substâncias de utilização comercial e industrial. Alguns exemplos amplamente conhecidos na área são: o Prialt, um analgésico para dores crônicas desenvolvido a partir de uma toxina produzida pelo molusco marinho *Conus magus*; o AZT, a primeira droga licenciada para o tratamento da AIDS, isolada a partir da esponja caribenha *Cryptotethya crypta*, ou, com a mesma origem, o Ara-C, utilizado no tratamento de leucemia, todos fármacos aprovados para o uso humano; enzimas utilizadas em biorreatores industriais; e a introdução das polimerases de DNA atualmente utilizadas na maioria dos laboratórios, que foram isoladas a partir de micro-organismos provenientes de fontes hidrotermais.

Os recursos marinhos de interesse biotecnológico, tais como alguns tipos de inverte-

brados (esponjas, tunicados, moluscos e briozoários) e de micro-organismos (cianobactérias, bactérias e fungos), estão localizados em ambientes diversos e muitas vezes extremos em termos de pressão, salinidade, temperatura e depleção de nutrientes, em grandes e inacessíveis profundidades, como é o caso das fontes hidrotermais. Para o desenvolvimento desses derivados, sejam eles substâncias geradas pela biota marinha (como terpenoides, ácidos graxos, poliketídios, acetogeninas, polifenólicos, alcaloides, peptídeos e macrolídeos) ou metabólitos isolados de micro-organismos marinhos (originados, em alguns casos, através de rotas biossintéticas mistas, que podem estar relacionadas à simbiose), são necessárias amostras biológicas em conjunto com amostras da água e, em alguns casos, do sedimento onde o organismo vive, ambos também de interesse microbiológico. Portanto, esse tipo de pesquisa só é possível através da utilização de equipamentos oceanográficos como o ROV, que são capazes de atingir grandes profundidades e coletar amostras, ao mesmo tempo em que a caracterização físico-química do local é feita através de equipamentos como o CTD e sensores bioquímicos nele instalados.

Além das amostras, a medição e o monitoramento de parâmetros oceanográficos, como o pH, a temperatura, a salinidade e nutrientes disponíveis na água do mar, são essenciais para o conhecimento sobre as condições ambientais que regulam o crescimento, a distribuição e a reprodução dos organismos marinhos utilizados na biotecnologia marinha. Através dessas informações, é possível reproduzir as condições ambientais naturais no meio de cultivo do organismo em laboratório. Através do controle dos parâmetros abióticos e bióticos é possível atingir condições ótimas de cultivo, possibilitando o aumento da taxa de crescimento do organismo e da produção do elemento bioativo de interesse.

Como os fatores ambientais influenciam o metabolismo desses organismos, interferem também, por exemplo, na biossíntese de constituintes de interesse para a biotecnologia. Variações nas condições ambientais podem resultar na produção de diferentes metabólitos secundários pelo mesmo organismo. Através do conhecimento das condições ambientais, portanto, é possível direcionar os tipos de métodos utilizados para a descoberta de novos produtos de origem marinha.

## 3 | CONCLUSÕES

Na área de sensoriamento remoto por satélites aplicados à Oceanografia, novas missões espaciais têm sido planejadas, com o objetivo de aumentar a capacidade de observação das propriedades do oceano por esse tipo de método. Novas técnicas e sensores estão em desenvolvimento, com o intuito de ampliar o número de variáveis oceânicas que podem ser mensuradas a partir do sensoriamento remoto e de promover o aumento da resolução espacial das medidas. Atualmente, medições de TSM e cor do oceano são disponíveis em mesoescala (10-100 km) e submesoescala (1-10 km), entretanto há poucos dados das propriedades dinâmicas dos oceanos nessas mesmas escalas. O *Wavemill* é o exemplo de um promissor sistema projetado para produzir, a partir de um instrumento interferométrico híbrido, medições diretas

de velocidade e de direção de correntes oceânicas superficiais nessas escalas, além de medições da topografia superficial oceânica.

Em termos de medições e monitoramentos *in situ*, é esperado o aumento global do número de medições nos oceanos, principalmente em subsuperfície. Nos últimos 20 anos, o Programa Argo, que é um sistema global de monitoramento dos oceanos composto por uma rede de perfiladores, possibilitou um aumento sem precedentes de informações de temperatura e salinidade nos primeiros 2000 metros de profundidade da coluna d'água. Em 2020, mais de 3000 perfiladores fazem parte da rede Argo. O programa prevê a expansão das áreas de lançamento dos perfiladores, passando a incluir altas latitudes e mares marginais, novas tecnologias para os equipamentos perfilarem até mesmo regiões abissais oceânicas e a inclusão de sensores biogeoquímicos para medição de clorofila, matéria orgânica dissolvida, nitrato e pH.

É observada também uma tendência crescente na utilização de veículos autônomos para medição de parâmetros superficiais e subsuperficiais do oceano em substituição às clássicas e dispendiosas técnicas que dependem de embarcações de grande porte. A utilização de veículos autônomos recentemente desenvolvidos, como o *Wave Glider*, que utiliza a energia solar e das ondas para a propulsão e pode realizar medições de parâmetros meteorológicos e oceanográficos, inclusive de ondas, e o *Sailbuoy Water Quality Monitor*, veículo autônomo impulsionado pela força do vento e cujos sensores podem detectar hidrocarbonetos, algas ou clorofila-A, turbidez, matéria orgânica dissolvida e traços de tinta anti-incrustante, pode ser ampliada, inclusive para finalidades operacionais.

Na constante busca por sensores de medição mais eficazes e específicos, os biossensores podem representar um avanço para as medições oceanográficas no futuro. Diversos programas de observação do oceano, globais, regionais e locais, podem se beneficiar da aplicação dos biossensores para complementar o sistema de observação. Apesar de ser ainda relativamente pequeno o número de biossensores desenvolvidos para aplicações locais em ambientes marinhos, esses tipos de sensores trazem uma série de vantagens em relação a outras técnicas laboratoriais analíticas clássicas, em termos de custos, da frequência de medição e da seletividade e especificidade na detecção do elemento desejado. Apesar da vantajosa aplicação desse tipo de técnica ao monitoramento oceanográfico, uma parte da dificuldade enfrentada pelos cientistas para desenvolvê-la pode estar relacionada aos próprios desafios ambientais impostos pelo ambiente marinho, uma vez que o biossensor estará sujeito a toda a variabilidade e a dinâmica características do oceano.

A biodiversidade encontrada no ambiente marinho ainda permanece, em grande parte, inexplorada e subutilizada, apesar do grande potencial de vários organismos marinhos como fonte de produtos farmacêuticos, químicos, cosméticos e biocombustíveis. Todos esses avanços, em termos de novas e mais modernas técnicas para a observação do oceano, possibilitarão o conhecimento cada vez maior sobre diversos aspectos do oceano, sejam eles físicos, químicos, biológicos e dinâmicos, representando uma boa perspectiva para descobertas associadas a organismos marinhos e seus biocompostos.

## REFERÊNCIAS

- Boccaletti, G.; Ferrari, R.; Fox-Kemper, B. (2007) Mixed layer instabilities and restratification. **Journal of Physical Oceanography**. 37(9): 2228-2250.
- Brink, K.H. (2005) Coastal physical processes overview. In: Robinson, A.F.; Brink, K.H. (Eds.) **The Sea**. V. 13: The Global Coastal Ocean: Multiscale Interdisciplinary Processes. Cambridge: Harvard University Press. 37-60.
- Chereskin, T.; Howe, B. (2007) Oceanographic Measurements. In: Tropea, C.; Yarin, A.L.; Foss, J.F. (Eds.) **Springer Handbook of Experimental Fluid Mechanics**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1179-1217.
- Dennison, M.J.; Turner, A.P. (1995) Biosensors for environmental monitoring. **Biotechnology Advances**. 13(1): 1-12.
- Felício, R.; Oliveira, A.L.L.; Debonisi, H.M. (2012) Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**. 64(3): 39-42.
- Flemming, N.C. (2002) Strategic planning for operational oceanography. In: Pinardi, N.; Woods, J. (Org.). **Ocean forecasting: conceptual basis and applications**. Berlin: Springer-Verlag. 1-17.
- Gerwick, W.H.; Moore, B.S. (2012) Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry Biology**. 19(1): 85-98.
- Kroger, S.; Law, R.J. (2005) Sensing the sea. **Trends in Biotechnology**. 23(1): 250-256.
- Leary, D.; Vierros, M.; Hamon, G.; Arico, S.; Monagle, C. (2009) Marine genetic resources: A review of scientific and commercial interest. **Marine Policy**. 33(1): 183-194.
- Lenderink G.; Haarsma, H. (1994) Variability and multiple equilibria of thermohaline circulation associated with deep-water formation. **Journal of Physical Oceanography**. 24(1): 1480-1493.
- Lentz, S.J. (1995) Sensitivity of the inner-shelf circulation to the form of the eddy viscosity profile. **Journal of Physical Oceanography**. 25(1): 19-28.
- Mellor, G.L. (1996) **Introduction to physical oceanography**. Woodbury: AIP Press American Institute of Physics. 169p.
- Murray, P.M.; Moane, S.; Collins, C.; Beletskaya, T.; Thomas, O.P.; Duarte, A.W.; Nobre, F.S.; Owoyemi, I.O.; Pagnocca, F.C.; Sette, L.D. et al. (2013) Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. **Nature Biotechnology**. 30(1): 839-850.
- Paitan, Y. et al. (2013) On-line and in situ biosensors for monitoring environmental pollution. **Biotechnology Advances**. 22(1): 27-33.
- Polton, J.A.; Smith, J.A.; Mackinnon, J.A. et al. (2008) E. Rapid generation of high-frequency internal waves beneath a wind and wave forced oceanic surface mixed layer. **Geophysical Research Letters**. 35(13).
- Pouliquen, S. (2006) *In-situ* observations: operational systems and data management. In: Chassignet, E.P.; Verron, J. (Org.). **Ocean Weather Forecasting**. Dordrecht: Springer. 207-227.
- Robinson, I. (2006) Satellite Measurements for Operational Ocean Models. In: Chassignet, E.P.; Verron, J. (Org.). **Ocean Weather Forecasting**. Dordrecht: Springer. p. 147-189.
- Rudnick, D.L.; Boyd, T.J.; Brainard, R.E. et al. (2003) From tides to mixing along the Hawaiian Ridge. **Science**. 301(5631): 355-357.
- Send, U. (2006) *In-situ* observations: platforms and techniques. In: Chassignet, E.P.; Verron, J. (Org.).

**Ocean Weather Forecasting.** Dordrecht: Springer. 191-206.

Simpson, J.H. (1998) Tidal processes in shelf seas. In: Brink, K.H.; Robinson, A.R. (Org.), **The Sea**. V. 10: The Global Coastal Ocean: Processes and Methods. Boston: Harvard University Press. 113-150.

Stewart, R.H. (2008) **Introduction to Physical Oceanography**. 7. ed. Houston: Texas A & M University. 344p.

Talley, L.D.; Pickard, G.L.; Emery, W.J.; Swift, J.H. (2011) **Descriptive physical oceanography: an introduction**. 6. ed. Boston: Elsevier. 560p.



# POLUIÇÃO MARINHA

Raquel Toste<sup>a</sup>  
Carina Stefoni Böck<sup>a</sup>  
Daiane Gracieli Faller<sup>a</sup>  
Luiz Paulo de Freitas Assad<sup>a</sup>  
Luiz Landau<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

## RESUMO

A biotecnologia encontra uma gama de possibilidades no que diz respeito à poluição no mar. O monitoramento ambiental, para identificação de agentes nocivos, como em florações marinhas tóxicas, e para a avaliação da saúde de ecossistemas, a recuperação de ambientes degradados e o desenvolvimento de técnicas para a prevenção e controle da poluição, abre um leque para aplicações tecnológicas baseadas em sistemas e organismos biológicos. Dada a relevância da poluição para a biota e para a saúde humana e a diversidade de poluentes presentes em ambientes marinhos, neste capítulo são apresentados os conceitos e o histórico da poluição marinha, os principais tipos de contaminantes encontrados no mar e seus efeitos sobre os organismos vivos. Por fim, com a apresentação dos métodos de avaliação da poluição e de seus efeitos, são apresentadas as potenciais aplicações da Biotecnologia nessa área de estudo e os aspectos necessários para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas no campo da poluição marinha.

# 1 | O QUE É POLUIÇÃO MARINHA

A poluição marinha é amplamente referida como a introdução direta ou indireta de substâncias ou energia pelo homem no ambiente marinho, que gera ou pode gerar efeitos deletérios sobre os recursos, organismos e atividades marinhos. Essa definição tem um conceito subjacente com foco nos impactos e, dessa forma, o termo poluição marinha vem sendo empregado tanto em relação à ocorrência de rejeitos no mar quanto ao efeito ambiental causado por estes.

Nesse contexto, é necessário ressaltar a diferença conceitual entre a poluição e a contaminação. A contaminação é entendida como a consequência da introdução antrópica de substâncias no ambiente natural e representa a alteração na concentração de substâncias químicas, na água, nos sedimentos e nos organismos, acima dos valores normais ou de *background*. Dessa forma, a poluição pode ser definida como qualquer forma de contaminação de um ecossistema com efeitos danosos sobre a biota.

## 1.1 CLASSIFICAÇÃO DA POLUIÇÃO

A poluição pode ser classificada tanto pela via de introdução do contaminante ao ambiente marinho quanto em relação ao tipo de contaminante, nesse caso podendo ser de acordo com a constituição físico-química do poluente, quanto ao seu estado físico, ao seu uso ou à sua persistência no ambiente. Apesar desse tipo de classificação básica, a poluição também tem sido agrupada de acordo com as características funcionais dos contaminantes, como seus efeitos e mecanismos de ação. A seguir são apresentadas as principais vias de entrada dos contaminantes e as principais formas de poluição no ambiente marinho.

### 1.1.1 FONTES DE POLUIÇÃO

A poluição no mar basicamente tem origem continental ou oceânica (Figura 1) e pode ocorrer a partir de fontes pontuais e difusas. As fontes de poluição pontuais se referem à introdução dos poluentes no ambiente marinho por uma via direta e de origem identificável e as difusas resultam de uma gama de atividades.

#### **Fontes de origem continental**

A poluição de origem continental tem diversas vias de introdução, englobando tanto o escoamento continental quanto as emissões atmosféricas. A principal forma de transporte dos poluentes, no entanto, se dá através da descarga de rios, que recebem diferentes formas de rejeitos, principalmente efluentes urbanos e industriais, além do escoamento de poluentes de origem agrícola. Esse escoamento total contém nitrogênio e fósforo, nutrientes essenciais para

a biota mas disponíveis em quantidade limitada no ambiente oceânico natural, levando ao ambiente marinho efluentes ricos em nutrientes, o que favorece a floração (*bloom*) de algas e por consequência a eutrofização e o desequilíbrio ecossistêmico. Também ocorre o escoamento de partículas metálicas, oriundas da indústria metalúrgica, que influenciam no metabolismo da biota, e de partículas plásticas, o chamado lixo flutuante, cuja degradação demanda muito tempo no ambiente marinho, e que causam sérios impactos sobre a fauna.

As emissões atmosféricas do continente também são fontes de poluição marinha. Partículas contendo poluentes gerados e liberados na atmosfera sobre a região continental podem ser transportados pelos ventos até as regiões oceânicas e, por sua vez, depositados sobre a superfície do mar. Os poluentes atmosféricos podem ter uma ampla distribuição, dependendo das condições atmosféricas e do tempo de permanência desses na atmosfera. Quando o poluente permanece por pouco tempo, tende a se depositar próximo a sua fonte; do contrário, pode ser distribuído em escala regional e até global.

### **Fontes de origem oceânica**

A poluição de origem oceânica se dá basicamente através das embarcações e das atividades de exploração de recursos minerais e hidrocarbonetos realizadas em alto mar.

A atividade marítima, realizada tanto em zona oceânica quanto costeira, pode poluir a atmosfera através da liberação acidental de gases associados à operação das embarcações, como os produzidos com a incineração de lixo, os presentes nos sistemas de resfriamento e os usados nos sistemas de combate a incêndio. Contudo, a principal forma de poluição associada a esse tipo de atividade é a liberação acidental de óleo, transportado em navios-tanque ou utilizado como combustível ou lubrificante das próprias embarcações.

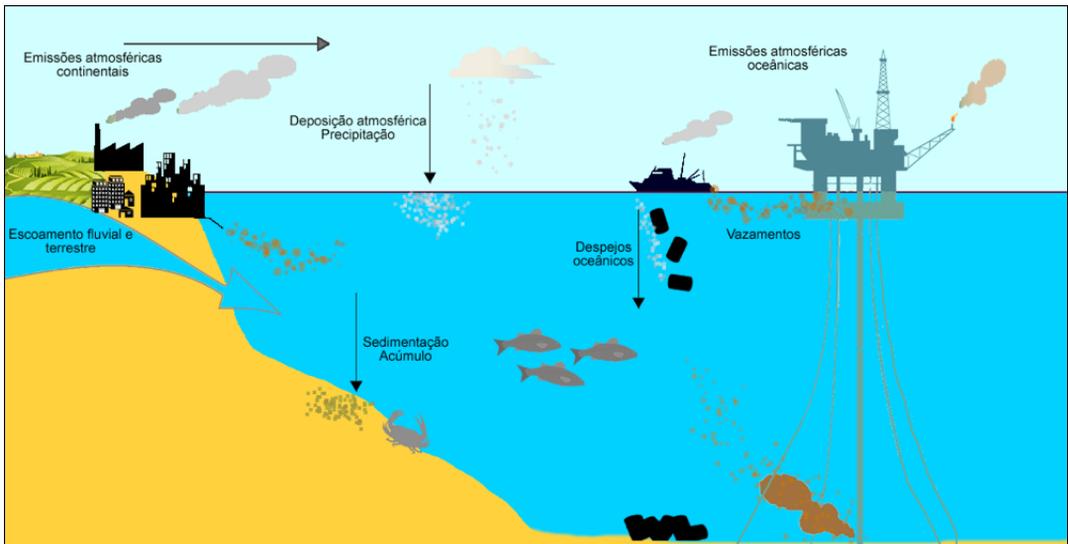
Outra forma de entrada de poluentes ocorre pelos efluentes líquidos produzidos nas embarcações, conhecidos como “água cinza”. Esses efluentes podem ser liberados em oceano aberto sem ocasionar danos devido à ação bacteriana natural; no entanto, há restrições quanto à liberação desses poluentes em regiões mais próximas à costa. Em geral, esses efluentes líquidos são armazenados em compartimentos internos na embarcação, juntamente com outros rejeitos líquidos produzidos, abrigando uma série de substâncias químicas, além de partículas e óleos. Dessa forma, a limpeza dos porões pode liberar enorme quantidade de poluentes na água.

Além disso, há a poluição associada à água de lastro dos navios que fortuitamente transportam organismos planctônicos, que incluem organismos bentônicos em estágio larval, característicos da região de coleta da água. A liberação da água de lastro em uma região diferente daquela em que foi coletada leva à introdução de espécies em ecossistemas não nativos, alterando o equilíbrio ecológico da região. As espécies invasoras ou exóticas também podem ser transportadas pela bioincrustação que ocorre nos cascos das embarcações. Adicionalmente a essa poluição biológica, a bioincrustação leva à poluição decorrente da aplicação de tintas anti-incrustantes, com agentes biocidas, nas áreas submersas das embarcações. Ao longo do tempo, os componentes dessas tintas são liberados no ambiente marinho, seja pela própria característica físico-química dos compostos ou pela remoção das camadas de tinta durante

docagens, levando a efeitos adversos em organismos não-alvo.

Por fim, acidentes na navegação podem acarretar o lançamento de material nos oceanos, seja pela perda da carga transportada ou pela liberação e/ou perda de componentes das embarcações.

No que concerne às atividades de exploração em águas profundas, além da poluição inerente às embarcações associadas a essas atividades, há os riscos relativos à liberação no ambiente do conteúdo minerado e de outros compostos tóxicos utilizados para a extração e à formação de plumas sedimentares profundas e superficiais. Essas alterações podem incluir efeitos negativos sobre os organismos pelágicos e bentônicos e sobre a produtividade primária.



**Figura 1.** Vias de introdução continentais e oceânicas dos contaminantes para o ambiente marinho.

### 1.1.2 TIPOS DE CONTAMINANTES

A classificação da poluição de acordo com o contaminante pode ser feita conforme a composição química ou a sua classe de uso. Basicamente, os contaminantes podem ser separados em compostos orgânicos e inorgânicos. Na classe dos contaminantes inorgânicos estão incluídos os metais pesados, os radionuclídeos e outros rejeitos inorgânicos e industriais, que englobam os rejeitos de dragagens, de mineração e os produtos de processamento industrial. Na classe dos contaminantes orgânicos estão incluídos os produtos brutos, refinados e resultantes da combustão do petróleo e do carvão, os compostos orgânicos sintéticos, os rejeitos municipais e os rejeitos biológicos.

Cada contaminante tem a sua própria via de entrada no ambiente marinho e devido às diferentes composições físico-químicas, uma vez em ambiente marinho, sofrem diferentes processos e afetam a biota de forma específica.

## 1.2 PRINCIPAIS TIPOS DE POLUIÇÃO

De forma difusa ou direta, são muitas as formas de poluição no mar. Com isso, a classificação e quantificação dos diversos tipos de poluição é muitas vezes complicada. No Brasil, a poluição é inferida pela quantificação da qualidade em corpos d'água e nos sedimentos através da análise de parâmetros agrupados de acordo com a composição química e com o uso conhecido do contaminante. Na Resolução 357 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) de 2005 e suas emendas, os parâmetros a serem analisados na água são separados simplesmente em orgânicos e inorgânicos. Já na Resolução CONAMA 454, de 2012, que foca na análise da contaminação da matriz sedimentar, os parâmetros são agrupados considerando também o tipo de uso associado ao contaminante. Conforme essa resolução, as análises consideram os grupos de parâmetros físico-químicos, de metais e semimetais, de pesticidas organoclorados, de PCBs (policloreto de bifenila) e HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), além do TBT (tributilestanho), que é um conhecido disruptor endócrino.

Dentre esses grupos, os metais, os nutrientes e os pesticidas se destacam devido ao seu histórico no que diz respeito aos efeitos sobre a biota marinha e sobre a saúde humana, e no que tange à biotecnologia, tanto em termos de monitoramento quanto de compreensão dos aspectos toxicológicos envolvidos.

### 1.2.1 POLUIÇÃO POR NUTRIENTES INORGÂNICOS

Alguns íons inorgânicos são essenciais ao desenvolvimento de plantas e, por isso, são comumente utilizados como fertilizantes na indústria agrícola. Dentre eles estão a amônia, o nitrato e o fosfato, essenciais para a produção primária da fitoplâncton. Naturalmente, esses íons são encontrados em concentrações limitantes no ambiente marinho. Com a entrada excessiva desses nutrientes no meio marinho, em decorrência principalmente de efluentes domésticos e agrícolas, ocorre a eutrofização do ambiente. A eutrofização é resultado da alta concentração de nutrientes no ambiente aquático que induz crescimento excessivo de algas, especialmente as cianobactérias. Com a decomposição dessa grande quantidade de matéria orgânica, há uma demanda muito grande por oxigênio para a ação bacteriana e com isso uma depleção do oxigênio disponível para o restante da teia trófica. As consequências da poluição por nutrientes incluem a perda de diversidade, a morte de organismos e alterações no desenvolvimento e reprodução.

### 1.2.2 POLUIÇÃO POR METAIS

Os metais pesados, que possuem alto peso molecular e densidade maior que a água, são encontrados em quantidades-traço em ambientes naturais. Porém, devido ao seu intenso uso em aplicações tecnológicas, industriais, agrícolas e domésticas, esses metais passam a ser encontrados em maiores concentrações no meio ambiente. A contaminação também pode se dar através de fenômenos naturais, como intemperismo e erupções vulcânicas. Esse aumento de concentração tem consequência negativa sobre os organismos vivos, no entanto a

toxicidade depende da dose, da rota de exposição e de espécie química, além das características dos próprios indivíduos expostos à contaminação.

Nos sistemas biológicos, os metais pesados têm influência sobre organelas e componentes celulares e nas enzimas envolvidas nos processos de metabolismo, detoxificação e reparação. Dessa forma, os íons metálicos podem interagir com esses componentes, induzindo mudanças conformacionais que podem levar à modulação, carcinogênese e morte das células. Além dos metais pesados, metais com menor peso molecular também têm efeitos deletérios semelhantes na biota.

Devido às suas diferentes propriedades físico-químicas, os metais têm seus próprios mecanismos toxicológicos de ação. Alguns metais são considerados essenciais devido ao seu papel em funções fisiológicas e bioquímicas nos organismos. Dentre eles estão o cobre, o ferro, o magnésio, o manganês, o níquel e o zinco. Apesar de essenciais, quando disponíveis em excesso são responsáveis por danos nos tecidos e nas células, em alguns casos sendo tênue a faixa de concentração em que os efeitos do metal passam a ser tóxicos (ver Figura 2).

Outros metais não têm funções biológicas estabelecidas e são considerados não essenciais. A contaminação nesse caso leva a efeitos adversos no metabolismo de organismos, podendo em alguns casos, levar à morte. Dentre eles estão o arsênio, o cádmio, o cromo, o chumbo e o mercúrio, que devido ao seu alto grau de toxicidade são considerados substâncias tóxicas sistêmicas, que induzem danos aos organismos mesmo em níveis baixos de exposição e, por isso, têm sido foco de muitos estudos.

Nesse contexto, a poluição por mercúrio (Hg) merece destaque. O Hg é um elemento de transição encontrado na forma orgânica, inorgânica e elementar na natureza, e cada forma possui seu perfil de toxicidade. O metilHg é o composto orgânico mais frequentemente encontrado no meio ambiente e é resultado da metilação do Hg inorgânico por micro-organismos. Uma vez que o Hg é absorvido pela biota, como metil- ou dimetilHg, a taxa de excreção é extremamente baixa, levando ao acúmulo desse metal nos organismos e à transferência ao longo da cadeia trófica. Devido ao seu alto risco à saúde humana, principalmente a longo prazo, atualmente uma série de restrições à liberação desse metal, largamente utilizado em processos industriais, no ambiente foi estabelecida.

### **1.2.3 POLUIÇÃO POR PESTICIDAS ORGANOCLORADOS**

O termo pesticida engloba uma série de compostos com diferentes identidades e propriedades físico-químicas utilizados para o controle de pragas. Os pesticidas são substâncias químicas usadas principalmente na agricultura e, por serem compostos orgânicos artificiais, podem permanecer no ambiente por muitos anos, além de serem transportados por longas distâncias. Os pesticidas podem ser classificados de acordo com o modo de ação, com a espécie-alvo e com a composição química. Neste último tipo de classificação se destacam os pesticidas organoclorados.

Os pesticidas organoclorados agem como disruptores endócrinos em organismos não-alvo como mamíferos, aves e peixes, o que levou ao seu banimento global em 2004. No entanto, devido ao seu caráter persistente, os organoclorados continuam sendo detectados em águas

superficiais mesmo após o seu banimento. Por serem lipofílicos, os organoclorados acumulam-se em tecidos e músculos animais, tanto pela ingestão quanto por contato ou inalação dessas substâncias. Muitos estudos têm relacionado o efeito dos pesticidas sobre a saúde humana e a sua possível relação com o desenvolvimento do câncer.

Os efeitos de um pesticida no ambiente marinho dependem das propriedades específicas de cada composto, como a sua meia-vida, mobilidade e solubilidade. A presença desses compostos no ambiente aquático está principalmente associada à deposição atmosférica e ao escoamento terrestre. Dentre os compostos que possuem histórico de poluição mais conhecidos está o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), usado em larga escala até a década de 40 devido a sua eficiência e amplo espectro de atuação.

### 1.3 HISTÓRICO

Desde as primeiras concentrações urbanas, os efluentes domésticos e os rejeitos industriais têm sido fontes de poluição para os corpos d'água. No entanto, o entendimento da relação entre a poluição da água e a saúde humana só foi alcançado no final do século XIX, ascendendo a preocupação quanto à presença de contaminantes no meio ambiente.

Uma das primeiras evidências da presença de poluição e de seus potenciais riscos ocorreu no início do século XX, quando uma série de incêndios em decorrência da severa poluição por partículas combustíveis no rio Cuyahoga, em Cleveland, nos Estados Unidos, levou à criação da Lei Federal de Controle de Poluição (Federal Water Pollution Control Act) em 1972 e motivou a elaboração de medidas para o controle da poluição, como a criação de agências de proteção ambiental. Apesar dessas medidas pioneiras, foram muitos os casos envolvendo a poluição de ambientes aquáticos em todo o mundo, ressaltando a importância do estabelecimento de medidas e dispositivos de controle da poluição.

De 1942 a 1953, um canal abortado do rio Niagara nos Estados Unidos, chamado Love Canal, foi usado como local de disposição dos rejeitos da Hooker Chemical Company. A quantidade de aproximadamente 21 mil toneladas de substâncias tóxicas despejada no canal incluía compostos orgânicos halogenados e dioxinas. O caso teve ampla repercussão devido à mobilização da população vizinha à área contaminada, que começou a apresentar problemas de saúde em decorrência da contaminação. Esse foi um dos primeiros alertas dos riscos dos rejeitos industriais sobre a saúde humana.

Em 1956, um dos maiores desastres decorrentes da poluição marinha ocorreu na cidade de Minamata, no Japão. O desastre ocorreu em função do despejo de efluentes industriais da Chisso Corporation contendo metilHg na baía de Minamata. A presença desse composto causou a morte e a alteração comportamental dos animais que o ingeriram e também daqueles que tiveram contato com a substância. No entanto, a consequência mais grave foi observada em humanos após o consumo dos frutos do mar contaminados, que levou ao desenvolvimento de uma síndrome neurológica, em alguns casos fatal, que ficou conhecida como síndrome de Minamata.

Em 1962, com a publicação do livro *Primavera silenciosa*, que alertava sobre a morte de aves em consequência da aplicação do DDT como pesticida, a atenção da comunidade global

se voltou para os efeitos de substâncias químicas nos organismos e o papel do homem sobre o meio ambiente.

Já no final do século XX, o despejo acidental de cianeto após o rompimento da barragem de contenção de rejeitos de mineração em rios na Romênia (*Baia Mare Gold Mine Cyanide Spill*) levou a severos impactos no ecossistema, incluindo a perda quase total do estoque pesqueiro, e a hospitalização de pessoas após o consumo de alimentos contaminados. No Brasil, um acidente semelhante ocorreu na cidade de Mariana, em Minas Gerais, no ano de 2015, dessa vez com a liberação de 34 milhões de metros cúbicos de rejeitos de mineração da empresa Samarco, após o rompimento da barragem de Fundão, conhecido como o Desastre de Mariana. O volume de lama, contendo rejeitos contaminados principalmente por óxido de ferro, percorreu centenas de quilômetros de cursos d'água até chegar à foz do rio Doce, no Espírito Santo, e ao Oceano Atlântico.

Outra forma de poluentes para o oceano, por escoamento terrestre, é a poluição por nutrientes, que tem sido detectada ao longo dos anos principalmente através do *bloom* de algas em algumas áreas. Um exemplo é a presença de uma extensa área considerada como “zona morta” no Golfo do México, monitorada desde 1985, associada principalmente ao fluxo de águas enriquecidas por fósforo e nitrogênio do rio Mississipi. A presença desses nutrientes está associada ao crescimento algal anormal, cujo processo de decomposição leva a uma depleção na quantidade de oxigênio disponível para as demais formas de vida. A hipoxia e a presença excessiva de algas induzem ao deslocamento de espécies e prejudicam a manutenção da vida e o desenvolvimento de espécies que permanecem nessas áreas, tornando-as ecologicamente pobres.

Além de nutrientes, o escoamento de resíduos sólidos para os oceanos têm sérias consequências no ecossistema marinho, devido ao caráter persistente da maioria dos materiais que compõem esse tipo de rejeito. As interações entre organismos marinhos e rejeitos sólidos foram primeiramente reportadas na década de 60. Na época, foi observada a morte de albatrozes devido ao bloqueio de seu trato digestivo em consequência da ingestão de plásticos, confundidos com presas, na região do Havaí. Na mesma década, também foram observados impactos, incluindo a morte e mutilação de animais marinhos, em decorrência da presença de resíduos sólidos, como redes de pesca abandonadas, que acabam ficando presos aos organismos, muitas vezes limitando a locomoção ou levando ao sufocamento. A quantidade de lixo que alcança os oceanos é evidenciada pela rota de lixo do giro do Pacífico (*Pacific Gyre Garbage Patch*) que retém uma enorme quantidade de lixo flutuante no interior do giro oceânico.

No que concerne à poluição de origem oceânica, a Organização Marítima Internacional (IMO, International Maritime Organisation), criada em 1948 para prover a cooperação internacional para a segurança associada à navegação, tem papel regulador. A ocorrência de acidentes envolvendo embarcações levou ao estabelecimento de tratados internacionais importantes, como a Convenção SOLAS (Convenção Internacional para a Salvaguarda da Vida no Mar) de 1974, em vigor desde 1980, que tem como objetivo estabelecer padrões mínimos para a navegação segura, e a MARPOL (Convenção Internacional para o Controle de Poluição por Embarcações), de 1973, que entrou em vigor em 1983. A MARPOL trata da poluição causada por acidentes ou pela operação das embarcações, incluindo a poluição por óleo e por substâncias químicas e

tóxicas, transportadas em pacotes, efluentes líquidos e rejeitos, além da poluição atmosférica.

No entanto, quando da criação da IMO, algumas convenções internacionais importantes já haviam sido desenvolvidas, como a Convenção Internacional sobre Prevenção de Poluição no Mar por Óleo (OILPOL), de 1954. Nessa convenção, além do potencial poluidor do óleo, é reconhecido que a maior fonte de poluição por óleo no ambiente marinho decorre da operação das embarcações, como a limpeza de tanques e porões de carga.

O estabelecimento dessas convenções, em sua maioria, decorreu da observação dos impactos no ambiente marinho associados principalmente a acidentes no mar, como, por exemplo, a sequência de acidentes envolvendo petroleiros entre 1976 e 1977, próximo à costa norte-americana, que aumentou a demanda por ações preventivas. Dentre os acidentes envolvendo embarcações, os mais relevantes são os desastres de *Torrey Canyon*, *Amoco Cadiz* e *Exxon Valdez*.

Em 1967, a carga de mais de 120 mil toneladas de óleo bruto transportada pelo navio *Torrey Canyon* foi despejada no mar, alcançando principalmente a costa britânica e se tornando o maior incidente de poluição por óleo à época. Em volume de óleo derramado, esse incidente foi superado em 1978 com o derramamento de toda a carga do petroleiro *Amoco Cadiz* na costa britânica e francesa. O óleo atingiu uma grande extensão da costa, incluindo praias e outros ecossistemas costeiros, sendo responsável pela morte de milhões de espécimes marinhos. No entanto, foi em 1989 que ocorreu o incidente mais coberto pela mídia, o derramamento de 11 milhões de barris de óleo bruto do *Exxon Valdez*, na costa do Alasca, nos Estados Unidos. Após, tornou-se obrigatório que todos os petroleiros atendidos em portos norte-americanos tivessem casco duplo, através da OPA 90 (Lei de Poluição por Óleo, de 1990), a fim de reduzir o volume de óleo derramado em casos de acidentes. Posteriormente, essa exigência ou medida equivalente de proteção dos tanques de óleo foi incluída na MARPOL. O episódio com o *Exxon Valdez* causou severos impactos sobre a vida marinha, incluindo a morte de aves marinhas, peixes, mamíferos e invertebrados aquáticos.

Em um horizonte mais recente e ainda no contexto de fontes de poluição de origem oceânica, destaca-se o derramamento de óleo da BP (British Petroleum) no Golfo do México, em 2010, considerado o maior derramamento de óleo da história da indústria petrolífera. Foi resultado de um acidente durante a atividade de exploração de petróleo na plataforma *Deep Horizon*. O vazamento do óleo ocorreu por mais de 80 dias, totalizando o despejo de mais de quatro milhões de barris no ambiente marinho.

#### 1.4 EXEMPLOS DE ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA

Relacionada ao tema de poluição, uma aplicação da biotecnologia se refere ao controle de contaminantes no ambiente marinho, englobando tecnologias para a detecção, o monitoramento e o controle da poluição.

Uma possibilidade consiste na aplicação direta de micro-organismos modificados em áreas contaminadas, a fim de promover a digestão de substâncias químicas tóxicas. Um mecanismo se dá através da clonagem das enzimas presentes em espécies que degradam compostos tóxicos específicos. Nesse sentido, micro-organismos que toleram condições ambientais

severas, encontrados geralmente associados a fontes hidrotermais e ambientes hipersalinos, têm um papel relevante, pois podem ser utilizados como fonte de enzimas degradadoras resistentes a condições extremas de temperatura, salinidade e pressão. Dessa forma, o uso de ferramentas que possibilitem a localização de possíveis ambientes propícios ao desenvolvimento desse tipo de organismo também é fundamental para a elaboração de tecnologias aplicadas ao controle de poluição.

A biotecnologia também é aplicável no sentido do desenvolvimento de produtos não poluidores a serem utilizados como fertilizantes, fármacos, pesticidas e outros, em substituição aos atuais que possuem efeitos tóxicos e poluidores bastante conhecidos. Um exemplo é o desenvolvimento de pesticidas biológicos, que correspondem a substâncias e micro-organismos produzidos por plantas com material genético modificado. Além disso, a diminuição na necessidade do uso de fertilizantes na agricultura também poderia ser alcançada com melhorias genéticas relativas à fixação de nitrogênio das plantas de interesse agrícola. Essas ações atuariam no controle da poluição, ao evitar que uma grande quantidade de substâncias tóxicas alcançasse o meio marinho.

A detecção e o monitoramento de contaminantes no meio marinho também podem ser realizados no contexto da biotecnologia através do uso de biossensores, que são capazes de detectar substâncias com maior sensibilidade e de forma mais seletiva. Outra forma de monitoramento da poluição seria o uso de bioindicadores de poluição, como é o caso da presença de bactérias óleo-degradantes em áreas poluídas por óleo e de espécies de algas em regiões enriquecidas por nutrientes.

## 2 | ABORDAGENS METODOLÓGICAS

A poluição tem sido medida no ambiente marinho de diversas formas, sendo inferida basicamente através da medição e identificação do poluente/rejeito no ambiente e/ou pela sua toxicidade. A medição da poluição com foco no poluente pode ser feita através de análises no próprio ambiente, seja na água, no sedimento ou nos tecidos dos organismos, ou por suas características como a persistência no ambiente e a biodisponibilidade.

Nos casos em que a presença do poluente é observada em associação à água e/ou aos sedimentos, é possível que a poluição seja avaliada diretamente em cada um desses meios, através da coleta e medição das concentrações dos contaminantes. Para esse tipo de avaliação é necessário que seja conhecida uma condição de referência, que descreve uma condição basal a ser encontrada naturalmente em um ambiente na ausência da poluição. Dessa forma, a poluição é inferida através da alteração acima dos níveis de *background* esperados para determinada região e matriz. A medição das concentrações pode ser realizada em parcelas de água e sedimento, mas também pode ser realizada em amostras biológicas, como, por exemplo, em tecidos e órgãos de organismos presentes na área de estudo.

Em alguns casos, no entanto, a poluição não pode ser avaliada através de concentrações, como ocorre, por exemplo, com a poluição por resíduos sólidos. Nesse caso, a poluição

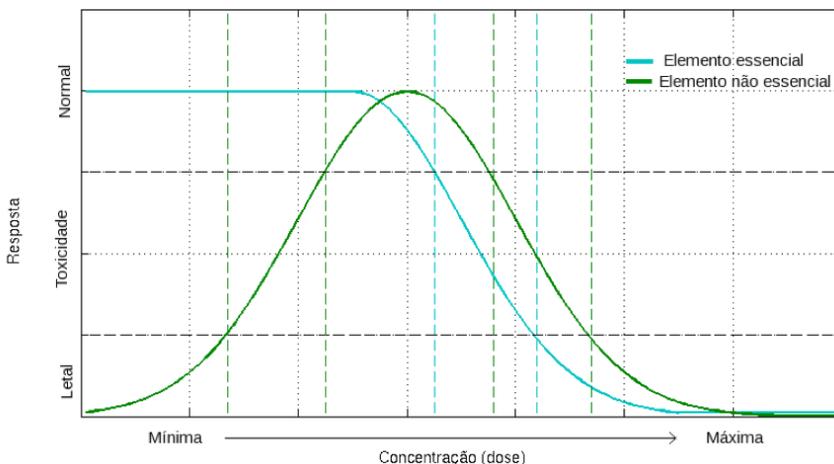
pode ser quantificada, dentre outras formas, através do cálculo da área poluída que é inferida por imagens aéreas e de satélite, no caso do lixo flutuante (também aplicável em derramamentos de óleo), ou por contagem e utilização de transectos, quando os rejeitos sólidos alcançam o substrato marinho.

No entanto, em alguns casos, a melhor abordagem se dá através da observação dos efeitos sobre os organismos e ecossistemas.

## 2.1 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Como observado no item 1.2, cada contaminante tem seu efeito sobre o ambiente biótico e diversos níveis de impacto. No nível bioquímico e celular, estão a alteração das concentrações de substâncias em órgãos específicos, como fígado e rins, a inibição da maturidade sexual e a inibição enzimática da síntese de proteínas. No nível sistêmico, é observada a resposta no organismo como um todo, que pode ser letal e subletal, neste último caso correspondendo às alterações genéticas, fisiológicas e comportamentais. No nível populacional, é observada a influência nas taxas de natalidade, crescimento e mortalidade. Por fim, no nível de comunidade, os efeitos correspondem às exposições acidentais agudas que causam retrocesso no processo de sucessão natural, à perda de biodiversidade e às exposições crônicas que têm efeito sobre a estrutura da comunidade.

A determinação dos efeitos dos poluentes é feita através de testes de toxicidade, os quais possibilitam descrever a relação entre as características de exposição e o espectro de efeitos tóxicos. Essa relação dose-resposta estabelece a probabilidade em que um contaminante induz os efeitos observados e a menor dose necessária para que os efeitos sejam induzidos. Dentro de uma população, a resposta a uma substância tóxica tende a ser semelhante. Para a maior parte dos efeitos observados, pequenas doses costumam não ser tóxicas, e, dependendo do caráter da substância, podem corresponder a quantidades essenciais para o desenvolvimento (Figura 2). No entanto, conforme ocorre o aumento nessa dose, a habilidade do organismo de depurar o agente tóxico ou suprimir seus efeitos é excedida.



**Figura 2.** Relação entre a concentração do elemento essencial ou não e a resposta observada nos organismos vivos.

O conhecimento dessa relação dose-resposta para os contaminantes permite que sejam estabelecidas as concentrações mínimas nas quais são observados os efeitos adversos sobre a biota e que sejam elaboradas as diretrizes para o controle de poluição no ambiente marinho.

A assimilação dos poluentes e, portanto, as respostas induzidas nos organismos estão intrinsecamente ligadas à biodisponibilidade dos contaminantes no ambiente. A biodisponibilidade se refere à extensão na qual uma substância ou produto químico pode ser absorvido por um organismo vivo por processos ativos (biológicos) ou passivos (físico-químicos). A assimilação dessas substâncias pode ser feita diretamente, a partir do ambiente em que o organismo está exposto, e/ou indiretamente, através do consumo de organismos contaminados.

Uma vez que o poluente é assimilado pelo organismo, pode ser acumulado em tecidos e órgãos, no processo chamado de bioacumulação. Com o tempo de exposição prolongado, esse organismo pode passar a apresentar concentrações do contaminante superiores àquelas encontradas no ambiente (bioconcentração). Como resultado da bioacumulação e da bioconcentração, ocorre o aumento progressivo de concentração ao longo da cadeia trófica, conhecido como biomagnificação. Assim, organismos de topo de cadeia tendem a apresentar concentrações mais elevadas que os organismos de base.

Considerando todos esses aspectos, o aumento de concentração dos poluentes nos organismos é dependente do tamanho dos indivíduos, que, por sua vez, está relacionado à idade (tempo de exposição) e à biomassa, da concentração ambiental, da forma química (biodisponibilidade) e da sua posição da cadeia trófica. Nesse contexto estão os bioindicadores e biomarcadores de poluição.

Os bioindicadores correspondem aos organismos, ou outra organização de alto nível, capazes de indicar a exposição e o efeito a determinadas condições ambientais, através de alterações fisiológicas e/ou comportamentais. Para a seleção de um bioindicador é necessário considerar a relevância biológica, metodológica e social. Dessa forma, é necessário que haja pouca variabilidade natural, permitindo que sejam mensuradas as alterações induzidas pelo contaminante e que essas alterações possam ser atribuídas a esse fator externo. Além disso, é preciso que as respostas nos bioindicadores sejam persistentes e ecologicamente significativas e que respondam de forma coerente às escalas e às complexidades de variação. No que diz respeito à relevância metodológica e social, é necessário que o método de análise seja econômico, acurado e viável, de fácil interpretação e embasado cientificamente.

Os biomarcadores se referem a substâncias, estruturas ou processos que podem ser utilizados como marcadores de exposição, efeitos e suscetibilidade a determinado contaminante. Correspondem a medidas funcionais de exposição a nível molecular, bioquímico, celular ou fisiológico dentro de uma organização biológica.

Os biomarcadores são sensíveis apenas à fração biologicamente ativa dos contaminantes acumulados no organismo, sendo característicos da fração biodisponível das substâncias químicas. Além disso, eles integram os efeitos sinérgicos de misturas complexas de contaminantes. Dessa forma, os biomarcadores podem ser específicos (ou seletivos), que refletem formas e mecanismos específicos de toxicidade, e não específicos, que refletem a resposta a um estresse conjunto fornecendo uma informação geral sobre o mecanismo de resposta.

### 2.1.1 TOXICOLOGIA

A toxicologia é o estudo quantitativo dos efeitos de uma substância danosa ou de condições de estresse sobre o organismo, que podem ser agudos ou crônicos. A toxicidade aguda, geralmente associada ao efeito letal da substância, corresponde ao efeito adverso observado em um curto período de tempo. Já a toxicidade crônica corresponde aos efeitos observados em uma escala mais longa de tempo e que estão associados ao efeito subletal do contaminante. A análise do impacto de substâncias nos organismos é feita tradicionalmente através de testes toxicológicos que basicamente avaliam como a dose de um determinado composto afeta um determinado organismo em um dado momento. Os bioensaios são realizados com o intuito de observar a resposta de organismos a doses e concentrações controladas.

Para a determinação da toxicidade aguda, é observada a resposta de um determinado grupo de organismos a diferentes quantidades do contaminante. Em geral, é avaliado o limite médio de tolerância (TL50, *median tolerance limit*) ou a concentração letal (LC50, *median lethal concentration*). No TL50 é determinada a concentração em que é observado 50% de sobrevivência; no LC50 é determinada a dose necessária para causar a morte de 50% da população testada, ambos após 24 ou 96 horas de exposição.

Para a determinação da toxicidade crônica, são realizados experimentos semelhantes, porém com tempo de exposição e/ou observação prolongado. No caso dos efeitos letais, o objetivo do teste seria a observação da resposta após um tempo de exposição ao contaminante similar ao tempo de exposição em ambiente natural, geralmente superior a 10% do tempo total de vida do organismo. Já para a avaliação dos efeitos subletais, as respostas de um determinado grupo sujeito ao estresse são comparadas às respostas observadas em um grupo controle.

Dessa forma, com os bioensaios, é possível determinar a resposta esperada para cada bioindicador. Assim, bioindicadores que naturalmente habitam determinados ambientes podem ser coletados e utilizados para indicar o grau de contaminação a que estão expostos, possibilitando a classificação ambiental da poluição. Esse tipo de monitoramento é baseado na amostragem de uma parcela representativa de organismos de uma comunidade, onde então é observado se o efeito tóxico ocorre no organismo e em qual proporção.

Os biomonitoramentos por amostragem populacional são amplamente utilizados para a determinação da poluição no ambiente marinho, como alternativa ou complementação a métodos de análises físico-químicas tradicionais. Um exemplo de biomonitoramento é o uso do imposex, que é uma síndrome de desregulação endócrina que induz o desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de gastrópodes marinhos, como biomarcador da presença de TBT no ambiente marinho. O uso do TBT está associado à atividade naval, tendo sido amplamente utilizado em tintas anti-incrustantes em cascos de embarcações. Dessa forma, a presença do imposex nas espécies bioindicadoras reflete o diagnóstico da poluição por TBT nas áreas onde elas são amostradas.

### 3 | APLICAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA MARINHA

O controle da poluição por óleo é um exemplo clássico da aplicação da biotecnologia. Esse tipo de poluição decorre principalmente da operação e de acidentes na exploração e transporte do petróleo e seus derivados. Quando há liberação do óleo no ambiente marinho, ocorre uma série de transformações físico-químicas e biológicas que incluem o espalhamento, a evaporação, a oxidação, a emulsificação, a dissolução e a sedimentação do óleo.

Em consequência da hidrodinâmica, o óleo sofre primeiramente o espalhamento e a dispersão horizontal e vertical. O espalhamento horizontal ocorre devido à força gravitacional e à tensão superficial. Quando ocorre a introdução do óleo por fontes próximas à superfície, a espessura e a viscosidade original da mancha são importantes ao tornar forças de inércia dominantes, que atuam como forças de resistência ao movimento. Com o tempo, há diminuição na espessura e na viscosidade e a mancha perde a coesão. Dessa forma, as forças gravitacionais deixam de ser importantes e ocorre o espalhamento do óleo.

Com o espalhamento inicial, por processos turbulentos superficiais e subsuperficiais, são desprendidas parcelas de óleo, com a mesma composição da mancha principal, que se dispersam no ambiente. A dispersão horizontal se dá pela ocorrência de vorticidade e por ondas de superfície induzidas pelo vento; e verticalmente o óleo pode ser transportado por dezenas de metros devido aos processos de mistura vertical. A hidrodinâmica é determinante no processo de dispersão, já que correntes e ondas intensas tendem a dispersar o óleo mais rapidamente. Na costa, a dispersão e comportamento do óleo também estão condicionados à maré. Dependendo da amplitude de maré, as manchas podem atingir áreas maiores da zona entremarés. Dessa forma, o tipo e o grau de intemperismo de óleo e as condições oceanográficas alteram as taxas de dispersão.

Em conjunto com a dispersão ocorre a evaporação e a dissolução do óleo. Fatores como a velocidade do vento, pressão atmosférica e radiação solar no local são extremamente importantes para determinar a taxa de evaporação e dissolução do óleo no ambiente, além das próprias características do óleo e das manchas. No entanto, as parcelas de óleo que já sofreram dispersão, por serem menores, são mais propensas a sofrer degradação no ambiente marinho. Como o óleo é formado por uma gama de componentes, estes possuem diferentes pontos de evaporação, solubilidade e saturação na água. Apesar disso, essas taxas são alteradas com a permanência do óleo no meio marinho, já que os processos de oxidação e biodegradação do óleo alteram a solubilidade dos seus componentes. A oxidação, que pode ser intensificada pela presença de catalisadores como os metais dissolvidos, ocorre quando os componentes químicos dos hidrocarbonetos se combinam com o oxigênio, aumentando a sua hidrossolubilidade. Também ocorre a foto-oxidação através da radiação ultravioleta.

Com a dispersão e dissolução do óleo na coluna d'água, os organismos decompositores iniciam o processo de biodegradação. No entanto, a presença do óleo bloqueia a difusão do oxigênio na água, impedindo a respiração dos demais organismos, e como o óleo adere ao corpo dos animais, é afetada a capacidade de isolamento térmico, assim como a de flutuabilidade.

Quando há a ingestão do óleo, os efeitos tóxicos são observados no sistema gastrointestinal, além de diminuir a resiliência a infestações parasitárias e o sucesso reprodutivo. No entanto, é difícil quantificar de uma forma geral os efeitos da poluição do óleo, já que o petróleo bruto é composto por diversos componentes leves que podem ser armazenados pelos organismos e transferidos ao longo da teia alimentar.

O óleo também passa pelo processo de emulsificação, que ocorre quando há o acúmulo de partículas na interface água-óleo na forma de uma densa camada que não permite a floculação ou coalescência por outros mecanismos. Essa característica auxilia na remoção e diminui a capacidade de dispersão do óleo na superfície oceânica e altera consideravelmente as propriedades de densidade e viscosidade do óleo, e irá também afetar processos de dissolução, dispersão e espalhamento.

Quando o óleo persiste no ambiente o suficiente para se aderir em partículas de sedimento em suspensão ou matéria orgânica, ele pode sedimentar no fundo oceânico. Essa capacidade de adesão depende da quantidade de sólidos suspensos e da profundidade da coluna d'água. Se a liberação ocorre próximo à costa, onde há interação com o sedimento, os processos ambientais são fortemente afetados pelas interações entre os componentes dissolvidos e dispersos do óleo e as partículas sedimentares.

Os métodos comuns de contenção do óleo em ambiente marinho incluem a remoção mecânica, a adição de dispersantes químicos e a queima do óleo. Essas tecnologias em geral são caras e geram impacto sobre o meio ambiente. A biorremediação se encaixa nesse contexto como uma alternativa ao tratamento da contaminação através da degradação de contaminantes orgânicos complexos. No entanto, pouco tem sido aplicado em ambientes oceânicos abertos.

A primeira patente de um micro-organismo geneticamente modificado foi solicitada pela General Electric na década de 70. A cepa da espécie *Pseudomonas putida* foi alterada para decompor rapidamente diversos componentes de óleo bruto, no entanto nunca foi utilizada comercialmente, exemplificando as barreiras ainda encontradas na aplicação desse tipo de tecnologia. Em casos de derramamento de óleo, para que a contenção seja eficiente é necessário que as ações tenham efeito em um horizonte de apenas alguns dias, o que exigiria um enorme estoque disponível de agentes microbiológicos. Isso torna praticamente inviável o uso dessa aplicação da biotecnologia nos dias atuais para o controle da poluição acidental, que é imprevisível, mas pode ser uma solução em locais confinados que representam fontes pontuais de óleo, como tanques de lastro e estações de tratamento de rejeitos.

Nesse sentido, muitos micro-organismos, alguns geneticamente modificados, têm sido utilizados para a biodegradação de compostos tóxicos em locais de despejo e em estações de tratamento de efluentes municipais e industriais. A introdução desses micro-organismos no meio ambiente, no entanto, é vista com cautela, devido ao impacto ambiental associado à presença, muitas vezes persistida, desses organismos no ambiente marinho. Dessa forma, a escolha da utilização desse tipo de técnica deve ser realizada após a ponderação entre os riscos associados à introdução no ambiente desses organismos geneticamente modificados e os benefícios obtidos no controle da poluição.

No campo da toxicologia marinha, alguns estudos são essenciais para a aplicação da

biotecnologia. O primeiro deles se refere ao entendimento dos mecanismos moleculares por trás dos diferentes tipos de respostas aos contaminantes e as diferentes sensibilidades entre as espécies, o que compreende a clonagem, caracterização e identificação de mudanças evolutivas de genes e proteínas envolvidos na toxicidade.

Os outros pontos se referem à identificação de biomarcadores moleculares, em que é feita a identificação dos genes e de outros biomarcadores relacionados aos efeitos observados e a identificação de polimorfismos e de diferenças de espécies na sequência genética e na função proteica relacionadas às diferentes sensibilidades químicas, e ao uso de bioensaios usando bioindicadores manipulados geneticamente.

## 4 | CONCLUSÕES

A poluição no oceano, na maioria dos casos, é de origem difusa e, dessa forma, muitas vezes é difícil a quantificação da contaminação e de seus impactos. No entanto, ao longo dos anos foram observados avanços no que diz respeito ao monitoramento e ao desenvolvimento de tecnologias que auxiliam no combate e na redução da poluição. A aplicação da biotecnologia no campo da poluição marinha se torna estratégica nesse sentido, entretanto muitas barreiras tecnológicas e comerciais precisam ser transpostas para que a engenharia genética seja efetivamente utilizada com esse intuito. A natureza corporativa da maioria dos estudos nesse campo torna difícil identificar o real estado de desenvolvimento de biotecnologias aplicadas no controle da poluição, no entanto fica claro como avanços nessa área podem ter impactos significativos na determinação, no controle e na prevenção da poluição no mar.

## REFERÊNCIAS

- Baptista-Neto, J.A.; Wlanner-Kersanach, M.; Patchineelam, S.M. (2008) **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência. 412p.
- Bartell, S.M. (2006) Biomarkers, bioindicators, and ecological risk - a brief review and evaluation. **Environmental Bioindicators**. 1: 60-73.
- Boehm, P.D.; Feist, D.L. (1982) Subsurface distribution of petroleum from and offshore well blowout - the Ixtoc-I blowout. **Environmental Science & Technology**. 16(2): 67-74.
- Burger, J.; Gochfeld, M. (2001) On developing bioindicators for human and ecological health. **Environmental Monitoring and Assessment**. 66(1): 23-46.
- Chang, L.W. (Ed.) (1996) **Toxicology of metals**. V. 1. Florida: CRC Press. 1232p.
- Clark, R.B. (2001) **Marine Pollution**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press. 248p.
- Cormack, D. (1999) **Response to Marine Oil Pollution - Review and Assessment**. Netherlands: Springer. 387p.
- Dickinson, E. (2009) Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food Hydrocolloids**. 23(6):

1473-1482.

Dickinson, E. (2010) Food emulsions and foams: stabilization by particles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. 15(1-2): 40-49.

Elliott, A.J. (1986) Shear diffusion and the spread of oil in the surface layers of the North Sea. **Deutsche Hydrografische Zeitschrift**. 39(3): 113-137.

Hahn, M.E.; Stegeman, J.J. (2000) Molecular biology and biotechnology in marine toxicology, in opportunities for environmental applications of marine biotechnology. In: **Workshop on Opportunities for Advancement of Environmental Applications of Marine Biotechnology**, 1999, Washington. Proceedings... Washington: National Academy Press. 112-125.

Hofer, T.N. (2008) **Marine Pollution: New Research**. New York: Nova Science Publishers. 466p.

Kenyon, K.W.; Kridler, E. (1969) Laysan albatrosses swallow indigestible matter. **The Auk**. 86(2): 339-343.

Lyons, S.M.; Panem, S. (1985) Marine biotechnology and pollution control. In: Kato, W. et al. (Ed.). **Ocean Space Utilization**. Tokyo: Springer. 307-314.

Mensah, P.K.; Palmer, C.G.; Muller, W.J. (2014) Lethal and sublethal effects of pesticides on aquatic organisms: the case of a freshwater shrimp exposure to Roundup®. In: Larramendy, M.L.; Soloneski, S. (Ed.). **Pesticides - Toxic Aspects**. Rijeka: InTech. 163-185.

National Research Council. (2003) **Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects**. Washington: National Academies Press. 265p.

National Research Council. (2005) **Oil Spill Dispersants: Efficacy and Effects**. Washington: National Academies Press. 378p.

Nriagu, J.O. (1989) A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. **Nature**. 338: 47-49.

Paniagua-Michel J.; Rosales, A. (2015) Marine bioremediation - a sustainable biotechnology of petroleum hydrocarbons biodegradation in coastal and marine environments. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**. 6(2): 1-6.

Payne, J.R.; Clayton, J.; John, R. et al. (2003) Oil/suspended particulate material interactions and sedimentation. **Spill Bulletin of Science, Technology & Society**. 8(2): 201-221.

Payne, J.R.; McNabb Jr., G.D. (1985) Weathering of petroleum in the marine environment. **Marine Technology Society Journal**. 18(3): 24-42.

Ricketts, H.J.; Morgan, A.J.; Spurgeon, D.J.; Kille, P. (2004) Measurement of annetocin gene expression: a new reproductive biomarker in earthworm ecotoxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 57(1): 4-10.

Scholtz, M.T.; Voldner, E.; Mcmillan, A.C.; Van Heyst, B.J. (2002) A pesticide emission model (PEM) Part I: Model development. **Atmospheric Environment**. 36(32): 5005-5013.

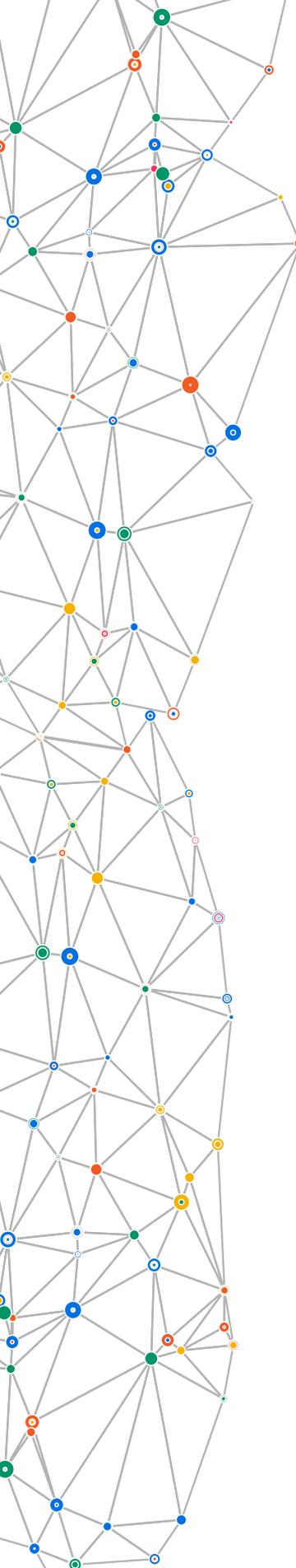
Sharma, R. (2015) Environmental issues of deep-sea mining. **Procedia Earth and Planetary Science**. 11: 204-211.

Tchounwou, P.B.; Yedjou, C.G.; Patlolla, A.K.; Sutton, D.J. (2012) Heavy metals toxicity and the environment. **EXS**. 101: 133-164.

Tomczak, M. (1984) Defining marine pollution: a comparison of definitions used by international conventions. **Marine Policy**. 8(4): 311-322.

Yusoff, A.; Murray, B.S. (2011) Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**. 25(1): 42-55, .





# IMPORTÂNCIA DE ÁREAS MARINHAS PROTEGIDAS PARA CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE E DO PATRIMÔNIO BIOTECNOLÓGICO BRASILEIRO

Ronaldo B. Francini-Filho<sup>a</sup>  
Cynthia B. Silveira<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal da Paraíba  
<sup>b</sup> San Diego State University

## RESUMO

A criação de Áreas Marinhas Protegidas (AMPs), locais onde atividades extrativistas são proibidas ou limitadas, tem sido apontada como principal alternativa para conservação da biodiversidade e exploração sustentável de recursos marinhos. A eficiência das AMPs depende da seleção de áreas que incluam elevado endemismo e riqueza de espécies, habitats críticos para o ciclo de vida de diferentes espécies, e de um arcabouço sociopolítico e econômico adequado para sua manutenção. As AMPs abarcam 25% do mar territorial brasileiro, incluindo áreas que abrigam diversos organismos com elevado potencial biotecnológico (e.g. algas e esponjas). No entanto, menos de 2% de habitats críticos, como recifes e bancos de esponjas, encontram-se atualmente protegidos, e as AMPs existentes carecem de infraestrutura e fiscalização adequadas. Considerando a extensão da costa brasileira (~7500km), são grandes as possibilidades de descoberta de organismos com potencial biotecnológico. No entanto, sem proteção adequada através da manutenção das AMPs já existentes, assim como a criação de novas AMPs com base em planejamentos sistemáticos, muitos desses organismos podem desaparecer antes mesmo de serem descobertos.

# 1 | O QUE SÃO ÁREAS MARINHAS PROTEGIDAS

A biodiversidade é considerada uma das principais características responsáveis pela produtividade e funcionalidade dos ecossistemas (Duffy et al., 2017). Apesar do registro da extinção de centenas de espécies de plantas e animais no meio terrestre (Holdgate, 1996), as espécies marinhas, devido a características biológicas particulares, foram consideradas até pouco tempo atrás praticamente imunes às atividades humanas (Malakoff, 1997). No entanto, o recente colapso de importantes estoques pesqueiros (Parrish et al., 1998), os primeiros registros de extinção de animais marinhos (Roberts; Hawkins, 1999) e o reconhecimento de que diversas espécies se encontram em estado crítico de ameaça (Polidoro et al., 2009) tornam urgente a necessidade de se identificar as melhores alternativas para conservar a biodiversidade e explorar os recursos marinhos de forma sustentável.

Os seres humanos já utilizam entre um quarto e um terço de toda a produtividade primária de alguns dos ecossistemas marinhos mais produtivos do planeta (Pauly; Christensen, 1995). Ao apropriar-se dessa produtividade, vêm eliminando sistematicamente os níveis mais altos das cadeias tróficas, ameaçando de extinção a megafauna (Jackson, 1997) e comprometendo, em última instância, a funcionalidade dos ecossistemas marinhos (Pauly; Maria-Lourdes, 2005). O reconhecimento do estado crítico de degradação dos ambientes marinhos em escala global (Pandolfi et al., 2003; Bellwood et al., 2004) e a constatação da ineficiência de ferramentas tradicionais de conservação e manejo pesqueiro, como limitações de esforço e captura (Roberts; Polunin, 1993; Conover; Munch, 2002), levaram a um amplo debate sobre as novas estratégias necessárias para a exploração sustentável de recursos marinhos (Lauck et al., 1998).

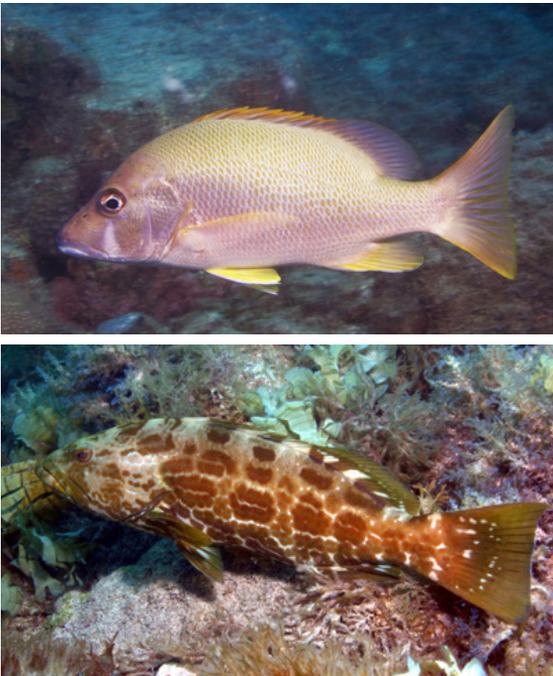
A criação de Áreas Marinhas Protegidas (AMPs), locais onde toda atividade extrativista é proibida ou limitada, de acordo com a fragilidade do ecossistema, tem sido apontada como principal (ou talvez única) alternativa para conservação da biodiversidade e exploração sustentável de recursos marinhos (Roberts; Hawkins, 2000). A proteção integral contra a pesca (i.e. AMPs com alta restrição) pode levar à manutenção da biodiversidade, à recuperação da integridade biológica em uma determinada área e ao beneficiamento de áreas adjacentes desprotegidas, através da exportação de ovos e larvas por correntes marítimas e da emigração de indivíduos jovens e adultos (Gell; Roberts, 2003; Francini-Filho; Moura, 2008)(Figura 1).

Para que as AMPs possam atingir os objetivos de conservação da biodiversidade e manejo da pesca, devem incluir habitats críticos para o ciclo de vida de diferentes espécies, ter tamanho adequado que abarque a área de vida de espécies relativamente grandes e móveis e ter arcabouços sociopolíticos e econômicos adequados para sua manutenção (Conover et al., 2000; Lindeman et al., 2000). Por exemplo, algumas espécies de peixes recifais, como o dentão (*Lutjanus jocu*) e o mero (*Epinephelus itajara*), refugiam-se em manguezais quando jovens, migrando para ambientes marginais (e.g. planícies de gramas marinhas e ilhas de vegetação flutuante) e depois para os recifes, após atingirem um determinado tamanho corporal (Cocheret et al., 2002;



**Figura 1.** Cardume do budião-azul, *Scarus trispinosus*, espécie comercialmente importante e beneficiada pela criação de Áreas Marinhas Protegidas no Brasil. Foto: R. B. Francini-Filho.

Mumby et al., 2004). Ainda, diversas espécies de lutjanídeos e serranídeos, como o dentão (*Lutjanus jocu*) e o badejo (*Mycteroperca bonaci*), agregam-se em épocas e locais específicos para reprodução, geralmente em períodos próximos à lua cheia e em áreas mais fundas e próximas à quebra da plataforma continental, formando grupos compostos por dezenas ou até centenas de indivíduos (Carter; Perrine, 1994; Domier; Colin, 1997) (Figura 2). Essas agregações reprodutivas contribuem para a reposição das populações dessas espécies, como fontes concentradas de larvas, mas também aumentam a vulnerabilidade de suas populações à pesca (Sadovy; Domier, 2005). Portanto, a proteção de habitats ao longo do gradiente da plataforma continental (“corredores”) garante a sobrevivência durante fases críticas da vida e a sustentabilidade das populações de espécies exploradas em longo prazo (Conover et al., 2000; Lindeman et al., 2000).



**Figura 2.** Dentão, *Lutjanus jocu* (esquerda), e badejo, *Mycteroperca bonaci* (direita), espécies comercialmente importantes que utilizam manguezais e estuários como berçário e migram para áreas fundas no período reprodutivo. Fotos: R.B. Francini-Filho.

Além de aspectos biológicos, o sucesso das AMPs depende de uma série de variáveis sociais, econômicas e políticas (Bunce et al., 2000; Balmford et al., 2004). Por exemplo, o sucesso no processo de criação e implantação de AMPs pode depender do envolvimento efetivo de comunidades locais (Russ; Alcalá, 1999). A ideia por trás do “manejo de base comunitária” é que o alto grau de envolvimento da comunidade local no processo de elaboração, implantação e revisão das estratégias de manejo leva a maior aceitação das restrições adotadas (Johannes, 1978). Ainda mais importante é garantir que as AMPs sejam criadas em locais sensíveis e com elevada biodiversidade, com o padrão contrário (proteção de áreas com baixa biodiversidade e conflitos econômicos) sendo observado no Brasil hoje (Giglio et al., 2018).

## 2 | ÁREAS MARINHAS PROTEGIDAS NO BRASIL

No Brasil, as Áreas Marinhas Protegidas federais são regidas pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC). Existem ainda Unidades de Conservação (UCs) estaduais e municipais que incluem áreas costeiras e marinhas. As UCs são divididas em dois grupos principais: de uso direto (i.e. atividades extrativistas, como a pesca, são permitidas, desde que adequadamente regulamentadas) e de uso indireto (i.e. nenhuma atividade extrativista permitida). Neste último grupo estão inseridas UCs que permitem atividades como o turismo (e.g. Parques Nacionais, PARNA) e UCs que não permitem nem mesmo o turismo, apenas atividades de pesquisa científica (e.g. Reservas Biológicas, REBIO). As UCs de uso direto mais comuns são as Áreas de Proteção Ambiental (APA) e Reservas Extrativistas (RESEX), as quais geralmente abarcam comunidades tradicionais que vivem historicamente em harmonia com recursos naturais.

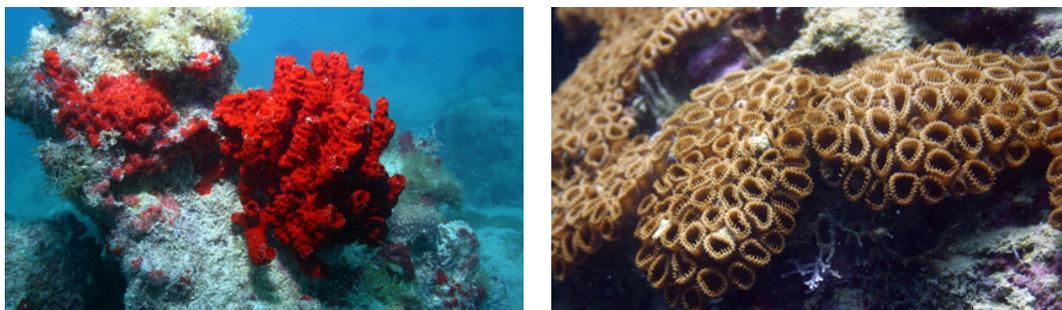
As primeiras AMPs foram criadas no Brasil no final da década de 70 e início dos anos 80. Foram estabelecidas com alto grau de restrição (i.e., nenhuma atividade extrativista permitida) e tiveram como alvo áreas de grande beleza cênica e elevada biodiversidade, como a REBIO Atol das Rocas (criada em 5 de junho de 1979), o PARNA Abrolhos (6 de abril de 1983) e o PARNA Fernando de Noronha (14 de outubro de 1988). Na década de 90 foram criadas importantes UCs estaduais, como o Parque Estadual Marinho (PEM) do Parcel de Manuel Luís (11 de junho de 1991) e o PEM da Laje de Santos (27 de setembro de 1993). Na década de 90 e início dos anos 2000 foram criadas diversas UCs de uso direto no meio marinho, como a APA Costa dos Corais (23 de outubro de 1997) e a RESEX de Corumbau (21 de setembro de 2000), ambas abrigando extensas áreas com recifes de corais. Na última década, foi constatada uma diminuição drástica na criação de UCs marinhas no Brasil, com exceção da criação do Refúgio de Vida Silvestre (REVIS) de Alcatrazes, em 2 de agosto de 2016 (Figura 3). Em 2018, foram criadas quatro UCs marinhas que somam cerca de 925.000km<sup>2</sup>, passando de 1,5% para 25% a área protegida na Zona Econômica Exclusiva (ZEE) brasileira. No entanto, estas áreas cobrem, em quase sua totalidade, apenas mar aberto, deixando desprotegidos habitats rasos que abrigam espécies endêmicas no entorno de ilhas oceânicas brasileiras (Giglio et al., 2018).



**Figura 3.** Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, BA (esquerda) e Reserva Extrativista Marinha do Corumbau, BA (direita), duas Áreas Marinhas Protegidas brasileiras que abrigam espécies com potencial biotecnológico.

### 3 | ÁREAS MARINHAS PROTEGIDAS E BIOTECNOLOGIA

Os primeiros estudos sobre compostos marinhos bioativos foram realizados na década de 50 (Bergman; Feeney, 1951; Costa-Lotufo et al., 2006). Desde então, houve um grande aumento na busca de novos compostos bioativos e drogas derivados de organismos marinhos em todo o mundo, incluindo principalmente algas, esponjas e tunicados (Bhakuni, 1994; Munro et al., 1999; Tabares et al., 2011). Esses compostos combatem bactérias e outros micro-organismos patogênicos, funcionam como antioxidantes e inseticidas e apresentam grande potencial para tratar trombose (i.e., obstrução vascular) e evitar a formação e crescimento de tumores, com aplicações importantes na medicina humana (e.g. Paula et al., 2011; Vo et al., 2011). As esponjas, em particular, apresentam associação com grande abundância e diversidade de micro-organismos. Bactérias da ordem Actinomycetes (filó Actinobacteria) são bastante comuns em esponjas e produzem diversos compostos que combatem o câncer (Fenical et al., 2009; Tabares et al., 2011) (Figura 4).



**Figura 4.** Exemplos de organismos com potencial biotecnológico encontrados em Áreas Marinhas Protegidas Brasileiras: esponjas (esquerda) e zoantídeos (direita). Fotos: R.B. Francini-Filho.

Micro-organismos associados a esponjas, corais e diversos outros organismos marinhos são não apenas fonte direta de produtos de interesse biotecnológico, mas também contribuem para a saúde geral do ecossistema. Relações ecológicas equilibradas são fundamentais para a manutenção da viabilidade de organismos fontes de produtos naturais. Bactérias e vírus são os principais responsáveis pela reciclagem de matéria orgânica e inorgânica em ecossistemas marinhos. Entre 59 e 100% da produção líquida de carbono pela fotossíntese passa por metabolismo microbiano em recifes de corais, por exemplo (Arias-Gonzalez et al., 1997; Faure et al., 2010). Em recifes encontrados dentro de AMPs com alto nível de fiscalização no Arquipélago de Abrolhos, a comunidade microbiana é composta principalmente de Alphaproteobacteria, Cyanobacteria e Gammaproteobacteria, normalmente encontradas em águas oceânicas como SAR11 (Bruce et al., 2011). Em recifes localizados fora de AMPs e, portanto, sob alta pressão de pesca, a comunidade bacteriana é dominada por potenciais patógenos como bactérias dos grupos *Vibrio* e *Flavobacteria* (Bruce et al., 2011). Com a mudança da composição da comunidade microbiana, o papel de micro-organismos no processamento de carbono também é alterado. A reciclagem de carbono orgânico por bactérias em recifes localizados dentro do Parque Nacional Marinho de Abrolhos é realizada com alta eficiência, e os nutrientes inorgânicos retornam para os produtores primários (Silveira et al., 2015). Já fora do Parque, o metabolismo microbiano ocorre com baixa eficiência e a matéria orgânica fica acumulada no compartimento microbiano, assim como em material particulado em suspensão (Silveira et al., 2015; Silveira et al., 2017). Tanto a biomassa microbiana como material particulado são fontes de matéria orgânica para invertebrados e peixes detritívoros, e indiretamente para peixes onívoros que se alimentam de invertebrados (Silveira et al., 2015; De Goeij, 2009). Dessa forma, a atividade microbiana em áreas sob alto impacto antrópico leva a uma significativa redistribuição da biomassa no ecossistema, com aumento de dominância de certos organismos oportunistas e diminuição da diversidade (Silveira et al., 2017).

As AMPs funcionam como reservatórios de biodiversidade marinha frente ao crescimento desenfreado de impactos antrópicos, particularmente sobrepesca, poluição, mineração e turismo mal planejado. Apesar da vasta costa brasileira (~8500 km de extensão), estudos com objetivo de prospecção de compostos bioativos com fins farmacológicos começaram a ser realizados no Brasil apenas na última década (Costa-Lotufo et al., 2006). Muitos dos organismos com potencial biotecnológico foram encontrados e estudados dentro de UCs: a alga *Stipopodium zonale*, coletada no Parque Estadual da Costa do Sol, é produtora de compostos ativos contra *Leishmania* (Soares et al., 2016); algas dos gêneros *Caulerpa* e *Dictyota*, coletadas da APA Fernando de Noronha - Rocas - São Pedro e São Paulo, são produtoras de compostos com atividade antiviral (Pinto et al., 2012); a gorgônia *Phyllogorgia dilatata* e a esponja *Mycale microsigmatosa*, coletadas na RESEX de Arraial do Cabo, produzem compostos que inibem o assentamento de cracas, sendo de interesse para uso como produtos anti-incrustantes (Pereira et al., 2002).

## 4

## ABORDAGENS METODOLÓGICAS

#### 4.1 MONITORAMENTO DE ÁREAS MARINHAS PROTEGIDAS

O monitoramento de biodiversidade em AMPs é feito através de diversas técnicas, como o mergulho autônomo (*scuba*), imagens de satélite (sensoriamento remoto), mapeamento de habitats com uso de sonares, obtenção de imagens com veículos remotamente operados (ROV) e até mesmo o uso de submarinos. Essas ferramentas permitem a coleta de amostras para estudo em laboratório, assim como estimativas de abundância e estado de conservação de organismos marinhos ao longo do tempo, evitando assim o desaparecimento de espécies com grande potencial biotecnológico. Por exemplo, em recifes de corais o monitoramento de peixes é feito geralmente através da contagem direta por mergulhadores, em uma metodologia conhecida como censo visual. Os censos são feitos com um tempo predeterminado e em áreas padronizadas, delimitadas por trenas colocadas sobre o substrato, com protocolos que variam ligeiramente de uma técnica para outra (Minte-Vera et al., 2008). As comunidades bentônicas (i.e., organismos que recobrem o fundo) são caracterizadas através da contagem direta em áreas padronizadas ou através do registro de fotos e vídeos que são posteriormente analisados com o apoio de programas específicos para análise de imagens.

#### 4.2 TIPOS DE ANÁLISES E BANCOS DE DADOS

Análises de dados ecológicos sobre monitoramento de biodiversidade em AMPs incluem comparações de abundância no espaço e no tempo, sendo empregadas diversas ferramentas estatísticas uni e multivariadas (Francini-Filho et al., 2013). Mais recentemente, começaram a ser empregadas técnicas baseadas em algoritmos de aprendizagem (inteligência artificial), as quais permitem, por exemplo, prever a ocorrência de espécies em áreas não amostradas e avaliar potenciais impactos futuros sobre a biodiversidade causados por mudanças climáticas (Coni et al., 2017). Análises morfológicas e genéticas são empregadas para identificação taxonômica e história evolutiva das espécies (Rocha et al., 2007). Finalmente, amostras biológicas coletadas em campo subsidiam a prospecção de compostos com potencial biotecnológico em laboratório (Costa-Lotufo et al., 2006).

## 5 | CONCLUSÕES

Apesar de avanços significativos na ciência sobre AMPs e sua aplicabilidade (e.g. Roberts et al., 2001; Russ et al., 2004), a capacidade destas em beneficiar a pesca e sustentar a exploração humana em escalas espaciais e temporais amplas permanece um tema controverso (Willis et al., 2003; Sale et al., 2005), levando a questões sobre o arcabouço científico, político, socioeconômico e institucional necessário para a implementação de redes de AMPs eficientes (Bunce et al., 2000; Sale et al., 2005). De fato, um dos principais problemas enfrentados pelas AMPs é a falta de fiscalização efetiva. Cabe ressaltar que no Brasil, hoje, menos de 2% das AMPs protegem habitats críticos. A maior parte das UCs carece de infraestrutura adequada e fiscali-

zação. Há necessidade urgente de ampliação da proteção, principalmente para habitats ainda pouco representados em UCs, como os bancos de rodólitos (áreas povoadas por algas calcárias de vida livre) e recifes profundos, como o Grande Recife do Amazonas (Francini-Filho et al. 2018). O Brasil possui os maiores bancos de rodólitos do mundo (Amado-Filho et al., 2012), nos quais ocorrem diversas espécies de invertebrados bentônicos com elevado potencial biotecnológico (Amado-Filho; Pereira-Filho, 2012).

Finalmente, é necessária a integração e colaboração em diferentes áreas de conhecimento, particularmente química, farmácia, microbiologia e ecologia, além da ampliação nos esforços para prospecção de organismos marinhos. Apesar de os oceanos conterem cerca de 50% das espécies do planeta, apenas algumas centenas delas foram estudadas com o objetivo de identificar compostos bioativos (Faulkner, 1995; Costa-Lotufo et al., 2006). Considerando a vasta costa brasileira, o potencial de descoberta de organismos com importância biotecnológica é grande. No entanto, sem proteção adequada através da criação de AMPs, muitos desses organismos podem desaparecer antes mesmo de serem descobertos.

## REFERÊNCIAS

Amado-Filho, G.M.; Pereira-Filho, G.H. (2012) Rhodolith beds in Brazil: a new potential habitat for marine bioprospection. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 22(4): 782-788.

Amado-Filho, G.; Moura, R.L.; Bastos, A.; Salgado, L.T.; Sumida, P.; Güth, A.; Francini-Filho, R.B.; Pereira-Filho, G.; Abrantes, D.; Brasileiro, P.; Bahia, R.; Leal, R.; Kaufman, L.; Kleypas, J.; Farina, M.; Thompson, F. (2012) Rhodolith beds are major CaCO<sub>3</sub> bio-factories in the Tropical South West Atlantic. **PLoS ONE**. 7:e35171. doi: 10.1371/journal.pone.0035171.

Arias-Gonzalez, J.E. et al. (1997) Trophic functioning of the Tiahura reef sector, Moorea island, French Polynesia. **Coral Reefs**. 16(4): 231-246.

Balmford, A.; Gravestock, P.; Hockley, N.; McClean, C.; Roberts, C.M. (2004) The worldwide costs of marine protected areas. **Proc. Nat. Acad. Sci**. 101: 9694-9697.

Bellwood, D.R.; Hughes, T.P.; Folke, C.; Nyström, M. (2004) Confronting the coral reef crisis. **Nature**. 429: 827-833.

Bergman, W.; Feeney, R.J. (1951) Nucleosides of sponges. **J. Org. Chem**. 16: 981-987.

Bhakuni, D.S. (1994) Bioactive marine alkaloids. **J Indian Chem Soc**. 71:329-340.

Bruce, T.; Meirelles, P.M.; Garcia, G.; Paranhos, R.; Rezende, C.E.; Moura, R.L.; Coni, E.O.; Vasconcelos, A.T.; Amado Filho, G.; Hatay, M.; Schmieder, R. (2012) Abrolhos bank reef health evaluated by means of water quality, microbial diversity, benthic cover, and fish biomass data. **PLoS One**. 7(6): p.e36687.

Bunce, L.; Townsley, P.; Pomeroy, R.; Pollmac, R. (2000) **Socioeconomic manual for coral reef management**. Global Coral Reef Monitoring Network, Australian Institute of Marine Science, Australia.

Carter, J.; Perrine, D. (1994) A spawning aggregation of dog snapper, *Lutjanus jocu* (Pisces: Lutjanidae) in Belize, Central America. **Bull. Mar. Sci**. 55(1): 228-234.

Cocheret, E.; Pollux, B.J.A.; Nagelkerken, I.; Van der Velde, G. (2002) Post-settlement life cycle migration patterns and habitat preference of coral reef fish that use seagrass and mangrove habitats as nurseries

**Est. Coast. Shelf Sci.** 55: 309-321.

Coni, E.O.; Ferreira, C.M.; Meirelles, P.M.; Menezes, R.; Santana, E.F.; Moreira, A.P.B.; Amado-Filho, G.M.; Ferreira, B.P.; Pereira-Filho, G.H.; Thompson, F.L.; Moura, R.L. (2017) Modeling abundance, growth, and health of the solitary coral *Scolymia wellsi* (Mussidae) in turbid SW Atlantic coral reefs. **Mar. Biol.** 164(4): 66.

Conover, D.O.; Munch, S.B. (2002) Sustaining fish yields over evolutionary time scales. **Science.** 297: 94-96.

Conover, D.O.; Travis, J.; Coleman, F.C. (2000) Essential fish habitat and marine reserves: an introduction to the Second Mote Symposium in Fisheries Ecology. **Bull. Mar. Sci.** 66: 527-534.

Costa-Lotufo, L.V.; Pessoa, C.; Moraes, M.E.A.; Almeida, A.M.P.; Moraes, M.O.; Cruz Lotufo, T.M. (2006) Marine organisms from Brazil as source of potential anticancer agents. **Advances in Phytomedicine.** 2:181-196.

De Goeij, J.M. et al. (2013) Surviving in a marine desert: the sponge loop retains resources within coral reefs. **Science.** 342.6154: 108-110.

Domeier, M.L.; Colin, P.L. (1997) Tropical reef fish spawning aggregations: defined and reviewed. **Bull. Mar. Sci.** 60: 698-726.

Duffy, J.E.; Godwin, C.M.; Cardinale, B.J. (2017) Biodiversity effects in the wild are common and as strong as key drivers of productivity. **Nature.** 549:261-264.

Faulkner D.J. (1995) Marine natural products. **Nat Prod Rep.** 12:223-269.

Faure, V. et al. (2010) Modelling the spatial and temporal variability of the SW lagoon of New Caledonia I: A new biogeochemical model based on microbial loop recycling. **Marine Pollution Bulletin.** 61.7: 465-479.

Fenical, W.; Jensen, P.R.; Palladino, M.A.; Lam, K.S.; Lloyd, G.K.; Potts, B.C. (2009) Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). **Bioorgan Med Chem.** 17: 2175-2180.

Francini-Filho, R.B.; Moura, R.L. (2008) Dynamics of fish assemblage on coral reefs subjected to different management regimes in the Abrolhos Bank, Eastern Brazil. **Aquat Conserv.** 18:1166-1179.

Francini-Filho, R.B.; Asp, N.E.; Siegle, E.; Hocevar, J.; Lowyck, K.; D'Avila, N.; Vasconcelos, A.A.; Baitelo, R.; Rezende, C.E.; Omachi, C.Y.; Thompson, C.C.; Thompson, F.L. (2018) Perspectives on the Great Amazon Reef: extension, biodiversity, and threats. **Frontiers Mar Sci.** 5:142.

Gell, F.R.; Roberts, C.M. (2003) Benefits beyond boundaries: the fishery effects of marine reserves. **Trends Ecol. Evol.** 18: 448-455.

Giglio, V.J.; Pinheiro, H.T.; Bender, M.G.; Bonaldo, R.M.; Costa-Lotufo, L.V.; Ferreira, C.E.; Floeter, S.R.; Freire, A.; Gasparini, J.L.; Joyeux, J.C.; Krajewski, J.P.; Lindner, A.; Longo, G.O.; Lotufo, T.M.C.; Loyola, R.; Luiz, O.J.; Macieira, R.M.; Magris, R.A.; Francini-Filho, R.B. (2018) Large and remote marine protected areas in the South Atlantic Ocean are flawed and raise concerns: Comments on Soares and Lucas (2018). **Mar Pol.** 96:13-17.

Holdgate, M. (1996) The ecological significance of biological diversity. **Ambio.** 25(6): 409-416.

Jackson, J.B.C. (1997) Reefs since Columbus. **Coral Reefs.** 16: S23-S31.

Johannes, R.E. (1978) Traditional marine conservation methods in Oceania and their demise. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 9: 349-364.

Lauck, T.; Clark, C.W.; Mangel, M.; Munro, G. (1998) Implementing the precautionary principle in fisheries management through marine reserves. **Ecol. Appl.** 8: S72-S78.

Lindeman, K.C.; Pugliese, R.; Waugh, G.T.; Ault, J.S. (2000) Developmental patterns within a multispecies reef fishery: management applications for essential fish habitats and protected areas. **Bull. Mar. Sci.**

66: 929-956.

Malakoff, D. (1997) Extinction on the high seas. **Science**. 277: 486-488.

Mumby, P.J.; Edwards, A.J.; Arias-Gonzalez, J.E.; Lindeman, K.C.; Blackwell, P.G.; Gall, A.; Gorczynska, M.I.; Harborne, A.R.; Pescod, C.L.; Renken, H.; Wabnitz, C.C.C.; Llewellyn, G. (2004) Mangroves enhance the biomass of coral reef fish communities in the Caribbean. **Nature**. 427: 533-536.

Munro, M.H.; Blunt, J.W.; Dumdei, E.J.; Hickford, S.J.; Lill, R.E.; Li, S.; Battershill, C.N.; Duckworth, A.R. (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **Journal of Biotechnology**. 70(1): 15-25.

Pandolfi, J.M.; Bradburry, R.H.; Sala, E.; Hughes, T.P.; Bjorndal, K.A.; Cooke, R.G.; McArdle, D.; McCleanachan, L.; Newman, N.J.H.; Paredes, G.; Warner, R.R.; Jackson, J.B.C. (2003) Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. **Science**. 301: 955-958.

Parrish, D.L.; Behnke, R.J.; Gephard, S.R.; McCormick, S.D.; Reeves, G.H. (1998) Why aren't there more Atlantic salmon (*Salmo salar*)? **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 55: 281-287.

Paula, J.C.; Vallim, M.A.; Teixeira, V.L. (2011) What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). **Rev Bras Farmacogn.** 21: 216-228.

Pauly, D.; Christensen, V. (1995) Primary production required to sustain global fisheries. **Nature**. 374: 255-257.

Pauly, D.; Maria-Lourdes, P. (2005) Fishing down marine food webs: it is far more pervasive than we thought. **Bull. Mar. Sci.** 76(2): 197-212.

Pereira, R.C.; Carvalho, A.G.V.; Gama, B.A.P.; Coutinho, R. (2002) Field experimental evaluation of secondary metabolites from marine invertebrates as antifoulants. **Brazilian Journal of Biology**. 62(2): 311-320.

Pinto, A.M.V.; Leite, J.P.G.; Ferreira, W.J.; Cavalcanti, D.N.; Villaça, R.C.; Giongo, V.; Teixeira, V.L.; Paixão, I.C.N.D.P. (2012) Marine natural seaweed products as potential antiviral drugs against bovine viral diarrhoea virus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 22(4): 813-817.

Polidoro, B.A.; Livingstone, S.R.; Carpenter, K.E.; Hutchinson, B.; Mast, R.B.; Pilcher, N.J.; Mitcheson, Y.S.; Valenti, S.V. (2009) **Status of the world's marine species**. Wildlife in a changing world - An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species. 55.

Roberts, C.M.; Hawkins, J.P. (1999) Extinction risk in the sea. **Trends Ecol. Evol.** 14: 241-246.

Roberts, C.M.; Polunin N.V.C. (1993) Marine reserves: simple solutions to managing complex fisheries? **Ambio**. 22: 363-368.

Rocha, L.A.; Craig, M.T.; Bowen, B.W. (2007) Phylogeography and the conservation of coral reef fishes. **Coral Reefs**. 26(3): 501-512.

Russ, G.R.; Alcala, A.C. (1999) Management histories of Sumilon and Apo Marine Reserves, Philippines, and their influence on national marine resource policy. **Coral Reefs**. 18: 307-319.

Sadovy, Y.; Domeier, M. (2005) Are aggregation fisheries sustainable? Reef fish fisheries as a case study. **Coral Reefs**. 24(2): 254-262.

Silveira, C.B.; Silva-Lima, A.W.; Francini-Filho, R.B.; Marques, J.S.; Almeida, M.G.; Thompson, C.C.; Rezende, C.E.; Paranhos, R.; Moura, R.L.; Salomon, P.S.; Thompson, F.L. (2015) Microbial and sponge loops modify fish production in phase-shifting coral reefs. **Environmental Microbiology**. 17(10): 3832-3846.

Silveira, C.B.; Cavalcanti, G.S.; Walter, J.M.; Silva-Lima, A.W.; Dinsdale, E.A.; Bourne, D.G.; Thompson, C.C.; Thompson, F.L. (2017) Microbial processes driving coral reef organic carbon flow. **FEMS Microbiology Reviews**.

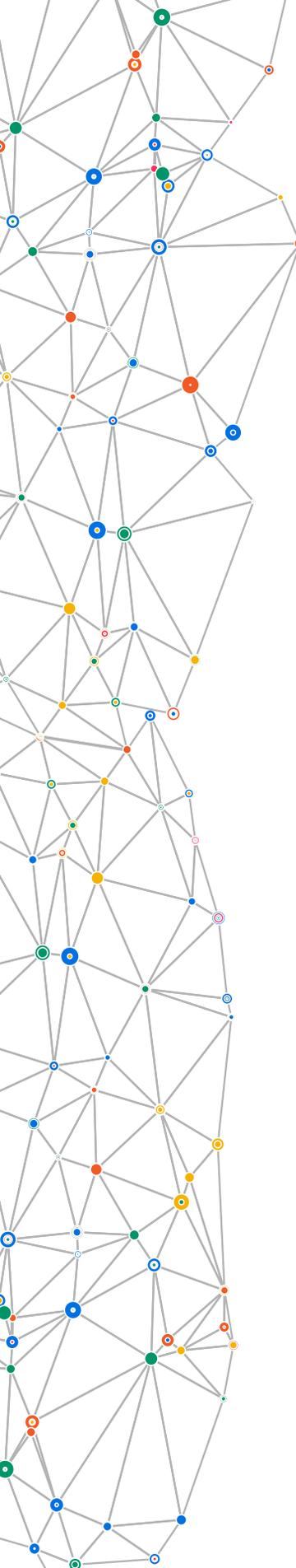
Soares, D.C.; Szlachta, M.M.; Teixeira, V.L.; Soares, A.R.; Saraiva, E.M. (2016) The brown alga *Styopodium zonale* (Dictyotaceae): a potential source of anti-leishmania drugs. **Marine Drugs** 14(9): 163.

Tabares, P.; Pimentel-Elardo, S.M.; Schirmeister, T.; Hünig, T.; Hentschel, U. (2011) Anti-protease and immunomodulatory activities of bacteria associated with Caribbean sponges. **Mar Biotechnol.** 13: 883-892.

Vo, T.; Ngo, D.; Ta, Q.V.; Kim, S. (2011) Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. **Eur J Pharm Sci.** 44: 11-20.

Xie, L.; Meng-Hua, C.; Jing, L.; Yang, X.M.; Huang, Q.J. (2011) Antithrombotic effect of a polysaccharide fraction from *Laminaria japonica* from the south China Sea. **Phytother Res.** 25: 1362-1366.





# A GESTÃO DO USO ECONÔMICO DA BIODIVERSIDADE COMO GARANTIA DE RECURSOS PARA A CONSERVAÇÃO AMBIENTAL

Rafael de Sá Marques<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ministério do Meio Ambiente

## RESUMO

Desafios e oportunidades para a gestão e o uso econômico da biodiversidade são abordados neste capítulo. A gestão pode ser alcançada através da implementação de regras para o uso da biodiversidade, criando um ambiente favorável à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico e inovação. O Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) e o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) são iniciativas que visam trabalhar esta temática. São abordados aspectos relacionados aos modelos de negócios sustentáveis e a inclusão social, incluindo o direito de povos e comunidades tradicionais.

# 1 | INTRODUÇÃO

O aquecimento global, as mudanças climáticas e a extinção de espécies constituem uma realidade que já impacta a vida humana. Seja por meio da intensificação dos desastres naturais e seus impactos diretos na qualidade de vida das pessoas, seja por meio dos inúmeros e repetidos estudos científicos já publicados, está cada vez mais evidente que o futuro da humanidade depende de nossa capacidade de enfrentar esses processos. Mas saber da existência do problema é apenas o primeiro passo para entender a dimensão do desafio que nos aguarda em um futuro muito próximo. Importa lembrar que, para muitas populações, essa já é uma realidade desesperadora. Infelizmente, esse diagnóstico não é recente e nem de fácil solução, seja do ponto de vista político, econômico ou tecnológico. Os países, os cientistas, as sociedades têm avançado no debate sobre soluções que podem mitigar seus impactos, e quem sabe, reverter a curva de deterioração ambiental causada pela humanidade no longo prazo. A gestão racional do uso, especialmente o econômico, da biodiversidade, prevista na Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB e no Protocolo de Nagoya sobre Acesso a Recursos Genéticos e Repartição de Benefícios decorrentes da sua utilização pode ser uma ferramenta estruturante de políticas e ações nesse sentido. Pode significar, talvez, a mais concreta ferramenta de cobrança por serviços ambientais a ser inserida nos sistemas legais e econômicos. O sistema de acesso e repartição de benefícios pode catalisar a mudança de um paradigma fundado na boa vontade e na ajuda voluntária para outro em que as sociedades assumem a necessidade da conservação ambiental como condição de sobrevivência inescapável e a traduz em obrigação ética, moral e econômica.

Durante a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (Rio-92), o Brasil recebeu líderes mundiais para discutir soluções para problemas ambientais que todos sabiam ser iminentes e graves. Desse encontro nasceu a CDB, um tratado que tem como partes 195 países e a União Europeia, mais do que a Organização das Nações Unidas, que tem 193. A legitimidade de um reconhecimento mais amplo que o da própria ONU nos autoriza a acreditar que as soluções acordadas nesse fórum têm grande potencial de se tornarem efetivas. Mas antes de abordar o marco legal que trata do uso da biodiversidade, inclusive das respectivas obrigações que nascem desse uso, vale a pena atualizar algumas informações sobre o estado de conservação da biodiversidade no nosso planeta. Afinal, é a partir da consciência sobre a dimensão do problema que os cidadãos se dispõem a priorizar soluções.

Pode parecer alarmismo dizer que a sexta extinção em massa de espécies está a pleno vapor no planeta Terra. Para os cientistas, contudo, esse fato já é uma realidade suficientemente grave para não ser tratada por eufemismos. Quem nos traz essa informação é a União Internacional para Conservação da Natureza - IUCN, uma reconhecida entidade que congrega mais de 1300 organizações governamentais e da sociedade civil e que recebe a contribuição de mais de 16 mil especialistas de todo o mundo. Vale destacar brevemente alguns dos fatos cientificamente comprovados que levam a essa conclusão.

Há hoje 19.928 espécies vegetais e animais documentadas pela IUCN como ameaçadas de extinção. Esse dado pode estar bem abaixo da realidade, visto que apenas 3% das 1,9 milhão de espécies já descritas tiveram suas condições de sobrevivência pesquisadas. Além disso, um em cada quatro mamíferos e uma em cada oito aves enfrentam risco de extinção em futuro próximo. Os anfíbios correm o mesmo risco na proporção de uma para cada três espécies conhecidas. Metade das espécies de tartarugas também. O número total de espécies de animais ameaçados de extinção subiu de 5.205 em 1996 para 8.462 em 2017. Indonésia, Índia, Brasil e China são os países com o maior número de espécies nessa situação. São países megadiversos, com grandes populações e, em geral, dificuldades orçamentárias para enfrentar esse desafio.

Além do desaparecimento das espécies em ritmo mais rápido do que a capacidade dos cientistas de identificá-las, também estamos perdendo povos e culturas tradicionais que existem há séculos ou milênios. De acordo com a UNESCO, nos últimos 10 anos, cerca de 100 línguas e suas respectivas culturas foram extintas no mundo. Mais de 400 outras línguas estão em risco crítico de desaparecimento e 51 delas contam com apenas um representante vivo. Segundo o Atlas Mundial das Línguas em Risco da UNESCO, pelo menos 43% das seis mil línguas que se estima sejam faladas estão em risco de desaparecer.

Cada povo e cultura que desaparece da face do planeta leva consigo um conjunto inestimável de conhecimentos sobre usos medicinais e terapêuticos ou sobre formas de cultivo e seleção das plantas, animais e organismos vivos dos biomas onde viviam. Em um mundo urbanizado, essas tristes mudanças acontecem sem que a maioria de nós se dê conta. O desaparecimento de espécies e culturas não faz parte do dia a dia das cidades.

As pessoas tendem a sentir que a vida nas cidades acontece quase de forma autônoma e desvinculada do restante do planeta. Ainda assim, as cidades continuam a receber os impactos de eventos climáticos extremos e continuam a depender de todo o sistema ambiental, cultural e produtivo que acontece nas áreas rurais, de florestas, dos oceanos etc. Torna-se cada vez mais urgente a necessidade de implementação de mecanismos estruturantes de canalização de recursos para o financiamento de políticas relacionadas à qualidade do ar, à disponibilidade hídrica nos centros urbanos, à existência de ecossistemas minimamente equilibrados para suportar a atividade agrícola, à disponibilidade de todas as formas de serviços ecossistêmicos essenciais a vida humana. Não será por meio de doações ou de acordos e compromissos voluntários que a humanidade conseguirá responder a essas demandas na dimensão e na velocidade necessárias. As obrigações relacionadas à repartição de benefícios pelo uso do patrimônio genético e dos conhecimentos tradicionais constituem um mecanismo que, quando efetivamente implementado pelos países signatários da CDB, têm potencial para ajudar a custear as ações de adaptação e mitigação de impactos.

### **1.10 CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (CGEN) E O SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (SISGEN)**

O Brasil tem sido protagonista nessa agenda em nível global. Em julho de 2000 foi editada a primeira legislação sobre o tema, por meio de Medida Provisória. A partir de então, foram

desenvolvidos e aprimorados conceitos e instituições relacionados a todo o sistema de acesso e repartição de benefícios dos recursos genéticos (ABS, na sua sigla em inglês). Em 2015 entrou em vigor a Lei nº 13.123, que revisou a legislação anterior, transformando o foco do modelo brasileiro de “comando e controle de processos” para “gestão e fiscalização de resultados”. Basicamente migramos de um paradigma focado em evitar a biopirataria para outro que prioriza o incentivo ao uso responsável tanto do patrimônio genético – PG quanto dos conhecimentos tradicionais a ele associados – CTA.

De forma resumida podemos elencar alguns dos principais avanços da nova legislação nacional e que a posicionam na vanguarda desse tema em nível mundial.

1. Os recursos da repartição de benefícios – RB devem ser obrigatoriamente utilizados em atividades de conservação da biodiversidade e valorização dos conhecimentos tradicionais. No modelo anterior, o beneficiário podia ser o titular do território onde fosse obtido o patrimônio genético e podia usar os recursos em qualquer finalidade, mesmo que não guardasse qualquer relação com a conservação ambiental.
2. O fato gerador, a base de cálculo e o percentual da repartição de benefícios estão claramente definidos e sua aferição pode ser objetiva e factual. Essa clareza facilita tanto o cumprimento das obrigações pelo administrado quanto a fiscalização pelo Estado, reduz a mora processual e a judicialização. No modelo brasileiro anterior e, infelizmente, nos modelos de alguns outros países, a obrigação relacionada à RB era abstrata e confundia os processos da cadeia de inovação tecnológica com a real obtenção de benefícios econômicos a serem repartidos. Além disso havia a dificuldade de aferição do que seria um valor “justo e equitativo”, conforme determina a legislação, entre outros problemas.
3. O foco da gestão é no resultado e não nos processos. Tendo em vista a maior objetividade na definição da incidência da RB e da respectiva fiscalização, viabiliza-se a desoneração de toda a cadeia de inovação dos controles *a priori*. Os controles serão feitos *a posteriori* por meio de ferramentas de rastreabilidade a partir das informações contidas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN e de pontos de checagem preestabelecidos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, o Registro Nacional de Cultivares – RNC.
4. Sistema “declaratório e eletrônico” em lugar de um sistema “autorizativo por decisão colegiada” para acesso, ou seja, para pesquisa e desenvolvimento tecnológico. Ao eliminar os custos de transação e econômicos relacionados às atividades de acesso ao PG e ao CTA, cria-se incentivo a que pesquisadores e instituições de ciência e tecnologia busquem sua regularização e, ao mesmo tempo, alimentem o Estado com as informações importantes para a rastreabilidade.
5. As regras estão relacionadas aos tipos de uso que se dá ao PG e ao CTA. Essa diferenciação

facilita o atendimento de previsões da CDB nas quais se reconhece o tratamento diferenciado para as atividades relacionados à agricultura e alimentação, a partir do entendimento de que a segurança alimentar é uma prioridade que justifica essa diferenciação. Dessa forma, o modelo brasileiro tem um conjunto de normas comuns a todas as atividades, mas, em alguns aspectos, diferencia os tratamentos a serem dados para: a) usos de PG e CTA relacionados à agricultura e alimentação; b) usos não relacionados à agricultura e alimentação.

6. A participação da sociedade civil no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN foi garantida em lei. No modelo anterior, apenas o Estado tinha representação no CGEN, que é a autoridade máxima para o sistema de ABS no Brasil. A composição do CGEN conta, atualmente, com a participação de representações dos setores acadêmico, empresarial e dos povos indígenas, comunidades tradicionais e agricultores tradicionais, com direito a voz e voto.
7. Criação do Fundo Nacional para a Repartição de Benefícios – FNRB. O Fundo resolve dois problemas-chave dos sistemas de ABS: a) como fazer a RB chegar a outros povos e comunidades, além daquelas que já negociaram um acordo de repartição de benefícios – ARB, quando todos compartilham o mesmo CTA; b) dar garantia às empresas que assinem um ARB com uma determinada comunidade de que elas não sofrerão demandas judiciais apresentadas por outras comunidades que compartilhem esse CTA. A obrigação de fazer a RB com os povos e comunidades tradicionais que compartilham esse conhecimento passa a ser do Fundo.
8. A garantia de direitos de povos e comunidades tradicionais está assegurada em lei. O artigo 9º da Lei 13.123, de 2015, define que o acesso ao conhecimento tradicional associado de origem identificável está condicionado à obtenção do consentimento prévio informado – CPI. E o artigo 10º positiva em lei uma lista importante de direitos dos povos e comunidades. Além disso, a legislação nacional é a única de que se tem conhecimento no mundo que assegura a esses povos e comunidades: a) participação com direito a voz e voto no órgão máximo da gestão do sistema de ABS, participando inclusive de decisões em terceira instância recursal de processos relativos a autos de infração; b) garantia de que tenham o poder de escolher o tipo de instrumento comprobatório da obtenção do CPI que lhes seja mais adequado; c) reconhecimento dos protocolos comunitários como um instrumento legal apto a comprovar o CPI; d) participação no Comitê Gestor do FNRB, com direito a voz e voto.
9. Regularização das atividades em desacordo com a Medida Provisória que vigia antes da aprovação da nova Lei. Esse mecanismo de transição trouxe segurança jurídica para os usuários que buscavam regularização, bem como incentivo a todos que estavam à margem do sistema para que formalizem suas atividades. A regularização de atividades exclusivamente de pesquisa científica foi bastante simplificada e depende apenas do seu registro no SISGEN. Usuários que desenvolveram outras atividades em desacordo com a norma anterior

poderão ter as sanções suspensas, e até extintas, mediante a assinatura de Termo de Compromisso, no qual se comprometem com o pagamento da RB referente aos últimos cinco anos anteriores a sua celebração, nos termos dos artigos 38 a 41 da Lei 13.123.

Nos últimos anos, mais de 100 países já ratificaram o Protocolo de Nagoya e cerca de 50 países passaram a ter leis nacionais que tratam do tema, como União Europeia, Austrália, África do Sul, Índia, Peru, Colômbia, Costa Rica, Indonésia, Etiópia, entre tantos. Outros estão em processo de elaboração de seus marcos legais, como China, Malásia, Uruguai, México, Argentina. Infelizmente, muitos países seguiram o primeiro modelo brasileiro ao elaborar suas normas e começam a passar pelas mesmas experiências e dificuldades por nós vivenciadas na última década. Por outro lado, há forte tendência de que aqueles que estão elaborando e discutindo seus textos neste momento adotem regras e conceitos mais próximos daqueles vigentes na nova legislação brasileira.

O estabelecimento do novo marco legal sobre acesso e repartição de benefícios pavimenta o caminho para o desenvolvimento de políticas públicas que incentivem e consolidem os modelos de negócio da “economia da floresta em pé”, que promovam o desenvolvimento econômico nacional com inclusão social e conservação da biodiversidade nativa.

A nova lei retirou os empecilhos que dificultavam a pesquisa e o desenvolvimento de produtos oriundos do acesso à biodiversidade brasileira. Precisa-se agora investir no fortalecimento de cadeias produtivas locais que utilizam a biodiversidade brasileira e incluam de forma justa povos indígenas e comunidades tradicionais, possibilitando um salto de qualidade nos produtos por eles fornecidos e em suas condições de vida. Ao estimular o uso sustentável de ativos florestais, conferindo-lhes maior conteúdo tecnológico e valor agregado, conseguiremos promover a substituição de muitas práticas predatórias nas economias locais. A implementação de uma cadeia de produção inclusiva das populações das florestas as fortalece, ainda, em sua condição de agentes de defesa dos biomas em que vivem. Da mesma forma, ampliam-se suas condições para o exercício do controle social na luta pela garantia de seus próprios direitos.

## 2 | CONCLUSÕES

A implementação de um sistema de regras de uso da biodiversidade que possa ao mesmo tempo garantir recursos para a mitigação dos problemas ambientais globais; criar um ambiente favorável à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico; favorecer modelos de negócios mais sustentáveis dentro do produto interno nacional; promover a inclusão social e a garantia de direitos de povos e comunidades há muito ansiosos por justiça não só é viável como factível. Um sistema de ABS funcional e equilibrado tem grande potencial de contribuição, ao se somar às demais estratégias de conservação e preservação do nosso meio ambiente. Acima disso, pode ser uma ferramenta importante para que as sociedades modernas respondam de forma mais estruturada e consistente aos desafios ambientais que se têm mostrado cada vez mais urgentes e assustadores.

## REFERÊNCIAS

Brasil (2016) **Decreto nº 8772, de 11 de maio de 2016**. Regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília.

Brasil (2015) **Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015**. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1º, a alínea j do Artigo 8º, a alínea c do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto no 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, e dá outras providências. Brasília.

Brasil (2001) **Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001**. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição, os arts. 1º, 8º, alínea "j", 10, alínea "c", 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. Brasília.

CBD (2017) **Clearing-House Mechanism (CHM) of the Convention on Biological Diversity**. Disponível em: <<https://www.cbd.int/chm>>.

Confederação Nacional da Indústria (2016) **Sustentabilidade, biodiversidade e florestas: novos modelos de negócios para a indústria do amanhã**. Brasília: CNI. Disponível em: <<http://www.portaldaindustria.com.br/cni/canais/cni-sustentabilidade/edicao-2016/>>.

IPCC (2014a) Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part B: Regional aspects. In: Barros, V.R. et al. (ed.). **Contribution of Working Group 2 to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press.

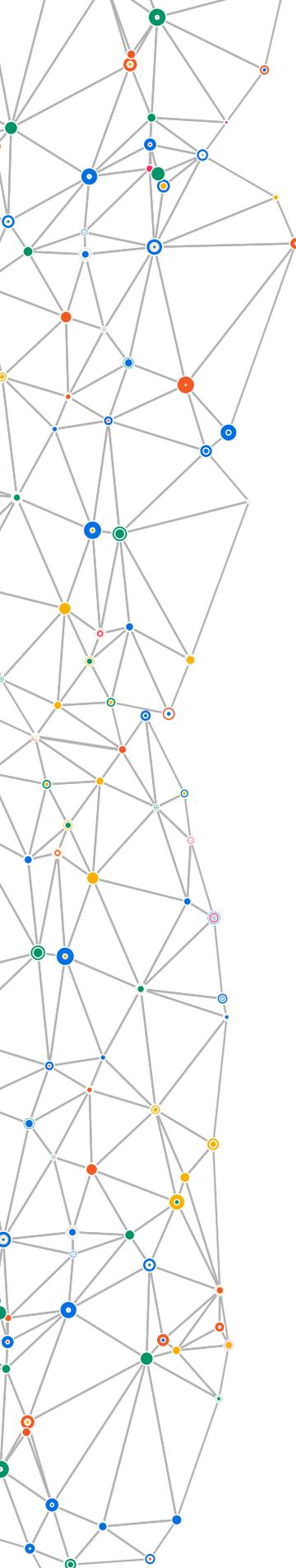
IPCC (2014b) Climate change 2014: mitigation of climate change. In: Edenhofer, O. et al. (ed.). **Contribution of Working Group 3 to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press.

IPCC (2014c) Climate change 2014: synthesis report. In: Core, W. T. et al. (ed.). **Contribution of Working Groups 1, 2 and 3 to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Geneva, Switzerland.

IUCN (2017) **The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-2**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>.

Moseley, C. (ed.). (2010) **Atlas of the World's Languages in Danger**. 3. ed. Paris: UNESCO Publishing. Online: <<http://www.unesco.org/culture/en/endangeredlanguages/atlas>>.





# DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ORIUNDOS DA BIOTECNOLOGIA MARINHA

Adriana Nascimento Santos Cartaxo<sup>a</sup>  
Nínive Aguiar Colonello<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ministério da Saúde

## RESUMO

A Biotecnologia Marinha apresenta um diverso campo de aplicação, que inclui a área da saúde, haja vista a relação dos fármacos com princípios ativos de origem marinha que estão em circulação no mercado, por isso a relevância de trazer esta informação neste capítulo, com a identificação de aprovação pelas agências reguladoras dos Estados Unidos, União Europeia e do Brasil. Considerando a vasta costa brasileira e, portanto, a quantidade de organismos marinhos existentes que podem suscitar inovações a partir das demandas atuais, apresentam-se as competências e interesses para a saúde e as orientações nas ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação do Ministério da Saúde. Por fim, encontram-se relacionadas as pesquisas fomentadas por este ministério, sua atuação no Comitê Executivo de Biotecnologia Marinha; bem como as recentes ações realizadas e as perspectivas futuras para a Biotecnologia Marinha em Saúde.

## 1 | INTRODUÇÃO

O Ministério da Saúde integra o Comitê Executivo de Biotecnologia Marinha, pertencente à Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (Biomar/Cirm), coordenado pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). A ação Biomar tem como propósito fomentar o aproveitamento sustentável do potencial biotecnológico dos organismos marinhos, com foco no desenvolvimento de conhecimentos, absorção de tecnologias e promoção da inovação, nas áreas de saúde humana, ambiental, agropecuária e industrial, agregando oportunidades de parcerias interministeriais, entre instituições públicas e público/privadas para o desenvolvimento de pesquisas científicas, tecnológicas e inovadoras.

A maioria das pessoas não faz uma relação imediata entre a biotecnologia marinha e a saúde humana, contudo já existem alguns medicamentos relacionados a compostos de origem marinha em uso clínico, para tratamento de pacientes, como anticâncer (citarabina, trabectedina, mesilato de eribulina, brentuximabe vedotina), antiviral (vidarabina, iota-carragenina), analgésico neuropático (ziconotida) e antilipêmico (ésteres etílicos do ácido ômega-3). Atualmente, no Brasil, os pesquisadores estão realizando bioprospecção de organismos marinhos produtores de moléculas com ação antitumoral, antirretroviral, antimicrobiana, antibacteriana, desenvolvendo novas moléculas com ação inseticida e para diagnóstico de patógenos emergentes, como o zikavírus e outros arbovírus.

Portanto, o Ministério da Saúde como órgão do Poder Executivo Federal responsável pela organização e elaboração de planos e políticas públicas voltados para a promoção, prevenção e assistência à saúde da população, vem realizando diversas ações de fomento a pesquisas e desenvolvimento tecnológico, em razão da sua função de dispor de condições para a proteção e recuperação da saúde, reduzindo as enfermidades, controlando as doenças endêmicas e parasitárias e melhorando a vigilância à saúde, dando assim mais qualidade de vida à população.

O fomento às pesquisas pelo Ministério da Saúde é realizado mediante a integração e a construção de parcerias com os órgãos federais, as unidades da Federação, os municípios, a iniciativa privada e a sociedade, em consonância com a sua missão institucional.

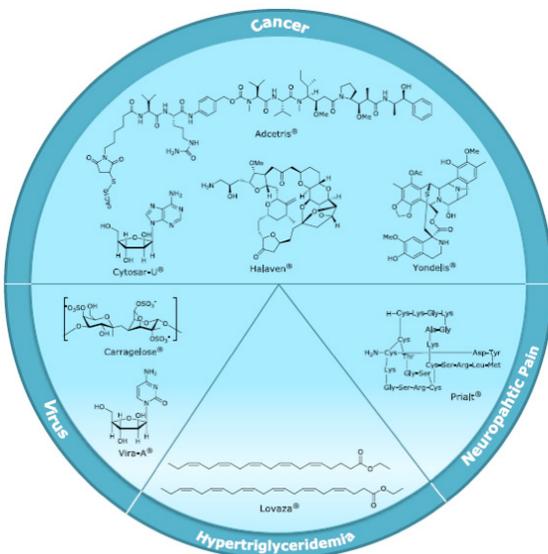
## 2 | FÁRMACOS DE ORIGEM MARINHA EM CIRCULAÇÃO NO MERCADO

Os metabólitos secundários de organismos marinhos geralmente possuem funções ecológicas na natureza, uma vez que são usados para defesa contra predadores e contra micro-organismos patógenos, para competição interespecífica e para facilitar processos reprodutivos. Os metabólitos secundários produzidos por organismos marinhos ou incorporados de sua dieta apresentam vasta diversidade química, podendo ter estruturas moleculares peculiares, sendo uma fonte ilimitada de novas biomoléculas que são utilizadas no campo do desenvolvi-

mento de fármacos (Agrawal et al., 2016).

Inúmeros trabalhos reportam compostos marinhos com atividade biológica e seu potencial farmacêutico. Os principais compostos responsáveis por atividades farmacológicas relevantes estão agrupados nas seguintes classes químicas: policetídeos, terpenos, peptídeos, alcaloides, chiquimatos e polissacarídeos (Mayer et al., 2013). Interessantes atividades farmacológicas como, por exemplo, antitumoral, antiviral, analgésica, antibiótica, antiprotozoária e anti-inflamatória já foram demonstradas por compostos provenientes de algas e fungos endofíticos (De Oliveira et al., 2012; Ahmadi et al., 2015), esponjas (Thomas et al., 2010), tunicados (Palanisamy et al., 2017), celenterados (Rocha et al., 2011) e moluscos (Pati et al., 2015).

A investigação de produtos naturais marinhos com atividade farmacológica teve início na década de 1950 com o isolamento de dois nucleosídeos, espongouridina e espongotimidina, da esponja *Tectitethya crypta*, que inspiraram a síntese de ara-nucleosídeos como o Ara-A (vidarabina) e o Ara-C (citarabina) que são atualmente utilizados no tratamento da infecção pelo vírus herpes e leucemia mieloide aguda, respectivamente (Taber et al., 1977; Löwenberg et al., 1999). Atualmente existem oito produtos aprovados para uso terapêutico (Tabela 1), considerando as seguintes agências regulatórias: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA) e Agência Europeia de Medicamentos (EMA), sendo que três deles (Prialt, Yondelis e Carragelose) correspondem a moléculas sem nenhuma modificação estrutural, enquanto os outros passaram por otimização dos protótipos em diferentes estágios de seu desenvolvimento. A Figura 1 mostra as estruturas químicas dos princípios ativos dos medicamentos citados. Além dos fármacos já aprovados para uso, há na atualidade 26 produtos naturais marinhos promissores, em diferentes estágios de ensaios clínicos, sendo 23 com atividade anticâncer, dois estudados para tratamento de esquizofrenia (anabaseína) e Alzheimer (briostatina 1) e um para dor crônica (tetrodotoxina) (Martins et al., 2014). Assim, estima-se que, nos próximos anos, novos fármacos de origem marinha venham a ser aprovados pelas agências regulatórias para uso terapêutico.



**Figura 1.** Estruturas químicas dos fármacos marinhos presentes no mercado divididos por área terapêutica. Fonte: Martins et al., 2014.

**Tabela 1.** Medicamentos contendo compostos naturais e seus derivados de origem marinha aprovados pelas agências regulatórias (Anvisa, FDA e EMA) para uso terapêutico. Fontes: 1. Sistema Datavisa, disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br>>; 2. FDA, disponível em: <<https://www.fda.gov/>>; 3. EMA, disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/ema/>>; 4. Martins et al., 2014; 5. Simões et al., 2017.

NOME COMERCIAL	PRINCÍPIO ATIVO	ANVISA	FDA	EMA	USO
Aracytin / Cytosar-U	Citarabina / ARA-C	1999 <sup>1</sup>	1969 <sup>4</sup>	2004 <sup>4</sup>	Anticâncer
Yondelis	Trabectedina/ET-743	2010, registro cancelado <sup>1</sup>	2015 <sup>2</sup>	2007 <sup>4</sup>	Anticâncer
Halaven	Mesilato de eribulina/ E7389	2013 <sup>1</sup>	2010 <sup>4</sup>	2011 <sup>4</sup>	Anticâncer
Adcetris	Brentuximabe vedotina/SGN-30	2014 <sup>1</sup>	2011 <sup>4</sup>	2012 <sup>4</sup>	Anticâncer
Prialt	Ziconotida	Não há registro <sup>1</sup>	2004 <sup>4</sup>	2005 <sup>4</sup>	Analgésico
Vira-A	Vidarabina / ARA-A	Não há registro <sup>1</sup>	2001, descontinua- do <sup>5</sup>	2004 <sup>4</sup>	Antiviral
Carragelose	Iota-carragenina	Não há registro <sup>1</sup>	1973 <sup>2</sup>	Não aprovado <sup>3</sup>	Antiviral
Lovaza / Omacor	Ésteres etílicos do ácido ômega-3	2006, registrado como alimento funcional <sup>1</sup>	2004 <sup>4</sup>	2004 <sup>4</sup>	Antilipêmico

A citarabina (Cytosar-U/Aracytin) foi o primeiro antitumoral a ser aprovado para uso comercial, em 1969, pela FDA, e é ainda utilizado na terapêutica. No Brasil, o medicamento de referência aprovado pela Anvisa é o Aracytin, aprovado em 1999. A citarabina é um agente antineoplásico sintético que possui ação inibitória sobre a síntese do ácido desoxirribonucleico, utilizado na terapia da leucemia mieloide aguda, mas também apresenta propriedades antivirais e imunossupressoras (Gray et al., 1972). O mecanismo de citotoxicidade da citarabina ocorre principalmente através de sua conversão intracelular, por desoxicidina quinase, no trifosfato de citarabina, resultando na inibição da DNA-polimerase, via competição com desoxicidina trifosfato (Grant, 1998).

A trabectedina (Yondelis) é um alcaloide pentacíclico tetra-hidroisoquinolínico isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata*. Levou-se cerca de três décadas, entre a primeira verificação de atividade citotóxica e a viabilidade de obtenção da molécula em escala industrial. A trabectedina (escteinascidina-743) liga-se à guanina em sequências específicas de bases nitrogenadas nas fendas menores da dupla hélice, causando uma dobra na fita de DNA. Esse dobramento ocasiona diversas consequências celulares que são refletidas em desorganização do citoesqueleto, bloqueio da divisão celular e interferência no reconhecimento e ligação normal de fatores de transcrição ou proteínas ligantes ao DNA, inibindo assim sua divisão celular (Aune et al., 2002). A trabectedina foi o primeiro fármaco aprovado para uso clínico no tratamento de sarcoma de tecidos moles, pela EMA em 2007 e mais tarde pela FDA, em 2015. No Brasil, o medicamento foi aprovado pela Anvisa em 2010 e atualmente seu registro está cancelado. Ensaios clínicos para câncer de próstata, mama e sarcomas pediátricos também estão sendo realizados

(Rangel; Falkenberg, 2015).

O mesilato de eribulina (Halaven) é um análogo sintético da halicondrina B, um poliéter macrocíclico isolado originalmente da esponja *Halichondria okadae* em 1986. Sua ação antitumoral se dá pela inibição da polimerização dos microtúbulos através da ligação com tubulina, uma proteína do citoesqueleto necessária para divisão mitótica (Costa-Lotufo et al., 2009; Rangel; Falkenberg, 2015). O medicamento foi aprovado pela FDA em 2010, pela EMA em 2011 e pela Anvisa em 2013, para tratamento de câncer de mama metastático.

O bentuximabe vedotina (Adcetris) é o fármaco de origem marinha mais recentemente aprovado para o tratamento de linfoma de Hodgkin e linfoma anaplásico de grandes células sistêmico. Corresponde a um conjugado anticorpo-fármaco (MMA-MMAE) que combina um anticorpo monoclonal (MMA) anti CD-30, com monometil auristatina E (vedotina)(MMAE), um análogo sintético da dolastatina 10. Desenvolveu-se o conjugado anticorpo-fármaco mais estável e que dirige seletivamente o fármaco até a célula tumoral. Uma vez que o anticorpo atinge o seu alvo molecular, CD30 (uma proteína de membrana presente na superfície das células de linfomas), o conjugado é clivado na célula tumoral, ativando-se assim o mecanismo antimitótico (Okeley et al., 2010). Foram necessários cerca de 40 anos desde a verificação da bioatividade do extrato até a aprovação do medicamento pelo FDA em 2011 e pela EMA em 2012 (Cragg et al., 2014; Martins et al., 2014). No Brasil, o medicamento foi aprovado pela Anvisa em 2014.

A busca por analgésicos eficazes para o tratamento da dor crônica, principalmente para casos em que já não respondem aos opiáceos, levou ao desenvolvimento de formulações baseadas em toxinas marinhas, uma contendo  $\omega$ -conotoxina MVIIA (ziconotida) e outra contendo tetrodotoxina, ainda em ensaios clínicos.

A ziconotida (Prialt) ou  $\omega$ -conotoxina MVIIA é um peptídeo analgésico de 25 aminoácidos isolado do molusco *Conus magnus* na década de 1980. Utilizadas para paralisar suas presas por bloqueio neuromuscular, as toxinas de *Conus* se ligam a canais iônicos dependentes de voltagem ou ativados por ligantes externos. A  $\omega$ -conotoxina apresenta alta seletividade no bloqueio de canal de cálcio do tipo N das fibras nociceptivas tipo A- $\delta$  e tipo C nas lâminas I e II da raiz dorsal da medula espinal de mamíferos, resultando em um extraordinário potencial antinociceptivo em concentrações picomolares (a ziconotida é 1.000 vezes mais potente que a morfina). Além disso, o tratamento com ziconotida não induz a tolerância após uso crônico (Costa-Lotufo et al., 2009). O Prialt foi aprovado pela FDA e pela EMA em 2004 e 2005, respectivamente, para tratamento de dor crônica associada ao câncer, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e neuropatias.

Muitos produtos naturais de origem marinha têm sido investigados contra diversos tipos de vírus, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV), herpes simples, hepatite, influenza, entre outros. Esses compostos pertencem a distintas classes químicas (alcaloides, terpenos, polissacarídeos, peptídeos) e são encontrados em organismos variados, como esponjas, algas e ascídias (Gogineni et al., 2015).

A vidarabina (Ara-A) é um análogo sintético de espongouridina, atualmente obtido por meio de fermentação com culturas da bactéria *Streptomyces antibioticus*. Trata-se de um antiviral inibindo a replicação viral que apresenta atividade contra herpes vírus, poxvírus e certos rhabdovírus, hepadnavírus e certos retrovírus relacionados a tumores. O fármaco foi aprovado

como anti-herpético, porém, devido a sua toxicidade e baixa biodisponibilidade em relação a outros fármacos, foi descontinuado nos Estados Unidos em 2001, mas continua em uso na Europa, em forma de preparações oftálmicas para tratamento de infecções pelo vírus herpes simples (Simões et al., 2017).

Carragelose é um produto de origem marinha inibidor de infecções pelo rinovírus. Trata-se de um polissacarídeo sulfatado, iota-carragenina, extraído de algas vermelhas, efetivo contra sintomas iniciais de resfriado, devido à inibição da infecção viral (Leibbrandt et al., 2010). Elaborado na forma de *spray* nasal, cria uma barreira física antiviral na cavidade nasal (Koenighofer et al., 2014).

Os ácidos graxos ômega-3 de origem marinha são agentes que reduzem triglicerídeos de maneira segura e eficaz e são terapêuticos em combinação com dieta e/ou estatinas (Glueck et al., 2012). O medicamento Lovaza/Omacor, composto por uma mistura de ésteres etílicos do ácido ômega-3, especificamente dos ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA) e docosa-hexaenoico (DHA), é um exemplo de antilipêmico aprovado pela FDA e pela EMA em 2004 para tratamento de hiperlipidemia. Foi aprovado na Anvisa como alimento funcional em 2006.

### 3 | COMPETÊNCIAS E INTERESSES PARA A SAÚDE

A biotecnologia marinha tem muito a contribuir para a saúde humana no desenvolvimento e produção de fármacos, mas ainda são poucos os produtos disponíveis no mercado. É necessário expandir as pesquisas nessa área, com foco nas ações, serviços, produtos e substâncias de interesse para a saúde.

Para saber quais as demandas por ações e serviços de saúde no Brasil, é necessário primeiramente conhecer os objetivos do Sistema Único de Saúde (SUS) e o seu campo de atuação. Dentre os objetivos, de acordo com a Lei Orgânica da Saúde, Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990, estão a formulação de política de saúde destinada a promover, nos campos econômico e social, a observância do dever do Estado de garantir a saúde, com vistas à redução de riscos de doenças e de outros agravos e ao estabelecimento de condições que assegurem acesso universal e igualitário às ações e aos serviços; e a assistência às pessoas por meio de ações de promoção, proteção e recuperação da saúde, com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas. E estão incluídas no campo de atuação do SUS, dentre outras questões (art. 6º da Lei 8.080/90):

- A participação na formulação da política e na execução de ações de **saneamento básico**;
- A ordenação da **formação de recursos humanos na área de saúde**;
- A colaboração na **proteção do meio ambiente**;
- A formulação da **política de medicamentos, equipamentos, imunobiológicos e outros insu-**

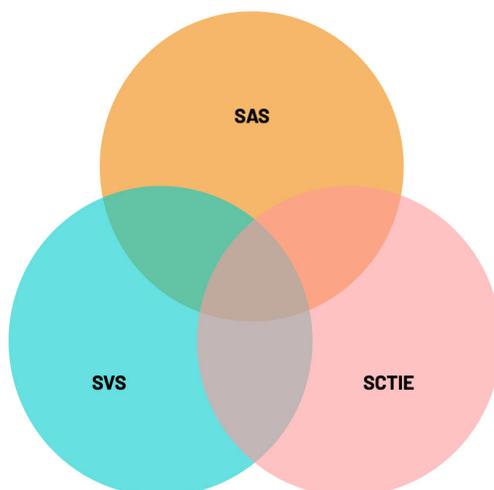
mos de interesse para a saúde e a participação na sua produção;

- O controle e a fiscalização de serviços, **produtos e substâncias de interesse para a saúde**;
- A participação no controle e na fiscalização da **produção**, transporte, guarda e **utilização de substâncias e produtos psicoativos, tóxicos e radioativos**;
- **O incremento**, em sua área de atuação, **do desenvolvimento científico e tecnológico**.

Essas questões envolvem um amplo escopo de atividades, que inclusive dialoga com a formação de recursos humanos, desenvolvimento científico e, entre outros, produção de insumos, política de medicamentos e de outros produtos, como vacinas e saneantes, podendo estar relacionados também à biotecnologia marinha, que, no caso, podem compreender ações de pelo menos três das sete secretarias do Ministério da Saúde: Secretaria de Atenção à Saúde (SAS), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE).

### 3.1 COMPETÊNCIAS FINALÍSTICAS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE

A representação do Ministério da Saúde na CIRM e especialmente no Comitê Biomar envolve a necessidade de articulação com diversas atividades transversais de competência de mais de uma secretaria do MS, conforme demonstrado por esta seleção de competências:

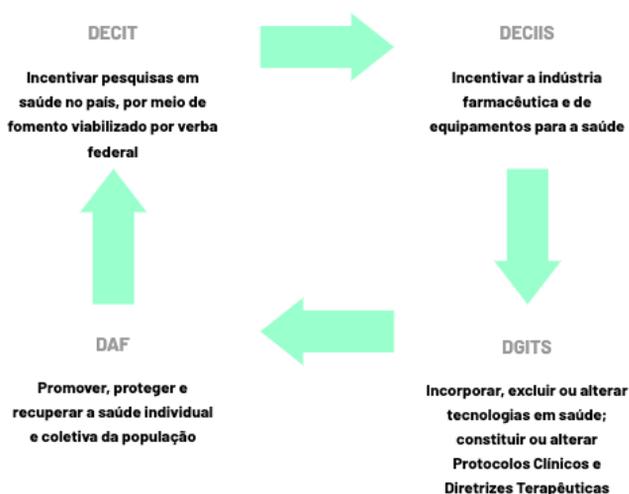


Dentre as atividades da Secretaria de Atenção à Saúde de formular e implementar a política de atenção à saúde, estão as ações relacionadas ao câncer, cardiologia, traumatologia e ortopedia, coordenando as atividades do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Instituto Nacional de Cardiologia, e Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

Jamil Haddad, unidades assistenciais do Ministério da Saúde. As Ações Programáticas Estratégicas estão relacionadas às políticas de saúde para populações estratégicas ou vulneráveis; política nacional de saúde mental, álcool e outras drogas, no âmbito do SUS, de forma a proceder à análise técnica de projetos apresentados por instituições que tenham por objeto ações e atividades voltadas para a organização das ações e das políticas; produzir, processar e difundir conhecimentos; fomentar pesquisas, e promover cooperação técnica com instituições de pesquisa e ensino para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras de gestão e atenção à saúde das ações programáticas estratégicas.

As funções da Secretaria de Vigilância em Saúde incluem a coordenação de programas de prevenção e controle de doenças transmissíveis de relevância nacional, como aids, dengue, malária, hepatites virais, doenças imunopreveníveis, leishmaniose, hanseníase e tuberculose, e do Programa Nacional de Imunizações (PNI).

A Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos visa ao desenvolvimento da capacidade científica, tecnológica e produtiva nacional. Para tanto, formula e implementa políticas nacionais de ciência, tecnologia e inovação em saúde, assistência farmacêutica e fomento à pesquisa e desenvolvimento; desenvolve métodos e mecanismos para a análise da viabilidade econômico-sanitária de empreendimentos públicos no Complexo Industrial da Saúde; promove a implementação de parcerias público-privadas para o desenvolvimento tecnológico e a produção de produtos estratégicos para o país, e também coordena o processo de incorporação e desincorporação de tecnologias em saúde no âmbito do SUS (BRASIL, 2013). Essas atribuições são organizadas em quatro departamentos, que se completam na cronologia do desenvolvimento produtivo:



**Figura 2.** Ilustração feita com base nas competências publicadas no Decreto n.º 8.901/2016.

O desenvolvimento produtivo no âmbito da Saúde deve levar em consideração as demandas de saúde da população identificadas pelas Secretarias de Atenção à Saúde e de Vigilância em Saúde, bem como sinalizadas pela sociedade de maneira geral. Essas demandas devem subsidiar os incentivos às pesquisas em saúde no país, e descobertas promissoras podem ser

objeto para impulsionar a indústria farmacêutica e de equipamentos para a saúde. Essas tecnologias poderão ser incorporadas ao SUS, passando a constituir ou alterar os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para promoção, proteção e recuperação da saúde individual e coletiva da população. O ciclo se retroalimenta, com as novas informações dos departamentos de assistência, como o DAF e os da SAS e SVS, para fornecer medicamentos e insumos e implementar as políticas de saúde de forma mais eficiente e eficaz. Esse é um processo dinâmico, em que tecnologias que se tenham tornado obsoletas poderão ser excluídas do Sistema Único de Saúde após avaliação da Comissão Nacional de Tecnologias de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec).

Para melhor compreensão, segue seleção das competências dos departamentos da Sctie – Departamento de Ciência e Tecnologia (Decit), Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde (Deciis), Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde (Dgits) e Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF):

**Tabela 2.** Competências dos Departamentos da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos.

SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS			
DECIT	DECIIS	DGITS	DAF
<p>II - coordenar e executar as ações do MS no campo de <b>pesquisa e desenvolvimento</b> em saúde, e articular intersecretorialmente no âmbito do <b>Sistema Nacional de Ciência e Tecnologia</b>;</p> <p>IV - coordenar o processo de gestão do conhecimento em Ciência e Tecnologia em Saúde, visando à utilização do <b>conhecimento científico e tecnológico</b>;</p> <p>V - promover, em <b>articulação com instituições de ciência e tecnologia e agências de fomento</b>, a realização de <b>pesquisas</b> estratégicas em saúde;</p> <p>VII - acompanhar as atividades da Secretaria-Executiva da <b>Comissão Nacional de Ética em Pesquisa</b>.</p>	<p>III - coordenar a organização e o desenvolvimento de programas, projetos e ações que visem <b>induzir o desenvolvimento, a difusão e a incorporação de novas tecnologias</b> no SUS;</p> <p>VII - elaborar, divulgar e <b>fomentar</b> a observância de diretrizes de <b>desenvolvimento tecnológico, transferência de tecnologias, produção e inovação</b> relacionadas ao <b>Complexo Industrial da Saúde</b>;</p> <p>XI - promover, em <b>articulação com instituições de ciência e tecnologia, bancos e agências de fomento</b>, a realização de projetos estratégicos;</p> <p>XVI - formular, avaliar, elaborar normas e participar da execução da Política Nacional de Saúde e da produção de medicamentos, insumos estratégicos e equipamentos.</p>	<p>I - subsidiar a Secretaria na formulação de políticas, diretrizes e metas para a <b>incorporação, a alteração ou a exclusão</b> pelo SUS de tecnologias em saúde;</p> <p>IV - <b>apoiar a estruturação e a qualificação de instituições de ensino, pesquisa e assistência</b>, com vistas a subsidiar a incorporação de tecnologias;</p> <p>V - <b>fomentar</b> a realização de <b>estudos e pesquisas</b>, por meio de acordos de cooperação com entidades governamentais e não governamentais;</p> <p>VIII - definir critérios para a <b>incorporação tecnológica</b> com base em evidências de eficácia, segurança e custo-efetividade;</p> <p>XVIII - participar da atualização da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename).</p>	<p>II - formular, implementar e coordenar a gestão das Políticas Nacionais de Assistência <b>Farmacêutica</b> e de <b>Medicamentos</b>, incluindo <b>sangue, hemoderivados, vacinas e imunobiológicos</b> como partes integrantes da Política Nacional de Saúde;</p> <p>VI - programar a <b>aquisição e a distribuição</b> de insumos estratégicos para a saúde;</p> <p>VII - <b>propor acordos e convênios</b> com os Estados, os Municípios e o Distrito Federal para a execução descentralizada de programas e projetos especiais do SUS;</p> <p>IX - elaborar e acompanhar a execução de <b>programas e projetos</b> relacionados à <b>produção, à aquisição, à distribuição, à dispensação e ao uso</b> de medicamentos no âmbito do SUS.</p>

Assim, cabe ao Deciis articular as necessidades de saúde da população, as iniciativas da comunidade científica e os interesses do Complexo Industrial da Saúde (CIS), envolvendo o

setor público e o privado, para inovação e desenvolvimento, através de novos testes diagnósticos e novos fármacos, também a partir de organismos marinhos.

### 3.2 PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO NA SAÚDE

O Ministério da Saúde, de acordo com as suas diversas ações, realiza fomento à pesquisa, ao desenvolvimento tecnológico e à inovação, por meio de diversos programas, seja por chamadas públicas, através de editais, ou por contratação direta, realizando convênios, termos de execução descentralizada (TED) ou termos de cooperação (TC), com repasse de recursos pelo Fundo Nacional de Saúde (FNS) por transferência direta para as universidades ou fundações.

A SVS, por exemplo, realizou chamada para seleção de projetos de instituições privadas sem fins lucrativos (Edital nº 1, de 14 de fevereiro de 2014), para contribuir com a vigilância, prevenção e controle das DST, HIV/aids, hepatites virais, tuberculose, hanseníase, malária e dengue. Um dos eixos temáticos para as propostas envolviam ações com ênfase na prevenção e promoção de saúde, ressaltando atividades para a ampliação do diagnóstico das doenças. Anualmente, também realiza a Mostra Nacional de Experiências Bem-Sucedidas em Epidemiologia, Prevenção e Controle de Doenças (Expoeipi), com o propósito de promover o debate de temas importantes para a consolidação do SUS e de premiar os profissionais e os serviços de saúde do país que se destacaram no desenvolvimento de ações de vigilância em saúde relevantes para a Saúde Pública, sendo a última realizada em julho (15ª Expoeipi – Edital nº 01, de 23 de maio de 2016, alterado em 06 de abril de 2017) com apresentação de trabalhos técnico-científicos e experiências, por meio de comunicação oral ou em pôsteres, sobre vigilância, prevenção e controle das IST/HIV/aids, hepatites virais, doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*, doenças transmissíveis relacionadas à pobreza (tuberculose) e doenças imunopreveníveis (vacinas). Os prêmios foram: RESS Evidência – Melhor artigo publicado na *Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde* – a revista do SUS; e Prêmio Adolfo Lutz e Vital Brazil – Melhor investigação de surto conduzida pela esfera federal do SUS.

No âmbito da Secretaria de Atenção à Saúde, foram instituídos, por exemplo, pela Lei nº 12.715/2012 o Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (Pronon) e o Programa Nacional de Apoio à Atenção da Saúde da Pessoa com Deficiência (Pronas/PCD), que são dois programas implantados pelo MS para incentivar ações e serviços desenvolvidos por entidades, associações e fundações privadas sem fins lucrativos no campo da oncologia e da pessoa com deficiência. Pessoas físicas e jurídicas que contribuírem com doações para projetos nessas duas áreas poderão se beneficiar de deduções fiscais no Imposto de Renda.

A Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos realiza fomento por meio de seus departamentos, em consonância com as competências de cada um. Por meio do Decit, tem fomentado **pesquisas** na área da saúde, utilizando três modalidades de fomento:

- **Fomento nacional** – por meio de editais lançados nacionalmente, envolvendo a concorrência livre de projetos de pesquisa de todas as instituições do país;

- **Fomento descentralizado** – Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS) – por editais multitemáticos lançados por unidades da federação (UF), envolvendo a concorrência somente entre instituições de pesquisa da própria UF; e
- **Contratação direta** – em situações com características de urgência ou especificidade, podem ser encomendados projetos diretamente a instituições de reconhecida competência.

O Decit não é uma agência de fomento e, por isso, para lançamento dos editais geralmente utiliza o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ou a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). As pesquisas fomentadas pelo Decit constam do Pesquisa Saúde, base de dados gerencial, que disponibiliza mais de cinco mil pesquisas científicas, para subsidiar o trabalho de pesquisadores, profissionais e gestores da saúde. O sistema possibilita a busca de projetos financiados em áreas temáticas prioritárias do MS em consonância com a Agenda Nacional de Pesquisas Prioritárias em Saúde (ANPPS) e Pesquisas Estratégicas para o Sistema de Saúde (PESS). Os indicadores de busca reúnem informações quantitativas de número de projetos, recursos investidos por período, por região do país, entre outros, e apresenta os resultados por meio de tabelas, gráficos e planilha. Além disso, reúne notícias dos projetos a partir do banco de dados do sistema.

Recentemente, o Decit lançou, em julho de 2017, o Plano Nacional de Ação de Fortalecimento da Pesquisa Clínica no Brasil, que tem o objetivo de fortalecer e incentivar a realização de estudos potenciais para a geração de tecnologias estratégicas, considerando o diagnóstico de que:

A pesquisa clínica desenvolvida no Brasil ainda é pouco competitiva no âmbito internacional, devido aos obstáculos que patrocinadores e pesquisadores da área enfrentam relacionados às regulações éticas e sanitárias, à falta de infraestrutura e qualificação dos centros de pesquisa e dos recursos humanos, à descontinuidade das ações de financiamento e do pouco conhecimento dos profissionais de saúde e da população em geral a respeito dos ensaios clínicos realizados no país (Brasil, 2017a).

As atividades foram divididas em seis eixos estratégicos: regulação ética, regulação sanitária, fomento científico e tecnológico, formação em pesquisa clínica, Rede Nacional de Pesquisa Clínica e gestão do conhecimento, sendo que para cada eixo foram relacionados, além dos recursos envolvidos, os objetivos, metas, prazos, ações, indicadores, forças, fraquezas, ameaças e oportunidades.

Já o Decis realiza fomento à **produção nacional de insumos estratégicos** para a Saúde e criou as Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDPs) e o Programa para o Desenvolvimento do Complexo Industrial da Saúde (Procis), com o objetivo de fortalecer os produtores públicos e ampliar seu papel de regulação de mercado, estimular a produção local de produtos de alto custo ou de grande impacto sanitário e social e o desenvolvimento de tecnologias estratégicas, como também a ampliação do acesso da população aos medicamentos e insumos para a saúde.

As **Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo** são firmadas entre o Ministério da Saprodutores públicos e empresas privadas e de acordo com a Portaria nº 2.531, de 12 de novembro de 2014, que redefine as diretrizes e os critérios para a lista de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS) e o estabelecimento das PDPs, disciplina os respectivos processos de submissão, instrução, decisão, **transferência e absorção de tecnologia e aquisição de produtos estratégicos** para o SUS. Dentre seus objetivos específicos, estão: reduzir a dependência produtiva e tecnológica para atender as necessidades de saúde da população brasileira a curto, médio e longo prazos; racionalizar o poder de compra do Estado, mediante a centralização seletiva dos gastos na área da saúde; buscar economicidade e vantagem, considerando preços, qualidade, tecnologia e benefícios sociais; fomentar o desenvolvimento tecnológico e o intercâmbio de conhecimento para a inovação no âmbito das instituições públicas e das entidades privadas, contribuindo para torná-las competitivas e capacitadas; promover o desenvolvimento e a fabricação em território nacional de produtos estratégicos para o SUS; buscar a sustentabilidade tecnológica e econômica do SUS, com promoção de condições estruturais para aumentar a capacidade produtiva e de inovação do País, contribuir para redução do déficit comercial e garantir o acesso à saúde; e estimular o desenvolvimento da rede de produção pública no País e do seu papel estratégico para o SUS.

A lista de produtos estratégicos para o SUS é definida anualmente, composta por produtos divididos nos seguintes grupos: fármacos – insumo farmacêutico ativo (IFA); medicamentos; adjuvantes; hemoderivados e hemocomponentes; vacinas; soros; **produtos biológicos ou biotecnológicos de origem humana, animal ou recombinante**; produtos para a saúde, tais como equipamentos e materiais de uso em saúde; produtos para diagnóstico de uso *in vitro*; e *software* embarcado no dispositivo médico ou utilizado na transmissão de dados em saúde, na recuperação, reconstrução e processamento de sinais e imagens ou na comunicação entre dispositivos.

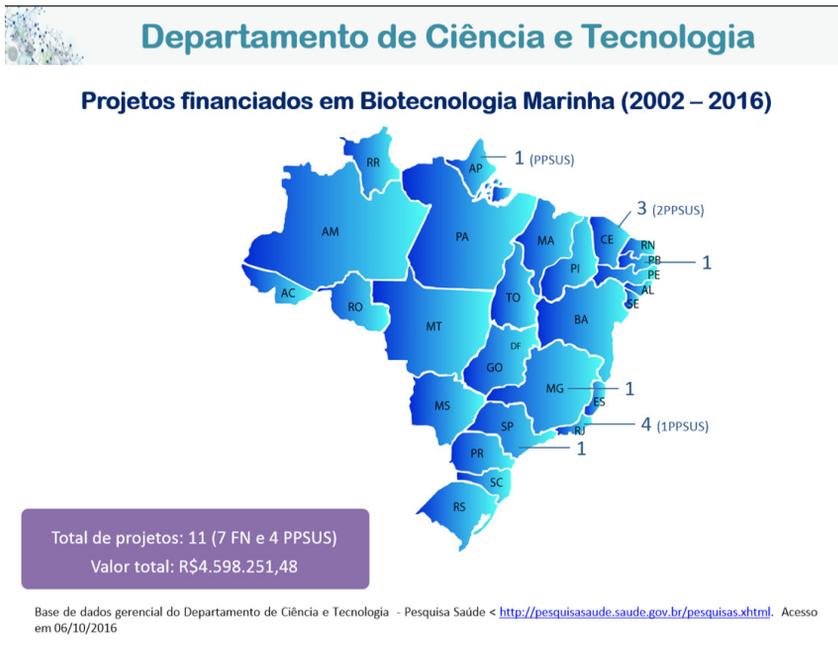
O **Programa para o Desenvolvimento do Complexo Industrial da Saúde**, instituído pela Portaria nº 506, de 21 de março de 2012, considerou o Complexo Industrial da Saúde como uma área estratégica da Política Industrial do País para o fortalecimento da indústria nacional com o aumento de capacidade produtiva, inovadora e a competitividade internacional, com a consequente ampliação do mercado interno e externo dos insumos da saúde; assim, o Procis, além do objetivo de fortalecer os produtores públicos, também objetiva apoiar a infraestrutura de produção e inovação em saúde do setor público, envolvendo a modernização e estruturação produtiva e gerencial; qualificação da produção e Certificado de Boas Práticas de Fabricação (CBPF) emitido pela Anvisa; qualificação da gestão com vistas a promover maior eficiência e efetividade; desenvolvimento tecnológico e transferência de tecnologias; bem como fortalecer as parcerias para o desenvolvimento produtivo visando desenvolver e absorver os produtos estratégicos; e manter o aproveitamento das complementaridades entre os laboratórios e respeitar suas vocações e o perfil produtivo.

Esses instrumentos, bem como outros disponibilizados pelo Ministério da Saúde, são utilizados por laboratórios públicos, universidades e institutos de pesquisa para fomentar suas ações, inclusive na área de Biotecnologia Marinha.

## 4 | AÇÕES DO MINISTÉRIO DA SAÚDE COM A BIOTECNOLOGIA MARINHA

### 4.1 PESQUISAS FOMENTADAS PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

De acordo com o Banco de Dados Pesquisa Saúde do Departamento de Ciência e Tecnologia, foram realizadas onze pesquisas com algas e outros organismos marinhos, distribuídas em seis estados brasileiros:



**Figura 3.** Apresentação no I Encontro de Biotecnologia Marinha em Saúde, realizado pelo Decis /SCTIE/MS, em 13/04/2017.

Essas onze pesquisas foram financiadas pelo Decit em 2002 (uma), 2004 (uma), 2005 (uma), 2006 (cinco), 2012 (duas) e 2013 (uma), com os seguintes títulos de projetos com potencial anticâncer, antiviral, antineoplásico, antimetastático, antimicrobiano, contra leishmanioses e como bioindicador da qualidade da água para consumo humano, como por exemplo na tabela na página a seguir.

### 4.2 O MINISTÉRIO DA SAÚDE NO COMITÊ EXECUTIVO DE BIOTECNOLOGIA MARINHA

O Ministério da Saúde foi convidado a participar das reuniões da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar em 2006 e passou a integrar o seu colegiado em 23 de agosto de 2007, na 165ª Sessão Ordinária, mediante aprovação do plenário e com base no parecer favorável da Subcomissão para o Plano Setorial para os Recursos do Mar (PSRM), por considerar de grande importância as suas interfaces com vários programas desenvolvidos, como o Biomar,

Aquipesca e o Revimar. A participação do MS foi confirmada no Decreto nº 6.484/2008 e mantida no Decreto nº 6.979/2009.

**Tabela 3.** Projetos de pesquisa financiados pela Saúde em Biotecnologia Marinha.

PROJETOS FINANCIADOS EM BIOTECNOLOGIA MARINHA (2002 a 2016)				
ANO	TÍTULO	INSTITUIÇÃO	COORDENADOR	MODALIDADE DE FOMENTO
2002	Bioprospecção de drogas com potencial anticâncer em ascídias (Chordata) e esponjas (Porifera) do litoral cearense	UFCE	Leticia Veras Costa Lotufo	PPSUS
2004	Obtenção de novos compostos naturais ou sintéticos com potencial atividade antiviral e anticâncer: síntese e isolamento de produtos naturais marinhos; estudos de suas atividades anticâncer e antiviral (HIV-1, HSV-1, vírus Cantagalo, Mayaro e Febre Amarela); dos seus mecanismos de ação e utilização de modelagem molecular na avaliação de requisitos estruturais para o desenvolvimento de novos compostos	UFF	Vitor Francisco Ferreira	PPSUS
2005	Estudo do efeito antineoplásico e antimetastático de glicosaminoglicanos de invertebrados marinhos: novas conexões mecanísticas com implicações terapêuticas	UFRJ	Mauro Sérgio Gonçalves Pavão	Fomento nacional
2006	Algas marinhas da costa brasileira: isolamento e caracterização de micosporinas e de substâncias com atividade antiinflamatória, antioxidante e antibacteriana	USP	Pio Colepicolo Neto	Fomento nacional
2006	Estudo da alga <i>Lithothamnium calcareum</i> no desenvolvimento de novos fármacos	UFMG	Mauro Martins Teixeira	Fomento nacional
2006	Novos fármacos a partir de algas marinhas multicelulares: efeitos em doenças trombóticas e virais	UFRJ	Paulo Antonio de Souza Mourão	Fomento nacional
2006	Rede Interinstitucional de Algas Bentônicas	UFPB	José Maria Barbosa Filho	Fomento nacional
2006	Compostos bioativos de algas marinhas: bases moleculares, implicações terapêutica e industrial	UFCE	Norma Maria Barros Benevides	Fomento nacional
2012	Nanopartículas inorgânicas, prospecção de compostos sintéticos e produtos naturais e associação de fármacos para o desenvolvimento de terapia efetiva contra leishmanioses.	UFRJ	Elvira Maria Saraiva Chequer Bou Habib	Fomento nacional
2012	Compostos bioativos de algas marinhas na costa do Ceará: determinação de atividade contra o vírus da dengue e bactérias patogênicas humanas resistentes a múltiplos antimicrobianos	UFCE	Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira	PPSUS
2013	Utilização de microalgas como bioindicadoras da qualidade da água para consumo humano em área urbana do Baixo Rio Amazonas, no município de Macapá-AP.	UNIFAP	Silvia Maria Mathes Faustino	PPSUS

Fonte: Tabela (com ajustes) apresentada pelo DECIT no I Encontro de Biotecnologia Marinha em Saúde, realizado pelo Decis/SCTIE/MS, em 13/04/2017.

Naquela Sessão Ordinária, o Ministério da Saúde estava representado por técnicos do então Departamento de Economia da Saúde da SCTIE, hoje com novas atribuições, denominado Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde (Deciis), que atualmente está representado pelas tecnologistas Adriana Nascimento Santos Cartaxo (titular) e Nínive Aguiar Colonello (suplente).

O Ministério da Saúde participa desde 2007 da aprovação das propostas do Plano Nacional de Trabalho (PNT) do Biomar e em 2008 participou da ação do Levantamento e Avaliação do Potencial Biotecnológico da Biodiversidade Marinha, subordinado à Subcomissão para o PSRM, em razão de coadunar com as competências da SCTIE, especificamente as relacionadas à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico de processos e produtos inovadores na área da Saúde.

Foi lançado o Edital MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT-Saúde nº 010/2006, destinando R\$ 2,9 milhões para apoiar projetos de pesquisa e inovação. As pesquisas tiveram como objetivo investigar nas algas a presença de substâncias bioativas com potencial antioxidante, antibiótico e anti-inflamatório e com capacidade de absorção da radiação ultravioleta.

O Ministério da Saúde, em 2008, divulgou informações sobre essas ações referentes aos fármacos vindos do mar na publicação e *folder* institucional, dentre as demais ações sobre Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde, contendo o seguinte:

Apesar da enorme biodiversidade marinha brasileira, estudos com algas para fabricação de fármacos e cosméticos ainda são incipientes no país. O edital, lançado em 2006, destinou R\$ 2,9 milhões para apoiar projetos de pesquisa e inovação com esse fim. Quatro estudos estão sendo desenvolvidos pelas universidades federais de Minas Gerais, Paraíba, Rio de Janeiro e pela Universidade de São Paulo. As pesquisas têm como objetivo investigar nas algas a presença de substâncias bioativas com potencial antioxidante, antibiótico e anti-inflamatório e com capacidade de absorção da radiação ultravioleta (Brasil, 2008).

A realização de um Seminário de Avaliação desse Edital MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT-Saúde nº 010/2006 foi deliberada pelo Comitê Executivo do Biomar, em 17/11/2009, para o ano de 2010, tendo o Ministério da Saúde apoiado o seminário e a divulgação dos resultados do estudo.

Em 2010, o MS financiou a publicação conjunta com o MCTIC do livro **Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil**, compreendendo um diagnóstico preliminar sobre o tema no País, com seus pesquisadores, grupos de pesquisa e redes (RedeAlgas e Renorbio); principais centros de pesquisa da área no mundo; campos de atuação; patentes; recursos humanos, e empresas envolvidas.

Em 2013, o Ministério da Saúde participou da realização do *workshop* sobre Biotecnologia Marinha, em Brasília, que incluiu uma palestra sobre o "Potencial anti-HIV de diterpenos de algas pardas marinhas", com a Dra. Valéria L. Teixeira, da Universidade Fluminense (UFF).

### 4.3 RECENTES AÇÕES REALIZADAS PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

O Ministério da Saúde vem envidando esforços para a realização de diversas atividades para incentivo e divulgação das ações de Biotecnologia Marinha. Em 13 de abril de 2017, a SCTIE, por meio do Deciiis, em parceria com o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC), promoveu o Encontro de Biotecnologia Marinha em Saúde, na sede da Organização Pan-Americana da Saúde (Opas), em Brasília.

O objetivo do encontro foi divulgar as pesquisas que vêm sendo realizadas sobre o tema e debater as inovações em Biotecnologia Marinha para a Saúde, com ênfase no aproveitamento sustentável do potencial biotecnológico dos organismos marinhos existentes nos mais de oito mil quilômetros da costa brasileira e seus benefícios antifúngicos, antibacterianos, antimicrobianos, antivirais e anticâncer.

Além de pesquisadores com carreira dedicada ao ambiente marinho, o evento contou com a participação de representantes do Biomar/CIRM; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI); empresa Cristália; Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades (Abifina), e de representantes das Secretarias do Ministério da Saúde: SAS, SVS e SCTIE.

Além de marcar a retomada na direção de uma parceria entre MS e MCTIC, o encontro representou a oportunidade de se conhecer o elenco dos projetos que vêm sendo implementados e de debater sobre as inovações em ciência e tecnologia, desenvolvimento de novos produtos em biotecnologia marinha para a saúde e de articulação entre secretarias do MS, pesquisadores, indústria e demais presentes (Brasil, 2017b).

Durante o encontro foram apresentados os resultados de pesquisas a partir dos recursos do mar, financiadas pelo Decit/SCTIE/MS, pelo CNPq/MCTIC, bem como de pesquisas desenvolvidas por outros especialistas da área:

**Tabela 4.** Pesquisas apresentadas no Encontro de Biotecnologia Marinha em Saúde

APRESENTAÇÃO	ESPECIALISTA	INSTITUIÇÃO
Estudo do efeito antineoplásico e antimetastático de glicosaminoglicanos de invertebrados marinhos: novas conexões mecânicas com implicações terapêuticas	Dr. Mauro Sérgio G. Pavão	UFRJ/RJ
Metabólitos de algas com impacto na Saúde	Dr. Pio Colepicolo Neto	USP/SP
Prospecção alvo-direcionada de substâncias anticâncer em microorganismos marinhos	Dra. Letícia Veras Costa Lotufo	USP/SP
Diagnóstico de patógenos emergentes e pesquisa de antimicrobianos e antivirais de origem marinha	Dr. Fabiano Lopes Thompson	UFRJ/RJ

<b>APRESENTAÇÃO</b>	<b>ESPECIALISTA</b>	<b>INSTITUIÇÃO</b>
Combate a micro-organismos patogênicos: alternativas terapêuticas de origem marinha	Dr. Alexandre José Macedo	UFRGS/RS
Isolamento, identificação e estudos das propriedades químicas e físico-químicas de metabólitos secundários isolados de organismos marinhos	Dr. Roberto G. S. Berlinck	USP/São Carlos
Prospecção de produtos naturais microbianos bioativos: triagem de alto desempenho e metodologias modernas para desreplcação	Dra. Daniela Barretto B. Trivella	LNBio/CN-PEM
Prospecção de enzimas com aplicação na área da saúde produzidas por fungos marinhos do acervo da CRM-UNESP	Dra. Lara Durães Sette	UNESP/Rio Claro
Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias marinhas de profundidade	Dr. André Oliveira S. Lima	UNIVALI/SC.

Fonte: I Encontro de Biotecnologia Marinha em Saúde, realizado pelo Decis/SCTIE/MS, em 13/04/2017.

#### **4.4 PERSPECTIVAS FUTURAS EM BIOTECNOLOGIA MARINHA EM SAÚDE**

Os resultados desse encontro surtirão efeitos a médio e longo prazo para o fortalecimento da Biotecnologia Marinha e do Complexo Industrial da Saúde, assim como a curto prazo com a publicação dos resultados alcançados em âmbito nacional, de criação de um portfólio para fomentar a concretização de novos fármacos, definição de estratégias de inserção desses produtos no mercado, além do inquestionável conhecimento dos desafios e perspectivas para desenvolvimento de novos produtos que atendam às demandas de saúde da população.

Para o futuro, poderão ser desenvolvidas redes de articulação e projetos de pesquisa, desenvolvimento e inovação fomentados pelos diversos atores e programas de apoio tecnológico e estratégico para o Sistema Único de Saúde, de acordo com a demanda de saúde da população e das novas rotas tecnológicas.

Foi iniciado um grupo de trabalho no âmbito do Ministério da Saúde, com representantes das três secretarias, para debater os assuntos em tela, de âmbito institucional, normativo e regulatório, para levantamento e estabelecimento de ações proativas. A expectativa é agregar também outros atores, como Anvisa, universidades, hospitais e a indústria para maior articulação.

## **5 | CONCLUSÃO**

A importância da participação mais efetiva do Ministério da Saúde nas discussões, proposições e atividades conduzidas no âmbito da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar visa resguardar as especificidades da área da saúde e contribuir com o desenvolvimento das atividades, especialmente no âmbito do Biomar, podendo inclusive futuramente articular ações conjuntas com o Programa Antártico Brasileiro (Proantar) e a Formação de Recursos Humanos em Ciências do Mar (PPG-Mar), no intuito de unir esforços e recursos e compartilhar

experiências, evitando retrabalho e avançando em tecnologia, inovação e produção nacional.

Em suma, a biotecnologia marinha tem contribuído e ainda muitas inovações estão sendo suscitadas para melhorar o acesso à prevenção e tratamento aos usuários do Sistema Único de Saúde, com articulação dos diversos atores envolvidos, sejam representantes de diversas áreas do governo, da indústria, das universidades, pesquisadores e demais profissionais de saúde, inclusive alavancando o desenvolvimento tecnológico e econômico do país.

## REFERÊNCIAS

Agrawal, S.; Adholeya, A.; Deshmukh, S.K. (2016) The pharmacological potential of non-ribosomal peptides from marine sponge and tunicates. **Frontiers in Pharmacology**. 7: 333.

Ahmadi, A. et al. (2015) Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: A review. **BioMed Research International**. .

Aune, G. J.; Furuta, T.; Pommier, Y. (2002) Ecteinascidin 743: a novel anticancer drug with a unique mechanism of action. **Anticancer Drugs**. 13(6): 545-555.

Brasil (2017) **Ministério da Saúde. Ciência, tecnologia e inovação em saúde**. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ciencia\\_tecnologia\\_inovacao\\_saude.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ciencia_tecnologia_inovacao_saude.pdf)>. Acesso em: 28 jul. 2017.

Brasil (2017) **Ministério da Saúde. SCTIE - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/sctie>>. Acesso em: 28 jul. 2017.

Brasil(2017a) **Ministério da Saúde. Plano de Ação de Pesquisa Clínica no Brasil**. Disponível em: <[http://www.abifina.org.br/arquivos/download/plano\\_de\\_acao\\_de\\_pesquisa\\_clinica\\_no\\_brasil\\_junho\\_2017.pdf](http://www.abifina.org.br/arquivos/download/plano_de_acao_de_pesquisa_clinica_no_brasil_junho_2017.pdf)>. Acesso em: 28 jul. 2017a.

Brasil (2017b) **Ministério da Saúde. Encontro de Biotecnologia Marinha em Saúde**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/581-sctie-raiz/deciis/28208-ministerio-promove-encontro-de-biotecnologia-marinha-em-saude-parceria-para-o-desenvolvimento-produtivo-pdp>>. Acesso em: 28 jul. 2017, 2017b.

Costa-Lotufo, L.V. et al. (2009) Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**. 32(3): 703-716.

Cragg, G.M.; Grothaus, P.G.; Newman, D.J. (2014) New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**. 77(3): 703-723.

De Oliveira, A.L.L.; De Felício, R.; Deboni, H.M. (2012) Marine natural products: Chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 22(4): 906-920.

Glueck, C.J. et al. (2012) Titrating lovaza from 4 to 8 to 12 grams/day in patients with primary hypertriglyceridemia who had triglyceride levels >500 mg/dl despite conventional triglyceride lowering therapy. **Lipids in health and disease**. 11(1): 143.

Gogineni, V.; Fschinazi, R.F.; Hamann, M.T. (2015) HHS Public Access. **Chemical Reviews**. 115(18): 9655-9706.

Grant, S. (1998) Ara-C: cellular and molecular pharmacology. **Advances in Cancer Research**. 72: 197-233.

Gray, G.D. et al. (1972) Immunosuppressive, antiviral and antitumor activities of cytarabine derivatives. **Biochemical Pharmacology**. 21(4): 465-475.

Koenighofer, M. et al. (2014) Carrageenan nasal spray in virus confirmed common cold: individual patient data analysis of two randomized controlled trials. **Multidisciplinary Respiratory Medicine**. 9(1): 57.

Leibbrandt, A. et al. (2010) Iota-carrageenan is a potent inhibitor of influenza A virus infection. **PLoS ONE**. 5(12): 1-11.

Löwenberg, B.; Downing, J.R.; Burnett, A. (1999) Acute myeloid leukemia. **Medical Progress**. 34(14):1051-1062.

Martins, A. et al. (2014) Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. **Marine Drugs**. 12(2): 1066-1101.

Mayer, A.M.S. et al. (2013) Marine pharmacology in 2009-2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of. **Marine Drugs**. 11(7): 2510-2573.

Okeley, N.M. et al. (2010) Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. **Clinical Cancer Research**. 16(3): 888-897.

Palanisamy, S.K.; Rajendran, N.M.; Marino, A. (2017) Natural products diversity of marine ascidians (Tunicates; Ascidiacea) and successful drugs in clinical development. **Natural Products and Bioprospecting**. 7(1): 1-111.

Pati, P.; Sahu, B.K.; Panigrahy, R.C. (2015) Marine molluscs as a potential drug cabinet: an overview. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**. 44(7): 961-970.

Rangel, M.; Falkenberg, M. (2015) Nanomedicine in action: An overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. **Journal of Coastal Life Medicine**. 3(6): 421-428.

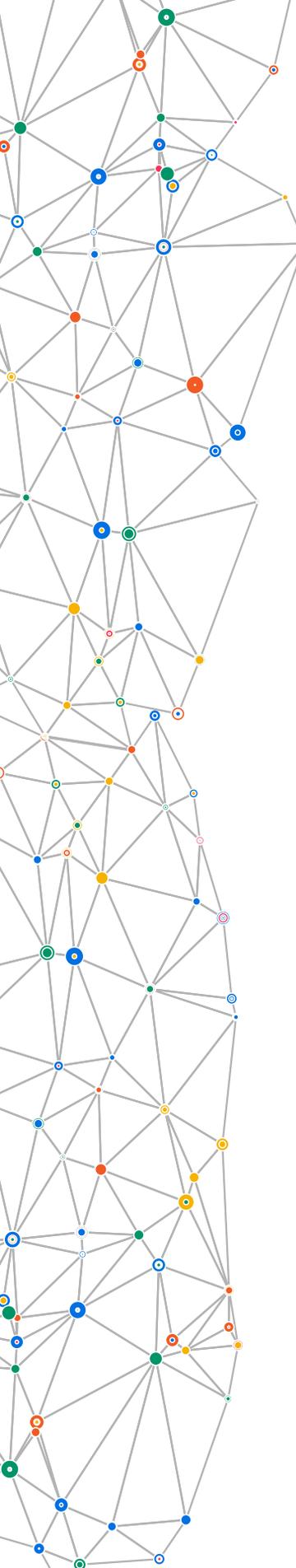
Rocha, J. et al. (2011) Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds - An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. **Marine Drugs**. 9(10): 1860-1886.

Simões, C.M.O. et al. (2017) **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. [s.l.] Artmed.

Taber, L.H. et al. (1977) Herpes simplex encephalitis treated with vidarabine (Adenine Arabinoside). **Archives of Neurology**. 34(10): 608-610.

Thomas, T.R.A.; Kavlekar, D.P.; Lokabharathi, P.A. (2010) Marine drugs from sponge-microbe association - A review. **Marine Drugs**. 8(4): 1417-1468.





# COLEÇÃO MICROBIOLÓGICA: DEFINIÇÃO, CARACTERÍSTICAS, PAPEL BIOTECNOLÓGICO E A CRIAÇÃO DA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DA AMAZÔNIA AZUL

Verônica Viana Vieira<sup>a</sup>  
Ana Carolina Paulo Vicente<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fundação Oswaldo Cruz

## RESUMO

As coleções biológicas têm papel fundamental para o conhecimento e preservação da biodiversidade. Representam também repositórios de recursos naturais que podem ser utilizados como material de referência, para ensaios industriais, identificação de vias metabólicas e recuperação de biomoléculas para várias aplicações. São fonte de material genético para ser explorado tanto no presente quanto no futuro por toda a humanidade.

# 1 | HISTÓRICO

O principal conhecimento da diversidade biológica presente no planeta advém de estudos realizados por taxonomistas ao longo da história considerando distintos acervos de coleções biológicas, principalmente zoológicas e botânicas, existentes em museus e institutos de pesquisa em todo o mundo. Isso porque essas coleções foram criadas a partir de inventários da biodiversidade e/ou depósito de material biológico estudado por pesquisadores. No Brasil, existem acervos históricos relacionados a coleções zoológicas e botânicas como os existentes no Museu Nacional e Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Entomológica da FIOCRUZ, entre outros. As coleções microbiológicas complementam o conhecimento da biodiversidade e a importância destas levou à criação da Federação Mundial das Coleções de Cultura (WFCC), que é baseada em uma comissão multidisciplinar relacionada à União Internacional das Ciências Biológicas (IUBS) e Federação Internacional das Sociedades de Microbiologia (IUMS). O papel da WFCC é promover e dar apoio às coleções de cultura em todo o mundo, e assim existe uma rede mundial com diretrizes gerais no que concerne a coleta, autenticação, preservação e distribuição de micro-organismos e linhagens celulares. No site da WFCC é possível encontrar catalogadas todas as coleções do mundo, inclusive as coleções de cultura brasileiras e as informações relevantes sobre as mesmas (WFCC, 2018).

# 2 | O QUE SÃO COLEÇÕES BIOLÓGICAS

Coleção biológica é um conjunto de organismos, partes destes ou de seu material genético, organizados e preservados de forma adequada e sistematizada de modo a fornecer informações sobre a procedência, coleta e identificação de cada um de seus espécimes. O conjunto das partes que compõem as coleções é definido como acervo (Fiocruz, 2017; Fiocruz, 2018).

As coleções biológicas podem ser classificadas em três grandes categorias: zoológicas, botânicas e microbiológicas. O acervo das coleções microbiológicas é constituído por material vivo, e para a sua manutenção devem ser consideradas questões como: viabilidade e pureza, controle de qualidade, biossegurança, bioproteção, entre outras que nem sempre necessitam ser abordados pelas coleções zoológicas e botânicas (SIBBR, 2018).

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) publicou no Diário Oficial da União (Brasil, 2007) uma série de normativas relativas às coleções biológicas no Brasil. Nesse documento é instituído o Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO), que disciplina o transporte e o intercâmbio de material biológico consignado às coleções, além de classificá-las como:

- **Coleção biológica científica:** coleção de material biológico devidamente tratado, conservado e documentado de acordo com normas e padrões que garantam a segurança, acessibilidade, qualidade, longevidade, integridade e interoperabilidade dos dados da coleção pertencente à instituição científica com objetivo de subsidiar pesquisa científica ou tecnológica e a conservação *ex situ*;
- **Coleção biológica didática:** coleção de material biológico pertencente a instituições científicas, a escolas do ensino fundamental e médio, unidades de conservação, sociedades, associações ou organizações da sociedade civil de interesse público, destinadas a exposição, demonstração, treinamento ou educação;
- **Coleção biológica:** coleção de material biológico testemunho constituída com o objetivo de gerar e subsidiar pesquisa científica ou tecnológica, bem como promover a cultura, a educação e a conservação do meio ambiente. Excetuam-se as coleções vivas abrigadas por jardins zoológicos, criadouros, aquários, oceanários, biotérios, centros de triagem, reabilitação ou recuperação de animais, assim como os viveiros de plantas;
- **Coleção biológica particular:** coleção de material biológico representativo da diversidade biológica, devidamente tratado, conservado e documentado, mantida por pessoa física ou jurídica de direito privado, exceto por instituições científicas, que vise à conservação *ex situ* ou fornecer subsídios à pesquisa científica ou atividades didáticas;
- **Coleção de segurança nacional:** coleção que envolva acervos múltiplos, vivos, pertencentes a instituições públicas, com representatividade do conjunto gênico de diferentes espécies de importância estratégica, que promovam a autossuficiência e a segurança interna da nação, considerando fatores econômicos, sociais, populacionais, ambientais e tecnológicos;
- **Coleção de serviço:** coleção de material biológico certificado devidamente tratado e conservado de acordo com normas e padrões que garantam a autenticidade, pureza e viabilidade, bem como a segurança e o rastreamento do material e das informações associadas.

### 3 | O QUE FAZEM AS COLEÇÕES BIOLÓGICAS / ATIVIDADES DAS COLEÇÕES BIOLÓGICAS

As coleções possuem infraestrutura para preservação, manutenção, armazenamento, caracterização e identificação taxonômica, e distribuição de materiais biológicos, e podem atuar também na formação de recursos humanos e consultorias técnico-científicas, no fornecimento de informações específicas dos materiais biológicos armazenados (Fiocruz, 2017).

Uma das atividades das coleções biológicas é o depósito de material biológico. O acervo das coleções pode apresentar material biológico depositado por pesquisadores. A situação

desse material na coleção é definida de acordo com o tipo de depósito que foi realizado. As coleções podem realizar os seguintes tipos de depósito:

- **Depósito aberto (acervo de acesso público):** as linhagens depositadas e suas informações associadas podem ser fornecidas a pesquisadores, instituições nacionais e estrangeiras e indústrias. A distribuição das linhagens bacterianas não requer autorização prévia do depositante.
- **Depósito restrito (fornecido com autorização do depositante):** as linhagens bacterianas para fins de depósito restrito podem ser fornecidas para pesquisadores, instituições nacionais e estrangeiras e indústria, mediante autorização do depositante. Para essa modalidade é estipulado um prazo definido que, após finalizado, as linhagens devem ser transferidas para a categoria de depósito aberto ou devolvidas ao depositante conforme acordo prévio.
- **Depósito fechado (depósito confidencial):** as linhagens depositadas e suas informações associadas são armazenadas sob confidencialidade e mantidas independentes do acervo da coleção pública, e sua distribuição é proibida.

Segundo as normas para descrição de espécies bacterianas novas, há obrigatoriedade de depósito aberto da cepa tipo em duas coleções de cultura associadas à WFCC, situadas em países diferentes. Essa regra foi estabelecida a partir de agosto de 2002, para garantir a disponibilidade da cepa tipo, considerada padrão nas pesquisas taxonômicas e de biodiversidade (Parte, 2018).

Na ocasião da realização de um depósito de material biológico, toda informação relativa ao mesmo (metadados) é cadastrada na coleção biológica em questão. O mesmo deve ocorrer para o material que é depositado após coleta de material que será integrado à coleção biológica. O conjunto mínimo de dados associados aos materiais biológicos que devem ser armazenados nas coleções biológicas foram estabelecidos pelas Diretrizes de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos (CRBs) da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2001).

As coleções biológicas realizam também a caracterização, identificação e autenticação de material biológico. A caracterização pode ser definida como um conjunto de características do fenótipo ou genótipo que podem levar a uma identificação ou autenticação. A identificação é a determinação da identidade de um organismo comparando com um esquema de identificação já estabelecido. Para identificação microbiológica deve ser realizada uma caracterização polifásica, isto é, o material biológico deve ser submetido a procedimentos fenotípicos e genéticos (Chun & Rainey, 2014). A autenticação é a confirmação da identidade de um organismo que já foi identificado. Todo organismo depositado em uma coleção biológica deve ter sua identificação confirmada (Stackebrandt, 2010). A natureza da coleção determina as abordagens metodológicas a serem aplicadas nas atividades realizadas na coleção biológica, seja para coleta, caracterização, identificação e preservação dos organismos e/ou suas partes.

## 4 | METODOLOGIAS DE PRESERVAÇÃO DE COLEÇÕES MICROBIOLÓGICAS

Nas coleções de culturas, as linhagens de micro-organismos devem ser preservadas de modo a viabilizar a sua utilização posterior a curto, médio e principalmente a longo prazo. Para tanto, métodos de manutenção são necessários para assegurar a viabilidade e manter a estabilidade genética do micro-organismo pelo maior tempo possível, evitando assim a formação excessiva de mutações que alterem suas características. Para a escolha do método de manutenção, devem ser considerados vários fatores, como: particularidades do gênero microbiano, tempo de viabilidade das linhagens, frequência de mutações, as características do próprio método a ser aplicado, os custos de manutenção da técnica e dos equipamentos, e principalmente a capacidade laboratorial e disponibilidade de equipamentos.

Os métodos de conservação a longo prazo tais como a criopreservação e a liofilização são os mais indicados para as coleções microbiológicas (Costa et al., 2009; Morgan et al., 2006). A criopreservação em *freezers* a  $-80^{\circ}\text{C}$ , em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , tem como objetivo a redução de injúrias às células bacterianas durante o processo de congelamento e estocagem a frio (Costa et al., 2009). Considerando as altas taxas de sobrevivência de micro-organismos que a criopreservação proporciona, estudos buscam aprimorar a técnica quanto a sua utilização. Entretanto, faz-se necessário frisar que os protocolos de criopreservação necessitam de adequação metodológica acessível e aplicável para a diversidade de micro-organismos existentes (Prakash et al., 2013).

O processo de liofilização consiste no congelamento e desidratação das células microbianas, em atmosfera de vácuo. A liofilização é considerada uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de bactérias e fungos, por garantir a viabilidade das células por mais de 20 anos e ser aplicável para a maioria deles. Diversos protocolos de estocagem têm sido desenvolvidos e aplicados utilizando os métodos de criopreservação e liofilização, porém a maioria não tem se mostrado plenamente eficaz, tendo em vista as peculiaridades de cada agente a ser conservado, por isso vem se justificando a conjunção de dois ou mais protocolos a fim de garantir a melhor recuperação dos micro-organismos (Smith & Ryan, 2012; Prakash et al., 2013). Desse modo, pelo menos dois métodos de preservação são recomendados para a preservação das linhagens mantidas nas coleções microbiológicas (OCDE, 2007).

## 5 | TAXONOMIA

A classificação biológica das espécies foi proposta por Lineu, em 1735, para descrever e agrupar os seres vivos segundo semelhanças anatômicas. Ao longo do tempo os parâmetros para a classificação dos organismos vêm evoluindo e atualmente baseiam-se na combinação de caracteres morfológicos, fisiológicos, ecológicos e genéticos. De qualquer maneira, o sistema

de classificação ordena os organismos nas categorias taxonômicas: reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie, atribuindo ao final um nome de acordo com a nomenclatura binária em que a primeira palavra designa o gênero e a segunda a espécie.

As limitações do sistema de identificação baseado na morfologia são agora evidentes, além disso há carência mundial de taxonomistas especializados nos diferentes grupos de organismos frente a diversidade a ser ainda explorada no planeta. Por isso, é necessária uma nova abordagem para a identificação de táxons de maneira mais eficiente e com informação que possa ser facilmente veiculada entre as comunidades. A essa realidade agregou-se o avanço tecnológico e a bioinformática, que tem permitido o sequenciamento e análise de genomas, em particular dos micro-organismos, de forma rápida, robusta e a baixo custo. Com a informação genética está sendo possível estabelecer marcadores, a partir de análises globais com as sequências dos genomas, para serem aplicados na taxonomia genômica. A partir de sequências genômicas de organismos preservados em coleções, é possível também realizar prospecções *in silico* e identificar vias metabólicas e biomoléculas para fins farmacológicos e de biorremediação. Essas inferências podem depois ser testadas *in vitro* e exploradas pela biotecnologia (Thompson et al., 2009; Thompson et al., 2014).

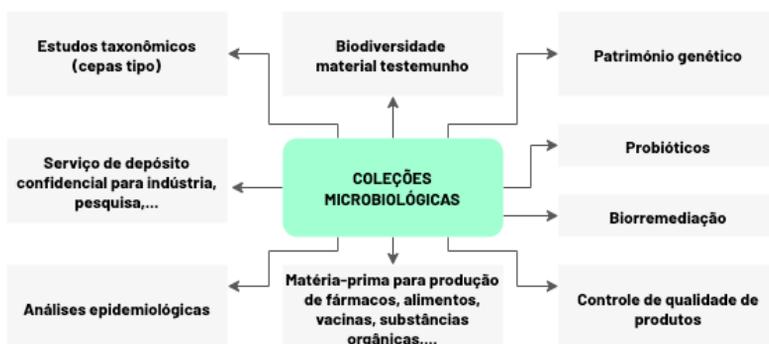
## 6 | ÁREAS DE APLICAÇÃO DAS COLEÇÕES BIOLÓGICAS

As coleções biológicas são fontes de recursos genéticos, ecológicos e históricos que apresentam grande aplicabilidade. Os acervos das coleções são material testemunho da diversidade biológica e constituem o patrimônio genético nacional *ex situ*, ou seja, patrimônio natural que está fora do seu hábitat original. As coleções são constituídas de registros biológicos da diversidade num determinado tempo e espaço e são de inestimável importância para as pesquisas relacionadas ao conhecimento da biodiversidade, da sistemática e da epidemiologia dos organismos. As informações específicas dos materiais biológicos armazenados podem orientar estratégias de conservação da biodiversidade e de controle ambiental, além de ações de controle epidemiológico. Acervos que apresentam populações genéticas de organismos relacionados a infecções em seres vivos e registros de variações ocorridas em agentes etiológicos e/ou vetores ao longo do tempo são fundamentais para pesquisas epidemiológicas (Silva & Sá, 2016; SIBBr, 2018).

Os acervos das coleções, muito mais do que servir como repositórios de material biológico para a pesquisa científica, subsidiam atividades de formação e treinamento de recursos humanos, consultorias técnico-científicas, além de atuar como prestadores de serviços, por exemplo, os depósitos confidenciais de organismos-chave para a investigação científica e indústria (SIBBr, 2018; Smith, 2012).

Além da relevância para as ciências básicas, algumas coleções abrigam materiais biológicos com potencial biotecnológico, utilizados como matéria-prima para obtenção de fármacos, alimentos, substâncias orgânicas, bioprodutos utilizados na produção de insumos para diagnóstico, vacinas e medicamentos (Aranda, 2014; Fiocruz, 2017; Stackebrandt, 2010).

As coleções constituídas de micro-organismos vivos são necessários para inúmeras aplicações práticas, tais como: controles em ensaios de identificação de patógenos, em ensaios de controle da qualidade de produtos, no desenvolvimento de novos tratamentos médicos, tais como a terapia do fago ou a aplicação de probióticos que se baseiam na disponibilidade de recursos microbianos adequados e ativos (Overmann, 2015). Atualmente, a provisão de recursos microbianos para pesquisa é reconhecida como um componente essencial no avanço das ciências da vida e no desenvolvimento da bioeconomia (Smith, McCluskey & Stackebrandt, 2014; Boundy-Mills et al., 2015).



**Figura 1.** Aplicações das coleções biológicas.

## 6.1 EXEMPLOS DE ESTUDOS FUNDAMENTAIS PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA: CRIAÇÃO DA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DA AMAZÔNIA AZUL

Em 2007, pesquisadores do Rio de Janeiro criaram a Coleção de Bactérias da Mata Atlântica (CBMA), com o objetivo de isolar, identificar e preservar bactérias representantes da diversidade do solo da Mata Atlântica. A CBMA foi estabelecida no contexto do projeto Biodiversidade da Mata Atlântica do Rio de Janeiro, uma iniciativa da FAPERJ/FINEP e Fiocruz. Logo após, outras subcoleções foram integradas à CBMA, que passou a ser denominada Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS), cujo acervo apresenta grande diversidade biológica, constituído por diferentes gêneros bacterianos oriundos de distintos nichos ambientais, além de bactérias de impacto na saúde. Atualmente, a CBAS, uma das Coleções Biológicas da Fiocruz, filiada à WFCC, possui cinco subcoleções: Coleção de Bactérias da Mata Atlântica (CBMA), Coleção de Bactérias da Amazônia Azul (CBAA), Coleção de Vibrio do Ambiente e Saúde (CVAS), Coleção de Bactérias de Impacto na Saúde (CBIS) e Coleção Geral de Bactérias do Ambiente (CGBA).

A subcoleção CBAA (Coleção de Bactérias da Amazônia Azul) foi estabelecida em 2009 e tem em seu acervo bactérias representantes da microbiota do ecossistema que compreende a plataforma continental brasileira conhecida como Amazônia Azul. A CBAA é, até o momento, a única coleção brasileira que tem como acervo exclusivo bactérias isoladas desse ecossistema. Essa coleção foi iniciada a partir do depósito de bactérias obtidas durante o fenômeno da ressurgência em Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. A taxonomia desses organismos, que aplicou a

análise da sequência do gene 16S rRNA, caracterizou 321 linhagens bacterianas relacionadas aos seguintes gêneros: *Acinetobacter* sp., *Algibacter* sp., *Allivibrio* sp., *Alteromonas* sp., *Colwellia* sp., *Dokdonia* sp., *Enterovibrio* sp., *Kocuria* sp., *Krokinobacter* sp., *Labrenzia* sp., *Listonella* sp., *Marinobacter* sp., *Naxibacter* sp., *Novosphingobium* sp., *Ochrobactrum* sp., *Photobacterium* sp., *Polaribacter* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Ruegeria* sp., *Sandarakinotalea* sp., *Shewanella* sp., *Shimia* sp., *Silicibacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Sulfitobacter* sp., *Tenacibaculum* sp., *Thalassobius* sp., *Thalassospira* sp., *Vibrio* sp. e *Winogradskyella* sp. O gênero mais diverso e abundante é o *Vibrio*, que contém espécies de impacto na saúde humana e animal, assim como espécies produtoras de biomoléculas que têm potencial biotecnológico.

Assim, essa coleção tem preservado e mantido à disposição de pesquisadores de todo o mundo um acervo de bactérias do ambiente marinho que podem e devem ser estudadas no sentido de conhecer a sua diversidade e potencial biotecnológico.



**Figura 2.** Representação da abundância dos gêneros de bactérias do acervo CBA.

**6.2 APLICAÇÕES DA BIODIVERSIDADE NA BIOTECNOLOGIA MARINHA**

O ambiente marinho, que é o ecossistema menos conhecido e explorado do planeta, alberga uma biodiversidade que poderá prover a humanidade com compostos bioativos de grande impacto no campo da saúde e ambiente. Como exemplo desse potencial temos alguns fármacos que já estão no mercado e que tiveram como origem organismos marinhos: AZT, primeira droga para o tratamento da infecção pelo retrovírus HIV, isolada da esponja *Cryptotheca crypta*; antitumoral, nucleosídeos da esponja *Tethya crypta*; antitumoral obtido de *Ecteinascidia turbinata*, e analgésico potente com base na toxina de *Conus magus* (De Felício et al. 2012; Sekar & Chandramohan, 2008).

**7 | COLEÇÕES BIOLÓGICAS E CENTROS DE RECURSOS BIOLÓGICOS**

Para que as coleções biológicas possam desempenhar suas funções no desenvolvimento científico e tecnológico, faz-se necessário que possuam uma estrutura organizacional que contemple uma curadoria, uma gerência e uma equipe técnica qualificada. A equipe da curadoria é responsável por coordenar as atividades que envolvem os aspectos técnicos, científicos e metodológicos, além de fazer interlocução com gestores institucionais para o contínuo reconhecimento do patrimônio da coleção. Ao gerente, cabe auxiliar o curador na parte executiva e acompanhar cada processo, garantindo seu devido registro e monitoramento (Aranda, 2014; Silva & Sá, 2016).

Outra questão estratégica para as coleções é a qualidade dos materiais biológicos, que é fundamental para as aplicações bem-sucedidas destes. A qualidade comprovada dos materiais biológicos representa um grande salto na agregação de valor aos produtos decorrentes de aplicações em saúde, na indústria, na agricultura e no ambiente (Schungel & Stackebrandt, 2015; Stackebrandt, 2010; Vazoller & Canhos, 2005). A implementação de normas específicas de qualidade é recomendada para garantir a qualidade dos materiais biológicos, das informações associadas a estes e dos serviços das coleções biológicas.

As coleções biológicas podem ser classificadas, segundo o grau de organização e implementação da gestão da qualidade, como pertencentes ao nível básico, intermediário, alto e Centro de Recursos Biológicos (CRB) (Smith; McCluskey; Stackebrandt, 2014). Esses autores sugerem tal classificação como forma de mostrar a evolução das coleções biológicas a Centro de Recursos Biológicos (CRB), onde as coleções consideradas de nível básico apresentam métodos de preservação e documentação básicos até os CRBs que são coleções que alcançaram o mais avançado padrão de organização, qualidade e *expertise* demandados pela comunidade internacional científica e industrial. A definição de CRB como um novo conceito para as coleções biológicas foi estabelecida pela OCDE (2001). Em 2007, a OCDE lançou as Diretrizes de Boas Práticas para os CRB (*Best Practice Guidelines for Biological Resources*), um documento que fornece regras básicas e práticas para orientação de CRBs. Essas diretrizes são destinadas ao gerenciamento da qualidade de coleções, de modo a assegurar um material biológico de alto padrão e um banco de dados confiável, além de contribuir para a proteção da saúde da equipe, do público e do ambiente (OCDE, 2007). Esse documento foi traduzido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2012a). Em 2012, a Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Inmetro, órgão oficial de acreditação no Brasil, elaborou o documento NIT-DICLA-61 (Requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaios e dos produtores de materiais de referência dos CRB), baseado nas diretrizes da OCDE (Forti, 2016; Holanda et al., 2012; INMETRO, 2012b).

Em linhas gerais, os CRBs devem contemplar: estratégias para a garantia da qualidade e características das linhagens microbianas; investimento em metodologias de preservação e manutenção de micro-organismos (longo prazo) e de caracterização (garantir a estabilidade do material biológico), curadores que possuem experiência em identificação, plano de sustentabilidade do acervo e do CRB, regulamentação e questões ligadas a biossegurança e bioproteção, manipulação, armazenamento e transporte adequado de uma ampla variedade de material biológico, formação de recursos humanos e, principalmente, um sistema de gestão da qualidade implementado que apresente ensaios acreditados na norma internacional ABNT NBR ISO/IEC

17025:2017 (Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios) e na NIT-DICLA 061 pelo CGCRE para reconhecer a competência técnica do laboratório como CRB para prestar serviços a empresas no Brasil e no exterior (ABNT, 2017; BRASIL, 2016; INMETRO, 2012b; HOLANDA et al., 2012).

No Brasil, o governo instituiu a Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos (Rede CRB-Br) e sua estrutura, no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) visando fornecer recursos biológicos com qualidade assegurada, para aplicações tecnológicas e de pesquisa e desenvolvimento dos setores científico, industrial, ambiental e da saúde. Na consolidação e infraestrutura da rede participam a Fiocruz e outras instituições brasileiras como a Embrapa, UNICAMP, entre outras. A FIOCRUZ é responsável pela criação do CRB-Saúde, que será constituído por micro-organismos patogênicos relacionados principalmente a doenças tropicais ou com potencial biotecnológico na área da saúde. As coleções candidatas a CRB que atendem aos critérios exigidos devem submeter uma solicitação ao Conselho Diretor do CRB-BR para serem reconhecidas como pertencentes à rede brasileira (BRASIL, 2014; BRASIL, 2016).

## 8 | CONCLUSÕES

O ecossistema marinho, que representa 95% da biosfera, alberga uma diversidade de vida exclusiva e, em sua maioria, ainda desconhecida. É uma fronteira a ser explorada do ponto de vista da diversidade e da bioprospecção. Entretanto, essa diversidade pode ser, pelo menos em parte, extinta antes mesmo de ser conhecida. Por isso, deve ser prioridade, no presente e futuro, a expansão das coleções biológicas, visando ao incremento de seus acervos e sua representatividade. Em particular, esforços nesse sentido devem ser empenhados em relação a coleções biológicas com acervos caracterizados por organismos do ecossistema marinho.

## REFERÊNCIAS

Aranda, A.T. (2014) Coleções biológicas: conceitos básicos, curadoria e gestão, interface com a biodiversidade e saúde pública: In: Simpósio Sobre A Biodiversidade Da Mata Atlântica, 3. **Livro de resumos**. Santa Teresa: Museu de Biologia Prof. Mello Leitão. 45-56.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2017) **NBR ISO/IEC 17025:2017: Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios**. Rio de Janeiro.

Boundy-Mills, K. et al. (2015) The United States Culture Collection Network (USCCN): Enhancing microbial genomics research through living microbe culture collections. **Applied and Environmental Microbiology**. 81(17): 5671-5674.

Brasil (2007) Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Instrução Normativa nº 160, de 27 de abril de 2007**. Institui o Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO) e disciplina o transporte e o intercâmbio de material biológico consignado.

Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 abr. 2007. Seção 1: 404-405.

Brasil (2014) Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Portaria nº 409, de 15 de abril de 2014**. Institui a Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 abr. 2014. Seção 1: 9.

Brasil (2016) Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Portaria nº 130, de 18 de fevereiro de 2016**. Altera a Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos - Rede CRB-Br e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 fev. 2016. Seção 1: 79.

Chun, J.; Rainey, F.A. (2014) Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. **Int J Syst Evol Microbiol**. 64(2): 316-24.

Costa, E.C. et al. (2009) Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**. 19(2): 111-122.

De Felício, R.; Oliveira, A.L.; Debonsi, H.M. (2012) Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciênc. Cult**. 64(3): 39-42.

Forti, T.; Souto Ada, S.; Nascimento, C.R.; Nishikawa, M.M.; Hubner, M.T.; Sabagh, F.P.; Temporal, R.M.; Rodrigues, J.M.; Silva M. (2016) Evaluation of a fungal collection as certified reference material producer and as a biological resource center. **Braz J Microbiol**. 47(2): 403-9.

Fundação Oswaldo Cruz (2017) **POP VPPCB-M-CB-001: Manual de Organização de Coleções Biológicas da Fiocruz**. Rev. 07. Rio de Janeiro. 16p. (Manual da Qualidade). Disponível em: [https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/vppcb-m-cb-001\\_manual\\_de\\_organizacao\\_colecoes\\_da\\_fiocruz\\_0.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/vppcb-m-cb-001_manual_de_organizacao_colecoes_da_fiocruz_0.pdf). Acesso em: 22 set. 2018.

Fundação Oswaldo Cruz (2018) **Coleções Biológicas**. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/colecoes-biologicas>. Acesso em: 22 set. 2018.

Holanda, P. et al. (2012) Conformity Assessment for Biological Resource Centres (BRC): The Brazilian Approach. **World Federation for Culture Collections/Newsletter**. 52:11-13. Disponível em: <http://www.wfcc.info/newsletter/>. Acesso em: 21 out. 2018.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (2012a) **Versão brasileira do documento Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos**. Brasil. Disponível em: [https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/DOQ-Cgcre-34\\_00\\_traducao\\_guia%20de%20boas%20praticas%20CRB\\_OECD.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/DOQ-Cgcre-34_00_traducao_guia%20de%20boas%20praticas%20CRB_OECD.pdf) Acesso em: 20 set. 2018.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (2012b) **Requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaio e dos produtores de materiais de referência dos Centros de Recursos Biológicos**. Brasil. Disponível em: [https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/NIT-Dicla-61\\_01.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/NIT-Dicla-61_01.pdf) Acesso em: 20 set. 2018.

Morgan, C.A.; Herma, N.; White, P.A.; Vesey, G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review. **J Microbiol Methods**. 66(2): 183-93.

Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (2001) **Organisation for Economic Co-operation and Development. Biological Resource Centres: Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology**. Paris: OECD. Disponível em: <http://www.oecd.org/sti/emerging-tech/2487422.pdf>. Acesso em: 20 out. 2018.

Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (2007) **Organisation for Economic Co-ope-**

**ration and Development.** OECD Best practice guidelines for Biological Resource Centres, Paris: OCDE. Disponível em: <http://www.oecd.org/sti/emerging-tech/2487422.pdf>. Acesso em: 20 out. 2018.

Overmann, J. (2015) Significance and future role of microbial resource centers. **Systematic and Applied Microbiology**. 38(4): 258-265.

Parte, A.C. (2018) LPSN – List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 68: 1825-1829.

Prakash, O.; Nimonkar, Y.; Shouche, Y. S. (2013) Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS Microbiology Letters**. 339(1): 1-9.

Schungel, M.; Stackebrandt, E. (2015) Microbial Resource Research Infrastructure (MIRRI): Infrastructure to foster academic research and biotechnological innovation. **Biotechnology Journal**. 10(1): 17-19.

Sekar, S.; Chandramohan, M. (2008) Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **J Appl Phycol**. 20: 113-136.

Silva, M.; Sá, M.R. (2016) Coleções vivas: as coleções microbiológicas da Fundação Oswaldo Cruz. **Revista Museologia & Interdisciplinaridade**. 5(1): 175-187.

Sistema de Informação Sobre a Biodiversidade Brasileira (SIBBR) (2018) **Coleções Biológicas**. Disponível em: <http://www.sibbr.gov.br/areas/index.php?area=colecões&subarea=introducao> Acesso em: 20 jul. 2018.

Smith, D. (2012) Culture collections. **Advances in Applied Microbiology**. 79: 73-118.

Smith, D.; Ryan, M. (2012) Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. **The Scientific World Journal**. ID 805659. 9p.

Smith, D.; McCluskey, K.; Stackebrandt, E. (2014) Investment into the future of microbial resources: culture collection funding models and BRC business plans for biological resource centres. **Springerplus**. 3:81

Stackebrandt, E. (2010) Diversification and focusing: strategies of microbial culture collections. **Trends in Microbiology**. 18(7): 283-287.

Thompson, C.C.; Amaral, G.R.; Campeão, M.; Edwards, R.A.; Polz, M.F.; Dutilh, B.E.; Ussery, D.W.; Sawabe, T.; Swings, J.; Thompson, F.L. (2015) Microbial taxonomy in the post-genomic era: rebuilding from scratch? **Arch Microbiol**. 197(3): 359-70.

Thompson, C.C.; Vicente, A.C.; Souza, R.C.; Vasconcelos, A.T.; Vesth, T.; Alves, N. Jr.; Ussery, D.W.; Iida, T.; Thompson, F.L. (2009) Genomic taxonomy of *Vibrios*. **BMC Evol Biol**. 27(9): 258.

Vazoller, R.F.; Canhos, V.P. (2015) **Coleções de Culturas e Serviços e Centros de Recursos Biológicos**. Nota Técnica. São Paulo. Disponível em: <http://www.cgee.org.br/atividades>. Acesso em: 20 out. 2018.

Word Federal Culture Collection (2018) Disponível em: <http://www.wfcc.info/>. Acesso em: 10 jul. 2018.





# LEIS E HISTÓRICO DE PATENTES NO BRASIL

Ana Carolina Salles<sup>a</sup>  
Adriana Fróes<sup>a</sup>  
Naiane Negri<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

## RESUMO

Este capítulo apresenta breve histórico das regulamentações sobre propriedade intelectual no Brasil, contextualizando o cenário nacional em relação a outros países. Aborda a criação do INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), suas definições, importância e desdobramentos face às valorosas tecnologias industriais que surgiram com o crescimento econômico da década de 70. Destaca também o papel da biotecnologia marinha como um setor de atividade importante e motor para o desenvolvimento tecnológico, destacando suas principais áreas de atuação com foco na inovação de produtos e processos, bem como a proteção intelectual através de patentes. A análise de pedidos de patentes publicadas por eixo temático em biotecnologia evidencia os principais focos de inovação tecnológica, bem como os países que mais inovam em biotecnologia. Por fim, aborda a formação das principais redes de pesquisa em biotecnologia marinha no Brasil, destacando a sua importância para promover a competitividade do território brasileiro.

# 1 | INTRODUÇÃO

O Brasil foi um dos primeiros países do mundo a criar uma lei que definia regras de proteção intelectual, ficando atrás da Inglaterra, Estados Unidos e França.

Desde a época do Império o Brasil teve regulamentações sobre propriedade das invenções e das marcas de comércio. A primeira delas foi o Alvará de 28 de abril de 1809 de Dom João VI, que estabelecia princípios que hoje poderiam ser aplicáveis nos casos de pedidos de patentes. No capítulo VI está escrito:

“Sendo muito conveniente que os inventores e introdutores de alguma nova máquina e invenção nas artes gozem do privilégio exclusivo, além do direito que possam ter ao favor pecuniário, que sou servido estabelecer em benefício da indústria e das artes, ordeno que todas as pessoas que estiverem neste caso apresentem o plano de seu novo invento à Real Junta do Comércio, e que esta, reconhecendo-lhe a verdade e fundamento dele, lhes conceda o privilégio exclusivo por 14 anos, ficando obrigadas a fabricá-lo depois, para que, no fim desse prazo, toda a Nação goze do fruto dessa invenção. Ordeno, outrossim, que se faça uma exata revisão dos que se acham atualmente concedidos, fazendo-se público na forma acima determinada e revogando-se todas as que por falsa alegação ou sem bem fundadas razões obtiveram semelhantes concessões”.

Em 14 de outubro de 1882, o Imperador Dom Pedro II regulou a concessão de patentes no Império de forma abrangente, por meio da Lei 3.129. Essa lei foi elaborada na mesma ocasião em que os países mais envolvidos na discussão sobre patentes realizavam um encontro internacional para apurar arestas, em 1880, em Paris, onde ocorreu a primeira reunião. Nessa reunião os governantes compreenderam que não bastava que cada país tivesse sua própria lei se a propriedade industrial não conhecia fronteiras. Dessa forma, em 20 de março de 1883, 14 países, incluindo o Brasil, assinaram o primeiro acordo internacional conjunto sobre patentes, conhecido como Convenção da União de Paris (CUP), que entraria em vigor em 1884. Esses países foram: Bélgica, Equador, Tunísia, Suíça, Grã-Bretanha, França, Itália, Holanda, Espanha, Guatemala, Sérvia, El Salvador, Portugal e Brasil. O texto passou por várias modificações, através de sete revisões. Na primeira, em Roma, os atos assinados não foram ratificados por nenhum país. Depois seguiram-se as revisões de Bruxelas (1900), Washington (1911), Haia (1925), Londres (1934), Lisboa (1958) e Estocolmo (1967). O Brasil, país signatário original, aderiu à revisão de Estocolmo em 1992. Em 1970 o país assinou o mais importante tratado de cooperação internacional no campo de patentes já firmado entre as nações, que é o Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT - *Patent Cooperation Treaty*), um instrumento dominante de consolidação do sistema de patentes.

Com a chegada da República, o país foi criando novas leis que mudaram o nome e perfil

da instituição pública de concessão de patentes. Em 19 de dezembro de 1923 o Presidente Arthur Bernardes criou a primeira instituição dedicada especificamente ao tema, a Diretoria-Geral da Propriedade Industrial (DGPI). Extinta em 1931, suas atividades foram absorvidas pelo Departamento Nacional da Indústria, do Ministério do Trabalho.

Em 1933 foi criado o DNPI (Departamento Nacional da Propriedade Industrial), que agregou novas atividades, como concessão de outros tipos de patentes, além de invenção, repressão à concorrência desleal e execução de convenções internacionais.

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), criado pela Lei 5.648, de 11 de dezembro de 1970, substituiu o DNPI, de forma a dar conta do novo cenário que se criou com o crescimento econômico da década de 1970, com o surgimento de novas tecnologias que estavam cada vez mais presentes na indústria. O INPI atual é uma autarquia federal vinculada ao Ministério da Economia, responsável pelo aperfeiçoamento, disseminação e gestão do sistema brasileiro de concessão e garantia de direitos de propriedade intelectual para a indústria.

Segundo informa o site do INPI, esse órgão “tem por finalidade principal executar, no âmbito nacional, as normas que regulam a propriedade industrial, tendo em vista a sua função social, econômica, jurídica e técnica, bem como pronunciar-se quanto à conveniência de assinatura, ratificação e denúncia de convenções, tratados, convênios e acordos sobre propriedade industrial”. O INPI é mais que um órgão estatal específico investido dos poderes de concessão de uma patente. Além disso, ele também é responsável pelo registro de marcas, de desenhos industriais, de programas de computador e topografia de circuitos integrados, de indicação geográfica, e por serviços de averbações de contratos de franquia e das diversas modalidades de transferência de tecnologia.

O direito de propriedade industrial, no Brasil, está disciplinado pela LPI, Lei 9.279/1996, que compreende o conjunto de regras e princípios que conferem tutela jurídica específica aos elementos imateriais, protegendo marcas e desenhos industriais registrados, e as invenções e modelos de utilidade patenteados, além de reprimir as falsas indicações geográficas e a concorrência desleal.

O direito de propriedade industrial iniciou já a partir da Constituição de 1824 (nossa primeira constituição), em seu artigo 179, inciso XXVI: “os inventores terão propriedade de suas descobertas ou das produções. A lei lhes assegurará um privilégio exclusivo e temporário ou lhes remunerará em ressarcimento da perda que hajam de sofrer pela vulgarização”. A nossa atual Carta Magna de 1988 seguiu a tradição constitucional brasileira quanto a esse tema, estabelecendo, no artigo 5º, inciso XXIX: “a lei assegurará aos autores dos inventos industriais privilégio temporário para sua utilização, bem como proteção às criações industriais, a propriedade das marcas, aos nomes de empresas e a outros signos distintivos, tendo em vista o interesse social e o desenvolvimento tecnológico e econômico do País”.

## 2 | PATENTES DE BIOTECNOLOGIA

No âmbito internacional, as legislações divergem bastante em relação a quais inven-

ções biotecnológicas podem ser patenteadas. O acordo TRIPS (*Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights*) – Acordo sobre Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio, que entrou em vigor em 1º de janeiro de 1995, estabelece os casos em que os países-membros poderão negar a proteção patentária nessa área, que são: (1) métodos diagnósticos, terapêuticos e cirúrgicos para o tratamento de seres humanos ou de animais; (2) plantas e animais exceto micro-organismos e processos essencialmente biológicos para a produção de plantas e animais, com a exceção de processos não biológicos e microbiológicos. O TRIPS faz parte do conjunto de acordos assinados em 1994 que criou a Organização Mundial do Comércio (OMC) e é o instrumento multilateral mais importante para a globalização das leis de propriedade intelectual.

Porém o Brasil, diferentemente da maioria dos países desenvolvidos, usou toda a flexibilidade da norma internacional, sendo bastante restritivo em relação às patentes de biotecnologia.

As discussões para chegar ao TRIPS mostraram que os países estavam aperfeiçoando o sistema de patentes, com regras claras para todos, fossem desenvolvidos ou em desenvolvimento. Para acompanhar esse processo, alguns países precisaram adaptar sua legislação interna. Entre eles, o Brasil. Por aqui ainda vigorava o Código de Propriedade Industrial de 1974 que, entre outras regras, não previa a concessão de patentes a produtos farmacêuticos, químicos e alimentícios. Essa regra estava em desacordo com o TRIPS, acordo internacional cujo teor o Brasil ajudou a construir. A partir do TRIPS, uma nova Lei de Propriedade Industrial, de 14 de maio de 1996 (Lei nº 9.279), que entrou em vigor em 15 de maio de 1997, permitiu ao Brasil voltar a conceder patentes para alimentos, medicamentos e substâncias obtidas a partir de processos químicos, até então proibidos. A nova lei contemplava alguns avanços tecnológicos recentes como a concessão de patentes para os micro-organismos que tivessem sua constituição genética alterada em laboratório (transgênicos).

O site do INPI ([www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br)) disponibiliza diversas informações sobre os serviços prestados ao público pelo Instituto, incluindo uma ferramenta de busca de documentos *online*. O esforço do INPI em divulgar seu acervo de patentes é devido à convicção de que essas informações são fundamentais para o desenvolvimento da humanidade. As patentes em biotecnologia revelam como é dinâmico o processo de transferência de conhecimento. Patentes, ou pedidos de patentes, que tratam de microrganismos transgênicos como principal invenção devem complementar o relatório descritivo com o depósito do material biológico (microrganismo transgênico), em instituição autorizada pelo INPI ou indicada em acordo internacional, reconhecida pelo Tratado de Budapeste. Esse material depositado, depois do fim do sigilo, torna-se público e pode ser pesquisado.

### 3

## BIOTECNOLOGIA: MOTOR PARA O DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

Nos últimos anos, diversos atores como o governo, empresas e indústrias, bem como

a comunidade científica, estão se unindo em prol do desenvolvimento biotecnológico, em face das oportunidades de exploração comercial de soluções de problemas de forma sustentável. Entende-se por biotecnologia qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica. Nesse sentido, o Brasil, por meio de instituições como a Confederação Nacional da Indústria – CNI, apresentou recentemente uma agenda prática e viável visando à criação de um ambiente mais propício à inovação, destacando vários setores empresariais considerados intensivos em tecnologia, incluindo a biotecnologia.

Destaca-se que para fomentar e viabilizar um ambiente mais inovativo é preciso investir em pontos estratégicos para alcançar o sucesso do desenvolvimento biotecnológico como, por exemplo, aqueles relativos à formação de recursos humanos qualificados, melhorias no marco legal para a inovação para ampliar incentivos e investimentos públicos, além de melhoria na política de inovação e do sistema de propriedade intelectual (PI).

No contexto atual, em que a biodiversidade vem sendo progressivamente devastada e existem diversas carências tecnológicas em vários setores da sociedade, o investimento em produtos naturais (biológicos) e a sua produção econômica induz ao desenvolvimento de uma bioeconomia.

Existem diversos tipos de biotecnologia, isto é, focos diferentes de utilização de bioinsumos que vão gerar bioprodutos com funções e aplicações em contextos distintos. Para facilitar a compreensão, em 2004, a Comissão Europeia de Biociências e Tecnologia, na Universidade de York, no Reino Unido, instituiu uma classificação dos vários ramos da biotecnologia utilizando um código de cores, sendo elas: branca, vermelha, verde e azul.

A primeira delas é a biotecnologia branca (industrial), relacionada à biotecnologia aplicada a processos industriais. Um exemplo é a concepção de um organismo para produzir um produto químico útil. A biotecnologia branca tende a consumir menos recursos do que os processos tradicionais utilizados para produzir bens industriais.

A segunda é a biotecnologia vermelha, associada à saúde humana e animal. Está relacionada aos processos médicos e de saúde como, por exemplo, o desenho de organismos capazes de produzir antibióticos ou moléculas importantes como a insulina, e a engenharia de tratamentos genéticos através de manipulação genética.

O terceiro tipo é a biotecnologia verde ou agrícola. Exemplos de biotecnologia verde estão associados ao desenvolvimento de plantas transgênicas que crescem em ambientes específicos, na presença (ou ausência) de produtos químicos. Esse ramo da biotecnologia tem como objetivo produzir soluções para as questões agrícolas mais sustentáveis e com baixa agressão ao meio ambiente e ao ser humano, em comparação à agricultura industrial tradicional.

Por fim, temos a biotecnologia azul, associada ao meio ambiente. Nesse ramo, há pesquisas relacionadas à manutenção de condições ambientais e remoção de contaminantes, fermentação clássica e bioprocessos. Nessa dimensão, destaca-se a biotecnologia marinha, foco de estudo deste livro.

O ambiente marinho representa aproximadamente 70% da superfície do planeta e abriga cerca de metade da biodiversidade global, mas poucas espécies são exploradas ou usadas

com propósitos biotecnológicos. A riqueza presente nos mares e oceanos é enorme e pode apresentar inúmeros benefícios para a sociedade a partir de derivados da biodiversidade marinha. Esses derivados podem ser fontes de novos fármacos e produtos industriais, insumos para uso na agricultura e na aquicultura e outros que podem ser utilizados na produção de combustíveis. Além disso, a biotecnologia marinha pode ser um mercado promissor para as indústrias que já atuam nessa área, pela diversidade de possibilidades de produtos gerados a partir de organismos marinhos.

De modo geral, os progressos recentes no campo da biotecnologia marinha apontam a capacidade de produção do material genético contido nas plantas, nos animais e nos micro-organismos para a aquicultura, saúde, agricultura e a sustentabilidade do meio ambiente, indicando ser necessário o fortalecimento de pesquisas que identifiquem novos processos e produtos com potencial comercial.

O Brasil, com seus aproximadamente 4,5 milhões de quilômetros quadrados de área marinha, abriga uma diversidade exclusiva. A partir dela, diversos organismos podem ser considerados fonte potencial para exploração científica e resultar na descoberta de novas moléculas e produtos biotecnológicos, que poderão, progressivamente, solucionar demandas comerciais de diversos setores produtivos, bem como demandas da sociedade.

Como podemos ver, a biotecnologia apresenta significativa relevância na busca por soluções para diferentes setores, buscando sempre a preservação dos ecossistemas, associada à manutenção da competitividade das indústrias e dos mercados. Especificamente no Brasil, a biotecnologia marinha (azul) oferece oportunidades inexploradas para a descoberta científica e concessão de patentes que podem posicionar o Brasil no *ranking* mundial dos países que mais inovam e detêm propriedade intelectual nesse quesito. Além disso, também apresenta grande potencial para ser inovadora e explorada comercialmente, em face da riqueza de sua biodiversidade e o tamanho de sua área marinha, contribuindo enormemente para ser um dos principais pilares do avanço tecnológico do país no futuro próximo.

## 4

## A IMPORTÂNCIA DA PROTEÇÃO INTELLECTUAL: PATENTES

Para proteger o conhecimento científico com potencial de industrialização, é necessário solicitar a concessão da invenção ou inovação no órgão de proteção intelectual competente. No Brasil, esse órgão é o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), autarquia federal vinculada ao Ministério da Economia, que julgará sua validade com base nas disposições da Lei da Propriedade Industrial, nº 9.279, de 14 de maio de 1996.

A concessão de direitos sobre o conhecimento, criação ou invenção é um reconhecimento sob a forma de patente. Patente é um direito exclusivo concedido pelo Estado relativo a uma invenção (ou modelo de utilidade) que atende aos requisitos de patenteabilidade (novidade, atividade inventiva e aplicação industrial). A patente é representada por um documento formal, um título de propriedade temporária, expedido por uma administração pública nacional de patentes de um país (no caso do Brasil é o INPI), no qual se conferem e se reco-

nhecem direitos de propriedade e uso exclusivo sobre uma invenção ou modelo de utilidade. Por consequência, a patente concede ao seu titular, que pode ser pessoa física ou jurídica, o direito exclusivo de explorar uma invenção tecnológica no mercado, bem como impedir que outras pessoas fabriquem, utilizem, divulguem para a venda, vendam ou importem um produto ou um processo baseado na invenção patentada. Em contrapartida, o inventor se obriga a revelar detalhadamente todo o conteúdo técnico da matéria protegida pela patente.

Para fins de patente, a descoberta ou invenção precisa enquadrar-se no quesito inovador, isto é, precisa ostentar o privilégio de ser considerado algo novo, apresentar atividade inventiva e ter uma aplicação industrial ou potencial de exploração econômica. Além disso, a descoberta ou invenção pode representar um modelo de utilidade, isto é, pode ser considerada uma nova forma ou disposição de um objeto/processo/produto que, envolvendo o ato inventivo, resulte em melhoria funcional (ampliação dos benefícios) do objeto/processo/produto.

Dessa maneira, podem ser patenteadas as invenções ou descobertas desde que estas atendam aos requisitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial, bem como apresentem um modelo de utilidade que seja objeto de uso prático, ou parte deste; que seja suscetível de aplicação industrial; ou que apresente nova forma ou disposição, envolvendo ato inventivo que resulte em melhoria funcional no seu uso ou em sua fabricação.

Realizar o depósito de patentes é um ato importante no processo de avanço do conhecimento científico e tecnológico de uma sociedade. Ao obter a concessão da invenção patentada, o inventor passa a deter os direitos de uso e exploração daquele conhecimento, podendo prosseguir com suas pesquisas tendo a garantia de proteção dos investimentos que foram realizados. Além disso, o depósito de patentes pode acabar incentivando os concorrentes em um dado mercado competitivo a buscar alternativas tecnológicas para reconquistar o mercado ou até mesmo conquistar novos mercados, não fazendo uso de licenças de exploração de patentes. Nesse sentido, a divulgação formal de invenções ou criações intelectuais por meio da expedição de documentos de patente beneficia a todos, uma vez que abre portas para a possibilidade de utilizar um conhecimento ou uma tecnologia que amplia os benefícios e soluções para os problemas da sociedade, uma vez que de outra forma, essas invenções permaneceriam como segredo industrial de algumas empresas. Assim, o papel social das patentes é promover o desenvolvimento tecnológico e estimular a inovação.

#### 4.1 PATENTES EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

A busca por patentes no *World Intellectual Property Organization* (WIPO) revela número expressivo de patentes em biotecnologia marinha no mundo (Tabela 1). O estudo quantitativo dessas patentes é importante, pois assim podemos mensurar o quanto está sendo inovado nessa área. Há pedidos de patentes desde quando se utiliza na busca o termo "*marine biotechnology*" até os termos "*mollusk*", "*algae*", "*marine compounds*", o que demonstra uma grande diversidade nessa área. Os micro-organismos com destaque nos pedidos de patentes são as *bactérias*, as *algas* e as *esponjas*. As áreas que merecem atenção são a *biotecnologia marinha*, *biologia marinha molecular* e *bioquímica marinha*.

O número de pedidos de patentes em cada área das palavras-chave citadas demonstra

valores relativamente reduzidos para o Brasil (Tabelas 1 e 2). Vale ressaltar que nesse número se enquadram os pedidos que estão ainda em fase de análise e os que já foram concedidos (as patentes). Apesar disso, ainda existem áreas a serem exploradas como, por exemplo, pesquisas com equinodermas, em que o número de patentes é irrisório quando comparado com os demais (três patentes mundialmente e apenas uma nacional). Em compensação, outras áreas apresentam números bastante expressivos, como o caso das esponjas, dos produtos marinhos, pesca e algas, áreas que apresentam 218.119, 104.834, 100.606 e 109.436 patentes, respectivamente.

**Tabela 1.** Patentes em biotecnologia no mundo de acordo com o WIPO.

<b>PESQUISA DE PATENTES DE BIOTECNOLOGIA MARINHA NO MUNDO</b>	
<b>PALAVRAS-CHAVE</b>	<b>NÚMERO DE PATENTES</b>
Esponjas	218119
Algas	109436
Produtos marinhos	104834
Pesca	100606
Molecular marinho	82096
Composto marinho	79012
Cultura de alga	67455
Bactéria marinha	46983
Química marinha	38901
Organismos marinhos	34130
Algas marinhas	28599
Biotecnologia marinha	23912
Bioquímica marinha	21199
Micro-organismo marinho	18736
Aquacultura	18695
Transgênico marinho	18424
Microalga	11576
Cultivo marinho	10469
Alga marinha	4409
Invertebrado marinho	4122
Moluscos	3866
Maricultura	1035
Equinodermas	3
Total	1.093.600

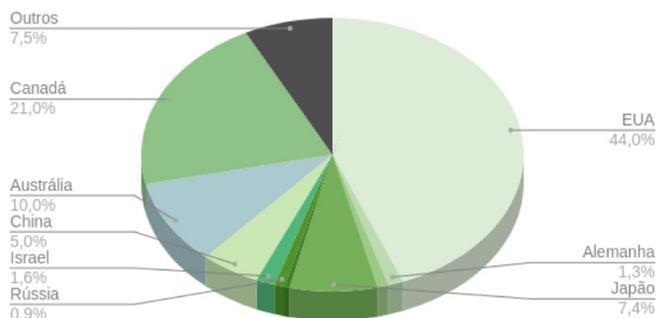
**Tabela 2.** Patentes em biotecnologia no Brasil de acordo com o WIPO.

PESQUISA DE PATENTES DE BIOTECNOLOGIA MARINHA NO BRASIL	
PALAVRAS-CHAVE	NÚMERO DE PATENTES
Molecular marinho	210
Biotecnologia marinha	89
Bioquímica marinha	76
Química marinha	66
Algas	55
Esponjas	51
Produtos marinhos	45
Alga marinha	36
Transgênico marinho	30
Organismos marinhos	22
Aquacultura	19
Microalga	17
Algas marinhas	16
Cultura de alga	11
Pesca	10
Bactéria marinha	9
Composto marinho	6
Cultivo marinho	4
Invertebrado marinho	4
Maricultura	3
Micro-organismo marinho	2
Moluscos	1
Equinodermas	0
Total	791

Quando comparamos os valores com o cenário brasileiro, vemos que apenas 0,07%, do total das patentes mundiais referem-se a patentes nacionais. Uma parte da explicação desse valor pode decorrer da porcentagem do PIB que é investido em pesquisa e desenvolvimento (P&D). Segundo a UNESCO, em 2010 o Brasil aplicava apenas 1,16% do PIB em P&D. Aliado a isso temos ainda a demora da patente para ser aprovada, que é de 11 anos, segundo o INPI.

Os países que atualmente lideram em números de depósitos de patentes em biotecnologia marinha são os Estados Unidos, Canadá e Austrália, com 44%, 21% e 10% do total de patentes, segundo a ferramenta de busca WIPO. O Brasil contribui com apenas 0,003% de todas as patentes envolvendo o termo "*marine biotechnology*".

Apesar de os números brasileiros serem alarmantes quando comparados com o cenário mundial, percebe-se um movimento proativo de instituições que buscam melhorar o panorama de pesquisa, desenvolvimento e inovação no contexto brasileiro. Tal fato se evidencia no aumento de depósito de patentes nos últimos anos. Tem-se também o fomento do Ministério da Ciência, Tecnologia (MCTI) para criação dessas instituições, reforçando a importância de mudarmos o paradigma do conhecimento científico em biotecnologia marinha.



**Figura 1.** Fonte: WIPO (2017)

## 4.2 REDES DE PESQUISA E PATENTES EM BIOTECNOLOGIA NO BRASIL

O Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação incentiva o desenvolvimento tecnológico e a inovação em setores estratégicos de aplicação da biotecnologia, como a agropecuária, saúde humana e animal, meio ambiente e industrial, em sintonia com a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia. A biotecnologia integra a base produtiva de diversos setores da economia, os quais representam parte considerável das exportações nacionais, influenciando a demanda por inovações tecnológicas nos principais setores usuários de biotecnologia no país.

A consolidação de redes de pesquisa em biotecnologia no Brasil tem promovido o avanço no desenvolvimento biotecnológico e propicia maior competitividade dos grupos de pesquisa, aumentando significativamente a produção científica e tecnológica e, conseqüentemente, a geração de novas patentes, possibilitando a consolidação gradativa de núcleos de excelência em biotecnologia, transformando os produtos da pesquisa em extensão tecnológica, através do mapeamento e avaliação de potenciais PIs (patentes, cultivares, *softwares*, marcas, desenhos industriais etc.).

O MCTI vem trabalhando para estruturar redes de pesquisa em biotecnologia, tais como a Renorbio – Rede Nordeste de Biotecnologia (Portaria MCTI n.º 598, de 26 de novembro de 2004, e Portaria MCTI n.º 969, de 21 de dezembro de 2011); Bionorte – Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Portaria MCTI n.º 901, de 4 de dezembro de 2008); Pró-Centro-Oeste – Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação (Portaria MCT-MEC n.º 1.038, de 10 de dezembro de 2009); SulBiotec – Associação de Biotecnologia da Região Sul; Bio-otecmar – Rede Nacional de Pesquisa em Biotecnologia Marinha (Chamada MCTI/CNPq/FNDCT – Ação Transversal n.º 63/2013 – Estruturação de uma Rede de Pesquisa em Biotecnologia Ma-

rinha). Redes de pesquisa como essas têm sido concebidas para acelerar o processo de desenvolvimento do Brasil com crescentes projetos em P&D&I, aumentando a produção científica e tecnológica em áreas relacionadas à biotecnologia marinha e inovação, produzindo impacto socioeconômico e melhoria da qualidade de vida. As atividades dessas redes de pesquisa vêm se consolidando gradativamente, ao passo que diversos atores (governo, empresas, indústrias e sociedade) começam a demonstrar interesse na área.

A Rede Nacional de Pesquisa em Biotecnologia Marinha nasceu da união de competências e da enorme articulação entre grupos organizados de pesquisa que já haviam definido protocolos comuns de trabalho e interação de capacidades. Com base nessa premissa, estabeleceu laboratórios estratégicos temáticos visando ao desenvolvimento de pesquisas que ampliam as fronteiras da biotecnologia marinha (<http://www.biotechmar.sage.coppe.ufrj.br/index.php/br/>). A Rede Nacional de Pesquisa em Biotecnologia Marinha desenvolve estudos pioneiros focados na solução de problemas que afetam a sociedade brasileira, visando ao desenvolvimento econômico e social, com responsabilidade ambiental. Parcerias estratégicas com empresas do Brasil e do exterior estão abrindo a possibilidade de desenvolvimento de produtos e processos, visando à produção de divisas para o nosso país, através da bioeconomia marinha. Essa iniciativa está prevista no IX Plano Setorial de Recursos do Mar da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM). O objetivo principal da Rede é desenvolver pesquisas acadêmicas e tecnológicas inovadoras de fronteira nas áreas de biodiversidade, microbiologia, prospecção, genômica, pós-genômica (ômicas), elucidação estrutural e química fina, produção em plantas-piloto de média e larga escalas, análise de sustentabilidade, viabilidade técnica e econômica de produtos e processos, e transferência para o setor produtivo, desenvolvendo assim a bioeconomia marinha.

## REFERÊNCIAS

Brasil. Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior / Instituto Nacional de Propriedade Industrial. **Patentes: História e Futuro**. INPI. DO CAPÍTULO SOBRE O BRASIL, PEDROSA, R. H. Créditos do relatório completo.

Ramos, A.L.S.C.; Guterres, T.M. (2016) Lei de Propriedade Industrial comentada. Ed. Jus Podivm.

Silva, K. et al. (2016) A contribuição do Renorbio para o progresso técnico: análise a partir do indicador de patentes no período 2011-2016. **Cadernos de Prospecção**. 9(4): 428.

Thompson, F.; Krüger, R.; Thompson, C.C.; Berlinck, R.G.; Coutinho, R.; Landell, M.F.; ... Lopes, F.A. (2018). Marine biotechnology in Brazil: recent developments and its potential for innovation. **Frontiers in Marine Science**, 5: 236.



# DESENVOLVIMENTO DE NEGÓCIOS EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

Carla Carvalho da Veiga<sup>a</sup>  
Ricardo Coutinho<sup>b</sup>  
Rogério Valle<sup>a</sup> +

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>b</sup> Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

+ *in memoriam*

## RESUMO

A biotecnologia marinha apresenta-se como um campo inovador de pesquisa em ciência e tecnologia, em que conceitos e técnicas multidisciplinares são aplicados para o processamento de materiais oriundos de agentes biológicos marinhos, com o objetivo de desenvolver produtos ou outros benefícios para a sociedade. Por essa razão, é considerada estratégica no atual contexto econômico brasileiro, em função de seu potencial para atender aos grandes desafios futuros da humanidade, por meio do desenvolvimento de produtos sustentáveis que, em decorrência de suas características e especificidades, demandam a atuação de uma rede de atores, que cumprem papéis encadeados, em diferentes modelos de negócios possíveis. Assim, é importante planejar o modelo de desenvolvimento do negócio, ou seja, sua forma de produção, comercialização e obtenção de retornos financeiros, bem como seus impactos ambientais e sociais, de forma a avaliar e validar sua viabilidade técnica, mercadológica, econômica, ambiental e social. Além disso, o planejamento também deverá avaliar a necessidade e/ou possibilidade de proteção (patente), identificar partes interessadas e parceiros potenciais, mapear o ciclo de vida do produto e sua cadeia de valor (processos produtivos e logísticos), definir requisitos técnicos e custos, projetar o aumento da escala de produção e delinear o crescimento do negócio.

# 1 | BIOTECNOLOGIA MARINHA E O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS

De acordo com a FAO<sup>1</sup>, a biotecnologia pode ser definida como “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica”.

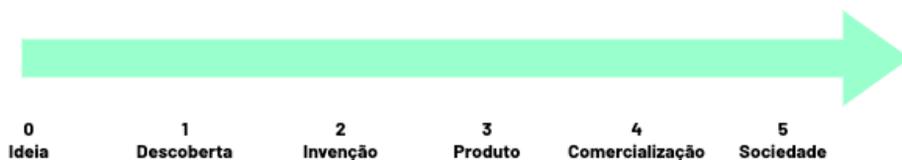
Diversos produtos, processos e serviços de interesse social e econômico têm sido desenvolvidos a partir da biotecnologia, em setores estratégicos como a agropecuária, a saúde humana, a indústria e o meio ambiente.

Seguindo esse conceito, a biotecnologia marinha apresenta-se como um campo inovador de pesquisa em ciência e tecnologia, em que conceitos e técnicas multidisciplinares são aplicados para o processamento de materiais oriundos de agentes biológicos marinhos, com o objetivo de desenvolver produtos ou outros benefícios (drogas viáveis ou organismos geneticamente modificados) para propósitos ambientais ou aquicultura (Brasil, 2010; Sampaio, 2013).

Dessa forma, a biotecnologia marinha está relacionada intimamente ao desenvolvimento de novos produtos, em diversas áreas, tais como aquicultura, microbiologia marinha, biologia molecular de organismos marinhos, genômica, proteômica, metabolômica, algas, invertebrados marinhos, toxinas marinhas e biorremediação do meio ambiente. Entre os vários produtos desenvolvidos na biotecnologia marinha se destacam os fármacos (anti-inflamatórios, antivirais e anticâncer), suplementos alimentares (nutracêuticos), cosméticos, implantes cirúrgicos ortopédicos, nutrientes para aquicultura, tintas anti-incrustantes e biodiesel.

Segundo a European Science Foundation, a biotecnologia marinha apresenta um mercado bastante promissor. Estima-se que os produtos e processos dessa área representem 2,8 bilhões de euros, com um crescimento anual de 4 a 5%, podendo chegar entre 10 e 12% nos próximos anos, o que mostra o potencial e as expectativas de desenvolvimento do setor, em âmbito global.

No entanto, é preciso salientar que, para se chegar a um produto em biotecnologia marinha, é necessário que, além do conhecimento oriundo da pesquisa básica, seja desenvolvido um processo que inicia na ideia, passa pela descoberta, invenção e produção do produto até a comercialização e disponibilização para a sociedade, remetendo-se a uma escala de maturidade tecnológica.



**Figura 1.** Escala de maturidade tecnológica (em fases). Fonte: VEIGA, 2019

<sup>1</sup> Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura.

Essa escala de maturidade demonstra que, para serem consideradas produtos, as descobertas em biotecnologia marinha precisam ser disponibilizadas para a sociedade. Apesar de verificarmos certa variação em relação ao tempo que os diversos produtos de biotecnologia marinha levam para chegar à maturidade, estima-se uma média de 10 anos para que um produto seja comercializado desde a ideia inicial.

A escala de maturidade é corroborada pela legislação brasileira, que diferencia “criação” de “inovação”<sup>2</sup> e estabelece todo um arcabouço jurídico para possibilitar a transferência de tecnologia para a sociedade, através de instituições de apoio, instituições de pesquisa e de financiamento, como será visto posteriormente.

## 2 | BIOTECNOLOGIA MARINHA E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS SUSTENTÁVEIS

A sustentabilidade é um princípio-chave na gestão de recursos naturais. Envolve a eficiência operacional, a minimização dos impactos ambientais e minimização dos impactos socioeconômicos, que atuam de forma interdependente, para garantir que as necessidades atuais sejam atendidas sem comprometer as necessidades futuras (WCED, 1987; Brennan; Owende, 2010).

Nesse contexto, a perspectiva dos pesquisadores é de que a biotecnologia marinha pode gerar produtos que contribuam para enfrentar os desafios iminentes (futuros) da sociedade, quer sejam o crescimento e o envelhecimento da população, as mudanças climáticas, a degradação ambiental e a saúde humana (ESF, 2010).

Por estarem os organismos marinhos em um ecossistema pouco explorado, seu potencial sustentável é ainda elevado quando comparado com os ecossistemas terrestres. Os metabólitos secundários produzidos pelos organismos marinhos são capazes de restaurar habitats marinhos degradados, como recifes de coral e lagoas costeiras, pois podem restabelecer as funções ecológicas de ambientes transformados, de forma que estes se assemelhem ao estado natural, anterior às perturbações (biorremediação). Além disso, as algas, por serem eficientes na captura de CO<sub>2</sub>, podem ser utilizadas no tratamento de águas residuais industriais e na produção de biodiesel, dado que esses organismos apresentam alto rendimento (por hectare de biomassa), ampla disponibilidade, concorrência ausente (ou muito reduzida) com terras agrícolas de alta qualidade, além de não conter enxofre, não ser tóxico e ser altamente biodegradável.

As tecnologias da biotecnologia marinha também são capazes de identificar doenças

<sup>2</sup> De acordo com a Lei nº 10.973/2004, conhecida como Lei de Inovação, são distintos os conceitos de criação, que remete às invenções, e de inovação, vinculado ao ambiente produtivo, ou seja, à comercialização:

“Criação: invenção, modelo de utilidade, desenho industrial, programa de computador, topografia de circuito integrado, nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada e qualquer outro desenvolvimento tecnológico que acarrete ou possa acarretar o surgimento de novo produto, processo ou aperfeiçoamento incremental obtido por um ou mais criadores”.  
 “Inovação: introdução de novidade ou aperfeiçoamento no ambiente produtivo ou social que resulte em novos produtos, processos ou serviços”.

emergentes de animais marinhos, para proteger a pesca e outros recursos biológicos, além de fornecer diagnósticos rápidos que garantem a segurança dos recursos alimentícios advindos de atividades de aquicultura e maricultura, tais como a identificação de micróbios patogênicos em tecidos de ostras, como *Vibrio* e *Salmonella*.

No Brasil, a biotecnologia marinha tem sido proposta como uma área estratégica pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), que tem promovido a pesquisa para o aproveitamento sustentável do potencial biotecnológico dos organismos marinhos e a exploração do potencial pesqueiro e aquícultor das zonas costeiras e de transição das áreas marítimas, visando ao desenvolvimento de conhecimentos, absorção de tecnologias e promoção da inovação nas áreas de saúde humana, ambiental, agropecuária e industrial.

Dessa forma, a biotecnologia marinha apresenta-se como uma área de conhecimento capaz de gerar uma diversidade de produtos sustentáveis, tais como alimentos e energia, biomateriais e produtos para a saúde humana, tecnologias para aumentar a produção e/ou minimizar os impactos ambientais, de forma a contribuir para o equilíbrio ambiental e social e para a recuperação e crescimento das economias dos países.

### 3

## A ESTRUTURA JURÍDICA BRASILEIRA E OS MODELOS DE NEGÓCIOS PARA DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS SUSTENTÁVEIS

Para incentivar o desenvolvimento de novas tecnologias e, conseqüentemente, novos produtos sustentáveis, o Governo Brasileiro criou o Sistema Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação (SNCTI), buscando abranger todos os atores que interagem nessa rede e definir suas atuações.

O SNCTI é formado por ministérios, agências reguladoras, secretarias, conselhos, associações, agências de fomento, inventores, pesquisadores, universidades, institutos de pesquisa, fundações de apoio, núcleos de inovação tecnológica (NITs), incubadoras, parques tecnológicos, investidores, empresas privadas, *startups*, *spinoffs* e o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), que interagem nas diversas fases de planejamento, viabilização e desenvolvimento.

Nesse sistema, o nível político é responsável pela definição das diretrizes estratégicas e pela elaboração e aprovação da legislação e dos investimentos. As agências de fomento, no segundo nível, são responsáveis pela viabilização das decisões tomadas no nível político, disponibilizando os recursos; enquanto os operadores, no terceiro nível, são os responsáveis pela execução das atividades planejadas, através do desenvolvimento da invenção, produção e comercialização da inovação.

O sistema conta ainda com a Embrapii (Associação Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial), qualificada como uma Organização Social pelo Poder Público Federal, e responsável pela exploração das sinergias entre instituições de pesquisa tecnológica e empresas industriais, através do compartilhamento de risco na fase pré-competitiva, a fim de fortalecer a



**Figura 2.** Sistema Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação. Fonte: ENCTI, 2016

capacidade de inovação das empresas brasileiras tanto no mercado interno como no mercado internacional.

Além disso, o chamado novo marco regulatório<sup>3</sup> incentiva as atividades de pesquisa científica e a cooperação entre universidades, laboratórios de pesquisa, governos e empresas, através da isenção e redução de impostos para importação de insumos nas empresas do setor, da ampliação do tempo máximo que os pesquisadores poderão dedicar a projetos de pesquisa e extensão, da permissão de contratação direta de encomendas tecnológicas por parte do Poder Público, e da utilização do regime diferenciado de contratações para licitações e contratos necessários à realização das ações em órgãos e entidades dedicados a CT&I.

Para que a tecnologia saia da universidade e/ou dos laboratórios de pesquisa e chegue à sociedade, vários modelos de desenvolvimento e negócios podem ser utilizados.

A seguir, são descritos alguns possíveis modelos.

### 3.1 SPINOFFS

*Spinoffs*<sup>4</sup> são empresas geradas para comercializar produtos originados de invenções desenvolvidas por grupos de pesquisas, inicialmente financiados pelas agências de fomento. Em outras palavras, são Empresas de Base Tecnológica (EBTs) criadas por pesquisadores acadêmicos (Morais; Mattos; Gastal, 2006).

<sup>3</sup> Lei n.º 13.243, de 11 de janeiro de 2016, e Emenda Constitucional n.º 85/2015.

<sup>4</sup> As spinoffs também podem ser geradas por grupos formados dentro de uma empresa. As chamadas spinoffs empresariais separam-se da empresa que lhes deu origem e passam a atuar no mercado de forma independente. No entanto, as spinoffs acadêmicas são mais comuns no campo de biotecnologia marinha.

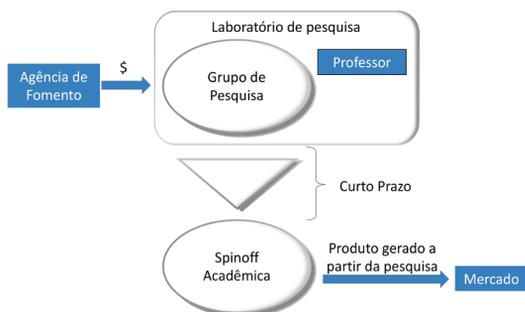


Figura 3. Modelo de negócio das spinoffs.

Nesse caminho, os pesquisadores, normalmente bolsistas, desenvolvem uma ideia, com acompanhamento de um orientador (professor ou pesquisador), até chegar a um produto. Ao perceber o potencial do produto, criam uma empresa, na qual o orientador poderá ser um dos acionistas (mas não poderá ter função técnica ou administrativa, uma vez que possui vínculo de dedicação exclusiva com a instituição de pesquisa), e desenvolvem todas as atividades necessárias para introduzir o produto no mercado e disponibilizá-lo para a sociedade.

### 3.2 STARTUPS

Startups são empresas criadas para comercializar um produto inovador ou, de acordo com a definição clássica do termo, para atuar com base em um modelo de negócio de base tecnológica, inovador, que seja replicável e escalável.

Dentro das universidades e instituições de pesquisa, o desenvolvimento de startups pode ser fomentado e apoiado pelas incubadoras de empresas. Nesses casos, as incubadoras abrem processos seletivos, em que os grupos de pesquisadores, inventores ou alunos se inscrevem para que suas ideias, invenções, produtos ou serviços possam ser avaliados e selecionados para o programa de incubação<sup>5</sup>. Uma vez selecionados, esses grupos recebem apoio das incubadoras, que oferecem capacitação, suporte operacional e uma estrutura compartilhada,

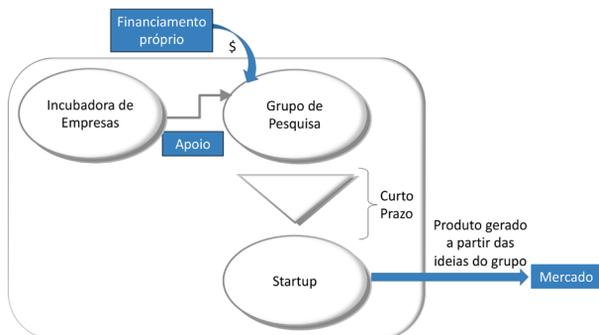


Figura 4. Modelo de negócio das startups.

<sup>4</sup> Spinoffs também podem participar do processo de seleção.

para facilitar a criação, instalação e manutenção dessas novas empresas, chamadas startups, que poderão utilizar tal estrutura por um período preestabelecido, que é o tempo de incubação.

Após a incubação, as empresas, já maduras e estabelecidas (desenvolvidas e denominadas “graduadas”), passam a atuar no mercado por conta própria.<sup>5</sup>

### 3.3 INVENTORES

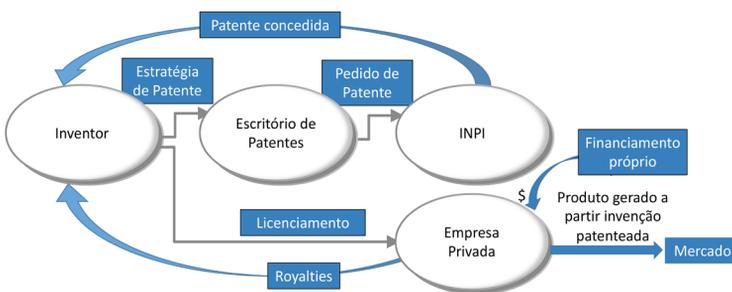
Os inventores, isto é, aqueles que desenvolvem uma invenção, podem ou não ser pesquisadores vinculados a universidades e instituições de pesquisa, e suas invenções podem ou não ser patenteadas.

A patente confere ao seu titular o direito de impedir terceiros, sem o seu consentimento, de produzir, usar, colocar à venda, vender ou importar tanto os produtos objeto das patentes, quanto os produtos obtidos diretamente por processo patenteadado.

No Brasil, a Lei 9.279, de 14 de maio de 1996, regula os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial, assegurando ao autor da invenção ou modelo de utilidade o direito de obter a patente que lhe garanta a propriedade pelo prazo de 20 anos, no caso de invenções, e 15 anos, no caso de modelo de utilidade, contados da data de depósito, ou seja, da data da solicitação do pedido de patente.

O pedido de patente deve ser realizado no INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial, podendo também ser requerido junto a outros institutos de propriedade industrial internacionais, de acordo com a estratégia de negócio do produto.

Algumas empresas denominadas “escritórios de patentes” mantêm especialistas em registro de patentes em seu quadro funcional e são contratadas para assessorar os inventores na chamada “estratégia de patente”, que é a estratégia que irá definir de que forma a patente será registrada e em quais países pretende-se impedir a produção do produto da patente. A lei também assegura ao inventor o direito de ceder ou celebrar contrato de licença de exploração da invenção, o chamado licenciamento, caso seja do interesse dele. O inventor pode ou não requerer o apoio do INPI para ofertar tais licenças ao mercado.



**Figura 5.** Modelo de negócio dos inventores.

<sup>5</sup> No caso da Incubadora de Empresas COPPE/UFRJ, o prazo é de até três anos, prorrogável por mais dois ciclos de um ano cada.

No caso de invenções desenvolvidas dentro das universidades ou institutos de pesquisa, o modelo de negócio apresenta algumas diferenças, como pode ser observado no item “Acordos de Licenciamento e Transferência de Tecnologia”.

### 3.4 ACORDOS DE LICENCIAMENTO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA

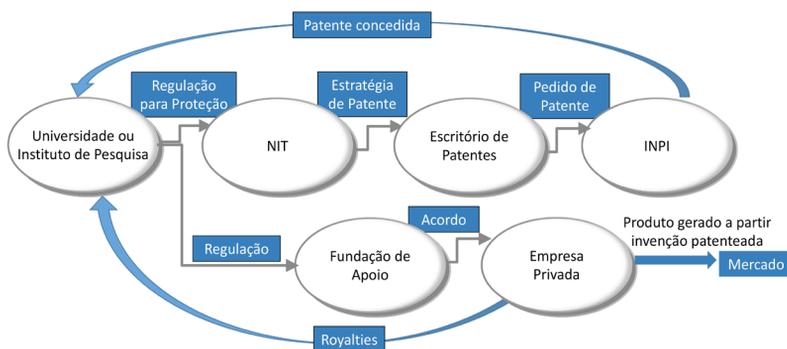
Para as invenções oriundas de universidades e institutos de pesquisa, que são realizadas a partir de recursos destinados pelo Governo, a legislação assegura a propriedade da patente à instituição (ICT) e garante ao pesquisador o registro como inventor.

Nesse caso, o inventor ou grupo de pesquisa acadêmico deve apresentar a invenção ao NIT (Núcleo de Inovação Tecnológica), vinculado à universidade ou instituto de pesquisa. Os NITs, mais conhecidos nas universidades como agências de inovação, são os órgãos responsáveis pelo requerimento da patente junto ao INPI, em nome da universidade.

Em geral, os NITs contratam um escritório de patentes para elaborar a estratégia e conduzir o processo de busca de anterioridade e elaboração de toda a documentação necessária para o pedido e registro de patente.

Uma vez registrada a patente - ou em processo de registro, o grupo de pesquisa, em conjunto ou não com o NIT e as fundações de apoio, pode realizar o licenciamento da patente, permitindo, assim, sua produção e comercialização por uma empresa privada, que, de acordo com o contrato, deverá pagar *royalties* à universidade e ao inventor, na proporção estabelecida no registro da patente.

Caso não seja possível ou estratégico registrar a patente, mas ainda assim o produto seja inovador e interessante, as instituições de pesquisa podem buscar empresas interessadas em negociar a transferência dessa tecnologia, que, assim como no caso do licenciamento, poderão produzir e comercializar o produto, mediante pagamento de *royalties* à universidade e ao inventor.

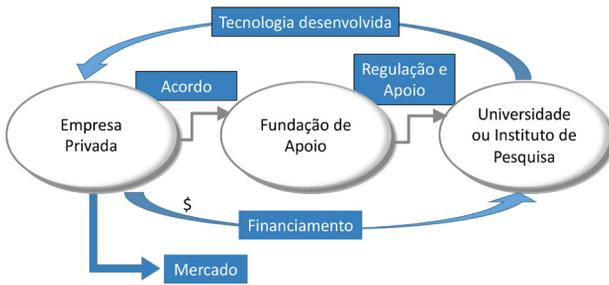


**Figura 6.** Modelo de negócio de licenciamento e transferência de tecnologia.

### 3.5 ACORDOS DE DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA

Neste modelo, as empresas privadas identificam uma oportunidade de desenvolvimento de um produto e contratam as universidades ou institutos de pesquisa para desenvolver uma parte ou toda a invenção que será a base do produto, utilizando instrumentos de convênio<sup>6</sup> ou contrato de serviço.

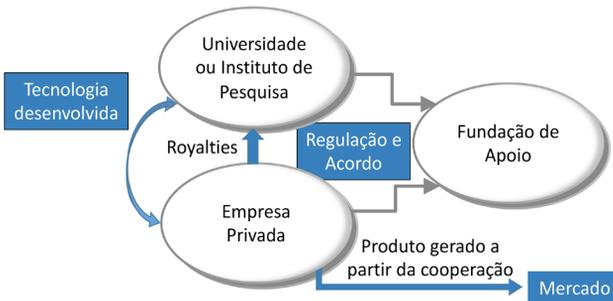
A patente, caso exista, pode ser de propriedade da empresa ou compartilhada entre a empresa e a instituição, de acordo com a negociação realizada. Para garantir os interesses e o cumprimento das normas internas da instituição de pesquisa, a negociação deverá ser facilitada e gerenciada pelas fundações de apoio, com suporte do NIT.



**Figura 7.** Modelo de negócio de desenvolvimento de tecnologia pelas universidades e institutos de pesquisa.

### 3.6 ACORDOS DE COOPERAÇÃO PARA DESENVOLVIMENTO

Nesse modelo, empresa privada e instituições de pesquisa e/ou universidades decidem realizar o desenvolvimento em conjunto de um produto. De modo semelhante ao que ocorre nos acordos de desenvolvimento tecnológico (contratos de serviço ou convênio), a patente será compartilhada entre a empresa e a instituição e a negociação deverá ser facilitada pelas fundações de apoio.



**Figura 8.** Modelo de negócio de cooperação para desenvolvimento.

<sup>6</sup> No caso de empresas públicas.

### 3.7 EMPRESA PRIVADA

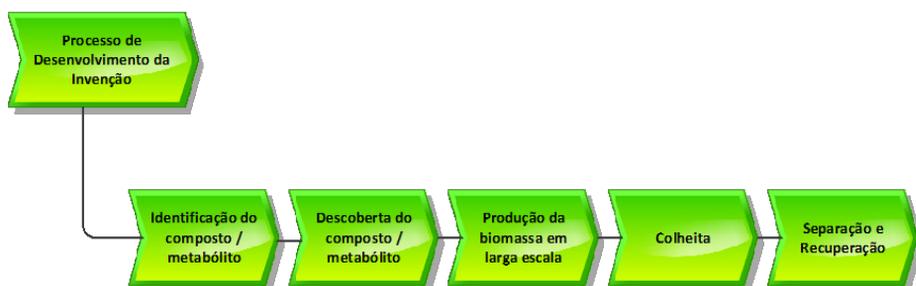
Existe ainda o modelo de desenvolvimento de produtos interno, no qual a própria empresa desenvolve a invenção, registra a patente no INPI, desenvolve o produto, produz e comercializa. Esse modelo, que Chesbrough (2012) chama de inovação fechada, normalmente é desenvolvido a partir da interação entre departamentos da empresa, com recursos próprios.

## 4 | PROCESSOS DE DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

Um processo pode ser definido como um encadeamento de atividades inter-relacionadas ou interativas, executadas dentro de uma organização, que transformem entradas (insumos) em saídas (produtos) (Valle; Costa, 2009).

Nesse contexto, os processos necessários para o desenvolvimento do produto diferem, de acordo com os objetivos dos atores, ou seja, podemos considerar a existência de tantos processos quantos forem os atores. Em geral, para a biotecnologia marinha, podemos considerar: um processo de desenvolvimento da invenção, executado pelos inventores, institutos de pesquisa e universidades; um processo de obtenção e registro de patente, a ser realizado em conjunto pelos NITs, escritórios de patentes privados e o INPI; um processo de elaboração e gestão do acordo de licenciamento, de responsabilidade dos NITs; um processo de elaboração e gestão jurídica dos acordos de desenvolvimento de tecnologia, cooperação para desenvolvimento e transferência de tecnologia, de responsabilidade das fundações de apoio; e um processo de produção e comercialização, executado pela empresa privada licenciada ou com tecnologia transferida.

O processo de desenvolvimento de uma invenção tem início com a identificação de um composto/metabólito desejável a partir de um organismo marinho que produza tal composto. Em seguida ocorre o desenvolvimento do processo de produção em larga escala (*upgrade*), a colheita (obtenção) do composto e a separação e recuperação, em caso de compostos cultivados.



**Figura 9.** Processo de desenvolvimento da invenção.

Após o término do processo de invenção, inicia-se o processo de obtenção e registro de patente, que engloba as atividades de depósito, publicação, exame e concessão. Para agilizar

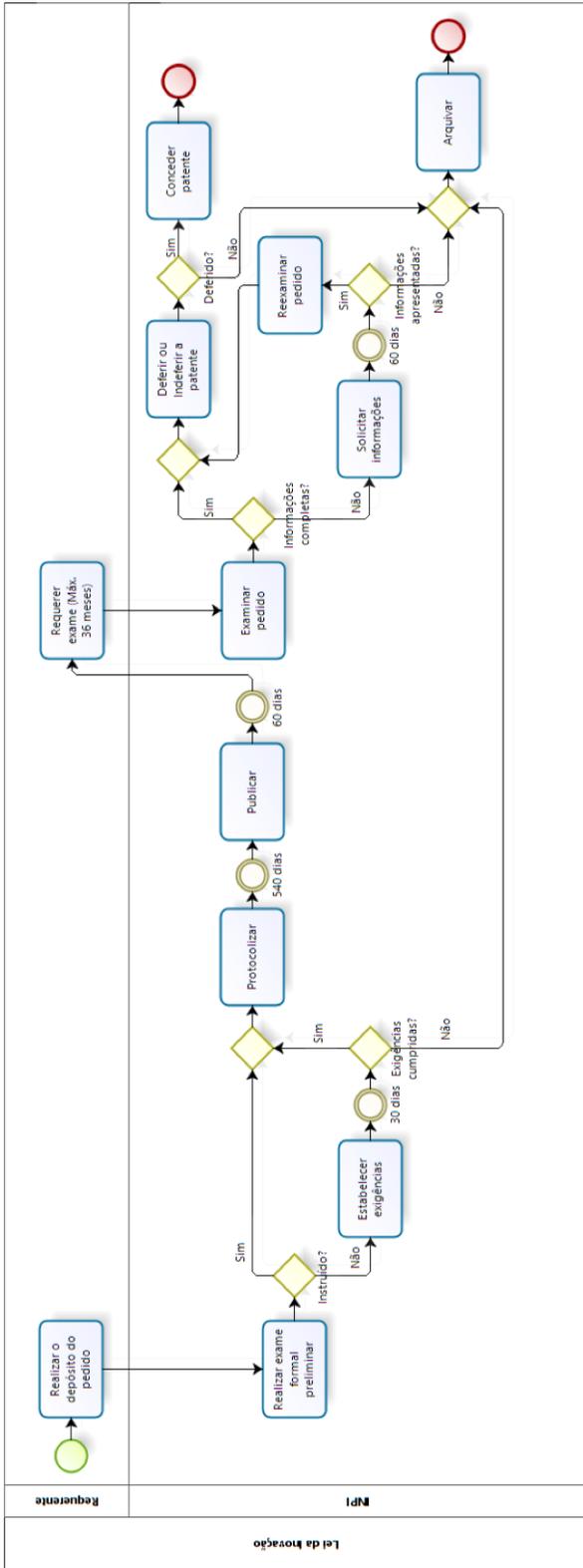
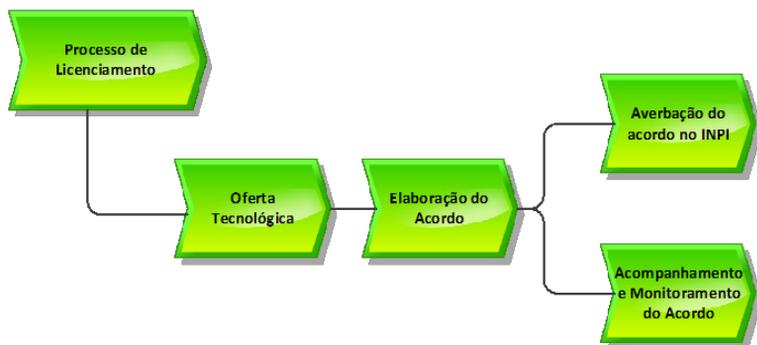


Figura 10. Mapeamento do processo de obtenção de patentes. Fonte: Veiga, 2019.

esse processo, normalmente é contratado um escritório de patente privado, pelas instituições envolvidas e/ou pelos inventores.

Por ser um processo longo, pouco conhecido e de grande importância para os inventores, é apresentado de forma detalhada na Figura 10, na página ao lado.

Já o processo de licenciamento, que ocorre após a obtenção da patente, engloba a oferta tecnológica<sup>7</sup>, em caso de licença exclusiva, a elaboração do acordo de licenciamento, a averbação no INPI e o acompanhamento e o monitoramento jurídico do acordo.



**Figura 11.** Processo de licenciamento.

O processo de elaboração e gestão dos contratos de serviço ou convênios para desenvolvimento de tecnologia, acordos de cooperação para desenvolvimento e transferência de tecnologia engloba a elaboração dos termos de sigilo, a negociação dos termos do acordo, garantindo o cumprimento da legislação e das normas da instituição de pesquisa, a elaboração do documento de acordo entre as partes e o acompanhamento e monitoramento jurídico do acordo.



**Figura 12.** Processo de contratos e convênios.

O processo de produção e comercialização engloba a aquisição dos insumos e maquinário necessários à produção, a produção em escala, a comercialização (venda e faturamento), o transporte, a entrega e a gestão do negócio.

<sup>7</sup> O Decreto 9.823/2018 permite a modalidade de negociação direta e dispensa a realização de licitação para licenciamento exclusivo, mediante publicação de extrato de oferta tecnológica.



**Figura 13.** Processo de produção e comercialização.

## 5

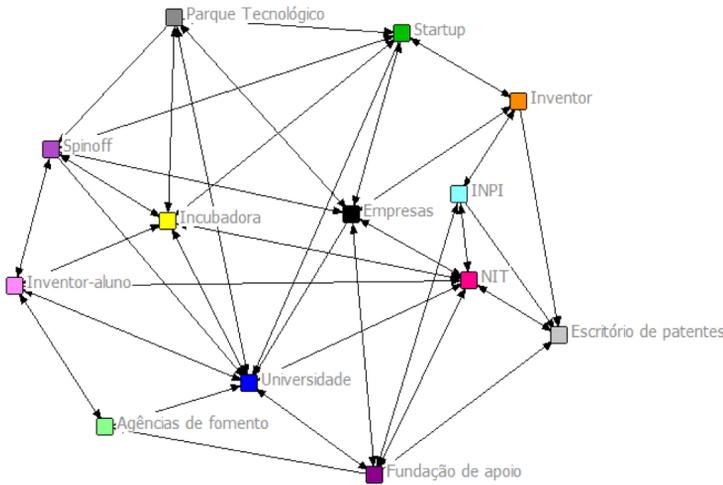
### O PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS SUSTENTÁVEIS (PDPS) PARA A BIOTECNOLOGIA MARINHA

Ao verificarmos os modelos de negócio e os processos de desenvolvimento que envolvem a biotecnologia marinha, podemos constatar a existência de vários atores, interagindo em uma rede de relacionamentos, com diferentes objetivos, culturas, linguagens e necessidades. Uma visualização da interação entre os atores que atuam na rede de relacionamentos de inovação em biotecnologia marinha pode ser analisada na Figura 14, que demonstra, através das ligações e setas, com quem cada ator se comunica, ou estabelece relações de financiamento, apoio, contratação, negociação ou parceria.

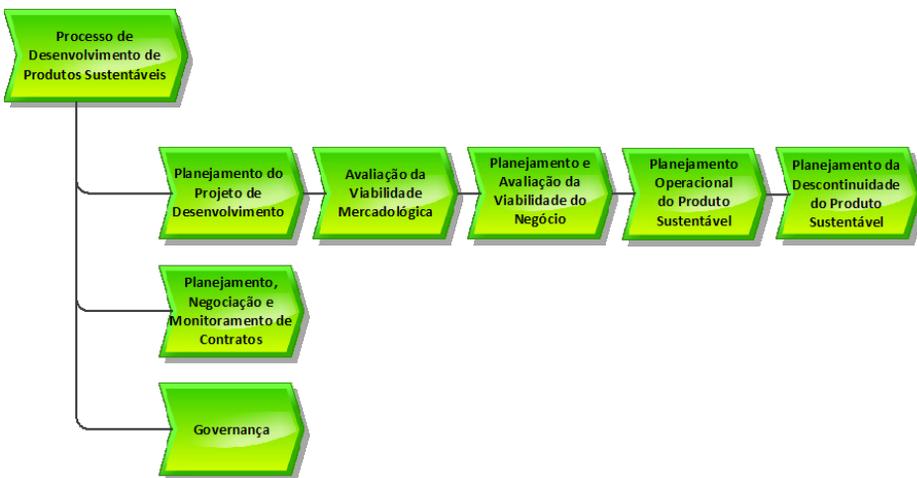
Por conta de tantas diferenças, existe o risco de que os modelos de negócio existentes não sejam desenvolvidos, ou seja, que as invenções e/ou criações não cheguem ao mercado, e tornem-se conhecimento público, ao serem descritas nos artigos publicados em revistas indexadas, o que podemos denominar de "desperdício de descobertas tecnológicas" (Morais et al., 2006).

Nesse cenário, o Processo de Desenvolvimento de Produtos Sustentáveis (PDPS) para a biotecnologia marinha busca complementar os demais processos, englobando de forma coerente e sistemática algumas atividades-chave para facilitar a comunicação e o relacionamento entre os atores da rede, aumentando assim a possibilidade de desenvolvimento de negócios.

O processo, delineado para ser executado nos diferentes modelos de negócio da área, engloba o planejamento do projeto de desenvolvimento; a avaliação da viabilidade mercadológica; o planejamento e avaliação da viabilidade do negócio; o planejamento operacional do produto sustentável; o planejamento da descontinuidade do produto sustentável; o planejamento, negociação e monitoramento de contratos, no que tange à aderência às atividades planejadas e à qualidade dos acordos firmados; e a governança dos processos e dos relacionamentos.



**Figura 14.** Visualização da interação em rede dos atores que atuam em inovação em biotecnologia marinha. Fonte: Veiga, 2019.



**Figura 15.** Processo de Desenvolvimento de Produtos Sustentáveis para Biotecnologia Marinha. Fonte: VEIGA, 2019.

### 5.1 PLANEJAMENTO DO PROJETO DE DESENVOLVIMENTO

O planejamento do projeto de desenvolvimento baseia-se em um levantamento detalhado de todas as informações disponíveis até o momento, que irão embasar as atividades subsequentes de todo o PDPS. Dessa forma, o PDPS pode ser utilizado para o desenvolvimento de produtos a partir de diferentes pontos da escala de maturidade tecnológica.

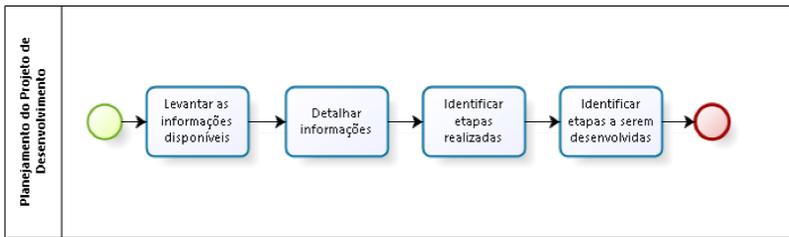


Figura 16. Planejamento do projeto de desenvolvimento.

### 5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE MERCADOLÓGICA

A avaliação da viabilidade mercadológica é o processo que avalia o potencial estratégico da invenção, do ponto de vista do mercado, ou seja, avalia a viabilidade de comercialização do produto a ser desenvolvido, no qual são detalhadas as demandas do mercado, como por exemplo, as quantidades demandadas pelo produto, o crescimento do mercado nos últimos anos, o crescimento estimado e as tendências para o futuro. Além disso, são identificados clientes potenciais e reunidas informações sobre os produtos disponíveis (concorrentes, substitutos e complementares), assim como seus posicionamentos (preço, qualidade ou nicho de mercado), seus desempenhos e as tecnologias utilizadas.

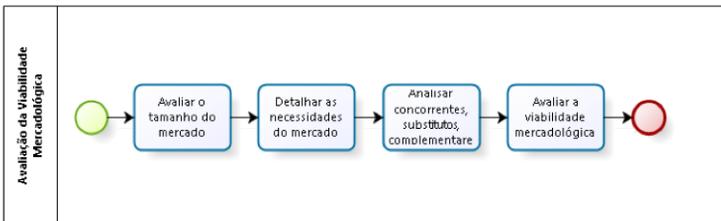


Figura 17. Processo de avaliação da viabilidade mercadológica.

### 5.3 PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO NEGÓCIO

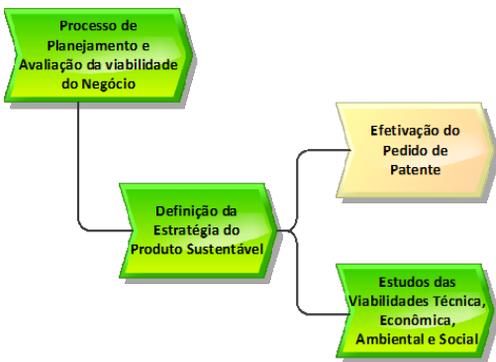
O planejamento e avaliação da viabilidade do negócio corresponde ao planejamento do produto sustentável e seu modelo de comercialização. Engloba a definição da estratégia, através das atividades de identificação da possibilidade de proteção (obtenção de patente); identificação dos *stakeholders* (partes interessadas) envolvidos e parceiros potenciais; mapeamento do ciclo de vida do produto; definição dos requisitos técnicos para a produção e comercialização do produto; mapeamento da cadeia de valor (macroprocessos e processos de produção e comercialização); e identificação dos diferenciais e fatores críticos de sucesso. Engloba também a realização dos estudos de viabilidade técnica, econômica, ambiental e social (EVTEAS).

A viabilidade técnica do produto é analisada a partir da avaliação da tecnologia utilizada e suas formas de produção, além da avaliação da tecnologia e produção dos possíveis fornecedores.

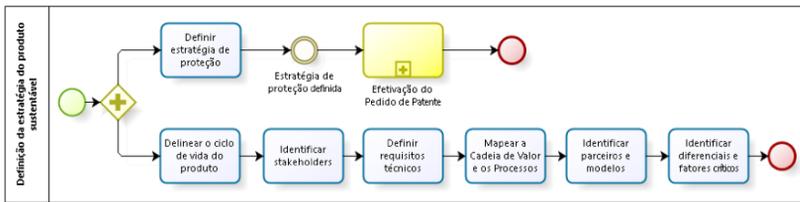
A viabilidade econômica estima os custos com pesquisa e desenvolvimento, os investimentos em testes, produção e comercialização.

A viabilidade ambiental estima os impactos ambientais decorrentes da produção e comercialização, tais como consumo de energia, água ou outros recursos naturais, infraestrutura para utilização dos produtos, reparos, manutenções e descarte.

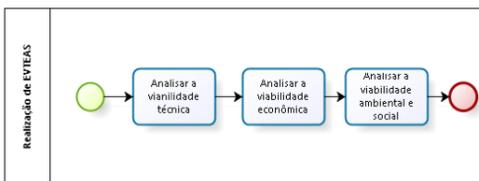
A viabilidade social estima os impactos sociais, tais como geração de emprego e renda, impacto do uso indevido dos produtos, possibilidade de remoção de comunidades locais, práticas de responsabilidade social dos possíveis fornecedores e parceiros.



**Figura 18.** Processo de planejamento e avaliação da viabilidade do negócio.



**Figura 19.** Processo de definição da estratégia do produto sustentável.



**Figura 20.** Processo de realização de EVTEAS.

### 5.4 PLANEJAMENTO OPERACIONAL DO PRODUTO SUSTENTÁVEL

O planejamento operacional do produto sustentável é o processo no qual são elaborados os planos operacionais, de *marketing* e financeiro do produto, além da análise de sensibilidade. O plano operacional define a arquitetura para a produção, analisa as necessidades de aquisições, planeja o processo de manufatura, identifica os fornecedores e *lead times* (tempo

de processo). O plano de *marketing* define e projeta a embalagem e o material de suporte para o produto, planeja o lançamento, o processo de distribuição, vendas e assistência técnica ou pós-venda. O plano financeiro estima o fluxo de caixa (investimento, custos, despesas e faturamento previstos); analisa os indicadores financeiros, prazo de retorno sobre o investimento (*payback*) e taxa interna de retorno (TIR). A análise de sensibilidade reanalisa o plano financeiro, em cenário pessimista, realista e otimista.

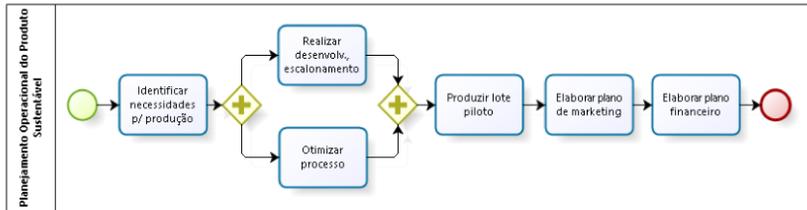


Figura 21. Processo de planejamento operacional do produto sustentável.

### 5.5 PLANEJAMENTO, NEGOCIAÇÃO E MONITORAMENTO DE CONTRATOS

O processo de planejamento, negociação e monitoramento de contratos planeja os tipos de acordos que podem ser negociados e suas cláusulas estratégicas, levando em consideração o tipo e a estratégia do produto, além da estrutura jurídica brasileira. Acompanha a elaboração, elabora e/ou aprova o contrato, além de gerenciar o cumprimento das cláusulas acordadas.

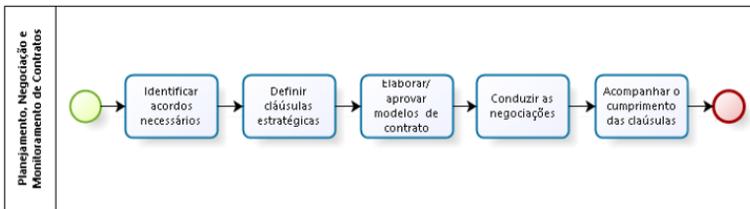
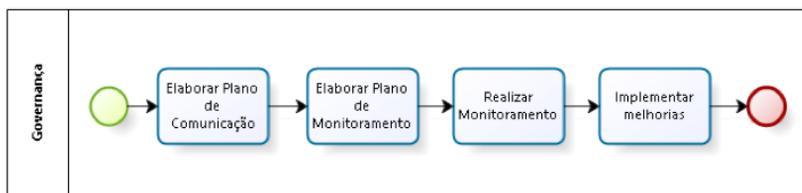


Figura 22. Processo de planejamento, negociação e monitoramento de contratos.

### 5.6 GOVERNANÇA DO PROCESSO

A governança apoia os demais processos. É o processo que define as interações entre os envolvidos, através da elaboração do plano de comunicação, que estabelece as responsabilidades, definindo quem deve ser comunicado, quem deve aprovar e quem deve opinar em cada uma das atividades e decisões. Também se ocupa do plano de monitoramento, no qual serão avaliados e aprovados o cumprimento das atividades planejadas em todo o processo e os resultados obtidos segundo os critérios estabelecidos. A partir dos resultados do monitoramento, implementa melhorias e/ou ações corretivas e documenta as decisões tomadas e as lições aprendidas. Define os indicadores do negócio, com a periodicidade de monitoramento, o

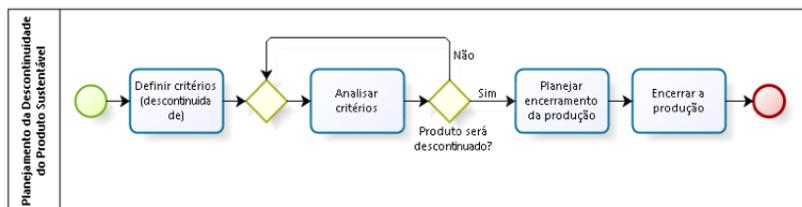
cálculo exato a ser utilizado e a divulgação aos interessados, de acordo com o plano de comunicação.



**Figura 23.** Processo de governança.

### 5.7 PLANEJAMENTO DA DESCONTINUIDADE DO PRODUTO SUSTENTÁVEL

A descontinuidade do produto sustentável é o planejamento de retirada do produto do mercado, a partir do estudo do seu ciclo de vida. A descontinuidade ocorre quando o produto não apresenta mais vantagens econômicas, tais como volume de vendas e margem de lucro, e/ou estratégicas, como participação no mercado, imagem e marca. A descontinuidade do produto deve considerar as questões ambientais, como retorno dos produtos à empresa para destinação final (reutilização, remanufatura, reciclagem ou descarte), encerramento da produção e encerramento das atividades de pós-venda, garantindo a minimização dos impactos nos canais de distribuição e venda.



**Figura 24.** Processo de planejamento da descontinuidade do produto sustentável.

### 5.8 ADERÊNCIA DO PDPS AOS MODELOS DE NEGÓCIO DE BIOTECNOLOGIA MARINHA

A *spinoff*, por ser uma empresa criada por pesquisadores acadêmicos que percebem uma oportunidade de produto a partir de invenções já desenvolvidas, poderá ter resultados mais efetivos ao utilizar o PDPS, principalmente ao utilizar os processos de avaliação da viabilidade mercadológica e o planejamento e avaliação da viabilidade do negócio. O processo de planejamento, negociação e monitoramento de contratos não será aplicável, uma vez que não existirão acordos com outros atores.

A *startup* pode ou não ter um produto desenvolvido com outros atores e, portanto, pode ou não assinar acordos. Nos casos em que não existam acordos, não será necessário executar o processo de planejamento, negociação e monitoramento de contratos.

No caso do inventor que, em geral, já terá passado pela etapa de desenvolvimento

da invenção e poderá possuir uma patente, o PDPS será importante para transformar sua invenção em produto e assinar acordos com outras partes, uma vez que, se não há acordo, ele mesmo terá que criar uma startup (e nem sempre essa é a intenção dos inventores).

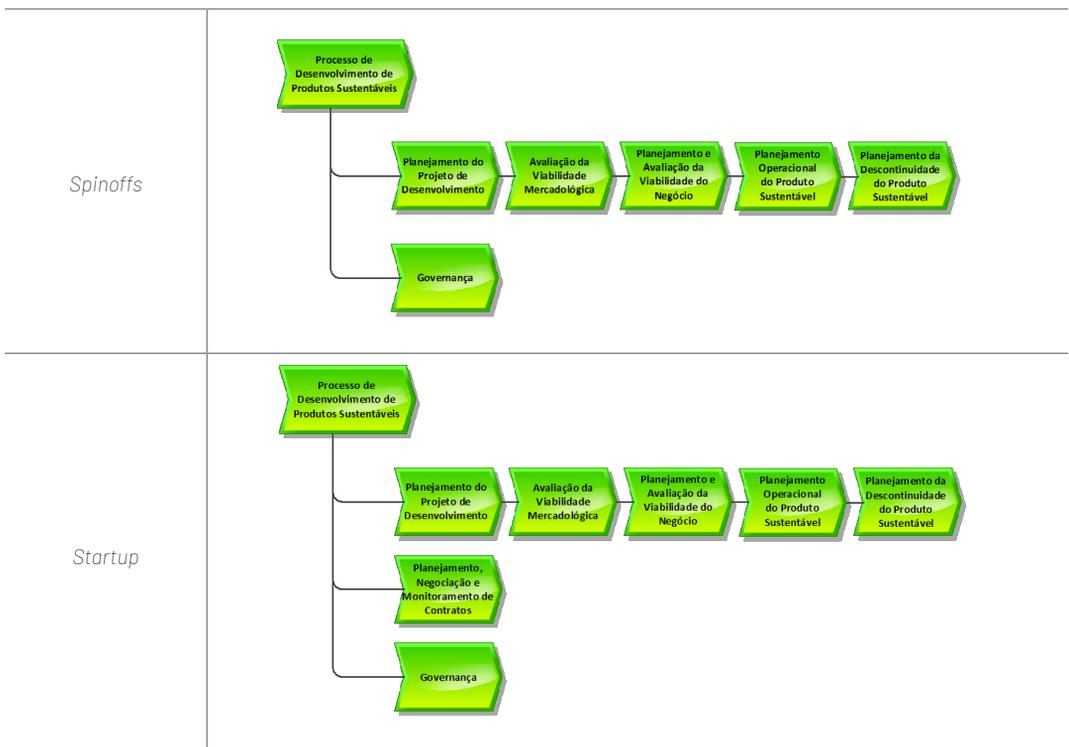
No modelo de licenciamento e transferência de tecnologia pressupõe-se que já existam invenções desenvolvidas e patenteadas. No entanto, grupos de pesquisa que tenham interesse em desenvolver invenções que realmente se tornem produtos podem desenvolver todas as fases do PDPS, identificando inicialmente o mercado, planejando o desenvolvimento da invenção e o tipo de modelo de negócio a ser utilizado.

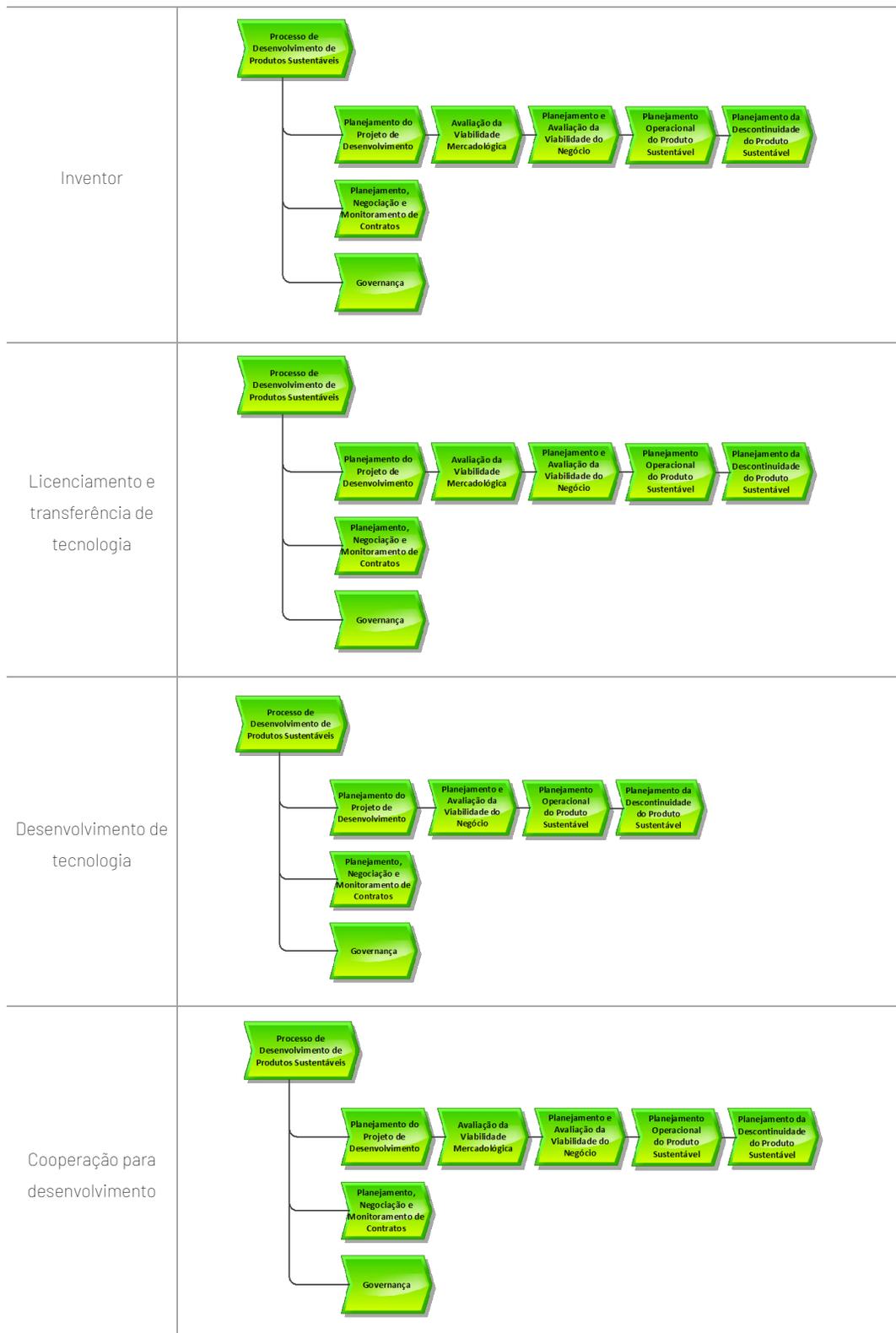
No desenvolvimento da tecnologia, a avaliação da viabilidade mercadológica já foi realizada, considerando que foi a partir dessa análise que a oportunidade de um novo produto surgiu. Dessa forma, esse processo não será necessário.

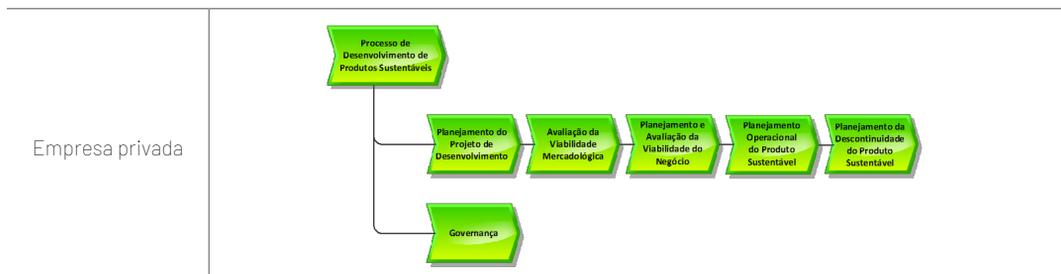
No modelo de cooperação para o desenvolvimento, todos os processos serão realizados. No caso da empresa privada, não será necessário o processo de planejamento, negociação e monitoramento de contratos, considerando que esta não tem acordos com outros atores.

O Processo de Desenvolvimento de Produtos Sustentáveis pode ser gerido por um dos atores já atuando na rede ou por um novo ator, que exerça um papel intermediário, facilitando a comunicação, a interação e a busca de objetivos em comum entre os atores.

**Tabela 1.** Aderência dos modelos de negócio ao PDPS de biotecnologia marinha.







### BOX 1: Estudo de caso da astaxantina

Olaizola (2003), em seu artigo *Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace*, apresenta o processo de desenvolvimento do produto astaxantina, o primeiro composto de alto valor desenvolvido pela Mera Pharmaceuticals. Embora as etapas de estudo apresentadas pelo autor não tenham sido executadas a partir do Processo de Desenvolvimento de Produtos Sustentáveis aqui sugerido, podemos verificar que algumas atividades pertencentes ao PDPS foram realizadas, mesmo de forma desestruturada.

Para contextualizar o estudo, Olaizola comenta que a empresa estava conduzindo dois programas de desenvolvimento. O primeiro, através de um acordo de transferência de tecnologia, tinha o objetivo de desenvolver novos fármacos a partir de uma coleção de mais de 2000 variedades de cianobactérias descobertas pela Universidade do Havá, as quais já haviam produzido mais de 100 moléculas bioativas. O programa pretendia utilizar técnicas de biocatálise enzimática para multiplicar o número de compostos principais, assim como produzir novos compostos que pudessem oferecer maior potência, com menor toxicidade e que fossem desconhecidos (ou seja, patenteáveis).

O segundo programa tinha o objetivo não apenas de identificar novos compostos, mas também de produzi-los em larga escala, a fim de obter material suficiente para descobertas, testes e testes clínicos. Esse programa tinha o patrocínio do Departamento de Energia dos Estados Unidos para um consórcio formado pela empresa Physical Sciences Inc., pelo Hawaii Natural Energy Institute e pela Mera Pharmaceuticals, para estudar a utilização da fotossíntese de microalgas, convertendo CO<sub>2</sub> em outros componentes de alto valor comercial, nas indústrias de carvão.

A ideia era viabilizar economicamente o processo de sequestros de carbono nas indústrias de carvão a partir da utilização de microalgas que produzissem compostos de alto valor, de forma que, combinados os compostos e os sequestros de carbono, seria possível baixar o custo efetivo do processo como um todo.

Nesse sentido, o primeiro produto de alto valor produzido pela Mera foi a biomassa de *Haematococcus*, para a produção de astaxantina. Nesse produto, foi possível identificar a realização de uma avaliação da viabilidade mercadológica, ainda que incompleta, representada pelo levantamento do histórico do *Haematococcus*, que engloba aspectos mercadológicos.

Segundo Olaizola, o *Haematococcus* foi identificado inicialmente nas décadas de 1980 e 1990 como um organismo que podia ser cultivado como uma rica fonte de astaxantina. Durante alguns anos, diversas empresas tentaram estabelecer operações para suprir o mercado com astaxantina natural, sem

sucesso.

Nos anos de 1990, as características antioxidantes da molécula da astaxantina tornaram-se bem definidas. Vários estudos *in vitro* e em animais demonstraram os benefícios da astaxantina para o tratamento e prevenção de doenças. Essas descobertas abriram a possibilidade para um novo mercado para a astaxantina do *Haematococcus*: o mercado de suplementos nutricionais humanos.

O tamanho do mercado de suplemento nutricional de astaxantina, na época, era provavelmente menor que alguns milhões de dólares. Entretanto, estimava-se que a capacidade de produção corrente fosse de pelo menos US\$ 40-50 milhões (no varejo), apenas no Havá (Cyanotech, Mera Pharmaceuticals e MicroGaia). Dessa forma, a indústria deveria estar preparada para um rápido crescimento.

No entanto, os maiores produtores de astaxantina não a produziam a partir do *Haematococcus*, nem a partir de outra forma natural, mas por meio de sínteses químicas (BASF e Hoffman-La Roche).

Nessa época, o maior consumidor da astaxantina era a indústria de alimentação de salmão. Ocorre que, quando produzida sinteticamente, a astaxantina possui diferenças no percentual de estereoisômeros, em relação à astaxantina natural. No caso do salmão, que não é capaz de modificar a configuração química dessa molécula, é possível detectar se o peixe foi alimentado com astaxantina natural ou sintética. Olaizola também apresentou atividades relacionadas ao planejamento e avaliação da viabilidade do negócio, caracterizadas basicamente pela definição estratégica do produto sustentável. Nessa atividade, buscaram-se duas estratégias para reduzir os custos de produção, considerando que o preço é sempre um fator de aceitação do consumidor: (i) melhoria na tecnologia de produção da biomassa de *Haematococcus*, com aumento do conteúdo de astaxantina (qualquer melhoria no conteúdo da astaxantina representaria uma redução direta de custo); e (ii) redução de custos de produção através da expansão da capacidade de produção para locais com custos de terra, trabalho e energia mais baixos, como a China, por exemplo.

Além disso, o autor apresentou atividades relacionadas com estudos de viabilidade técnica e econômica, deixando claro que a utilização da astaxantina sintética pela indústria ocorre em função do custo. No momento do estudo, o preço de mercado da astaxantina era de aproximadamente US\$2.000,00/kg, de forma que o custo estimado de produção deveria estar próximo a US\$1.000,00/kg. Para tornar-se competitiva, a produção da biomassa de *Haematococcus* precisaria ter um custo abaixo de US\$30,00/kg e produzir 3% de astaxantina, para que, adicionados os outros custos de produção, o custo final ainda fosse mais baixo que o custo da astaxantina sintética. Naquele momento ainda não tinha sido possível atingir esse custo. Por outro lado, o preço no varejo da classe de suplementos nutricionais de astaxantina era maior que US\$100.000/kg, o que justificaria o maior custo de produção da astaxantina natural.

Os pesquisadores acreditavam que com a otimização de tecnologias (acúmulo de 10% de astaxantina na biomassa) e a transferência da produção para locais de menor custo (como a China), poderiam ser atingidos custos mais competitivos.

Atividades relacionadas aos estudos de viabilidade ambiental e social foram apresentadas através da hipótese de que, no futuro, a astaxantina natural tenha melhor aceitação pelos consumidores do que a sintética. O autor acreditava que, embora à época do estudo os consumidores não estivessem dispostos a pagar um preço maior por um salmão naturalmente pigmentado, esse cenário poderia ser modificado, uma vez que os consumidores tivessem consciência de que a grande maioria do salmão hoje consumido é originada de cativeiro e que sua pigmentação é atingida a partir de dietas compostas por produtos sintéticos.

Uma vez que fosse criada uma pequena demanda por pigmentação natural ou que surgissem legislações em favor dos produtos naturais, a astaxantina da biomassa poderia competir não apenas por preço, como já ocorreu em outros mercados<sup>8</sup> (tais como o de alimentação de carpas, frangos e dourados vermelhos, que por causa da deposição de pigmentos em seus tecidos, estão sujeitos a alguns requisitos legais, de forma que a astaxantina natural é preferida à sintética).

Atividades relacionadas ao plano de *marketing* foram apresentadas pelo autor, que constatou que muitos consumidores ainda permaneciam sem informação sobre a astaxantina, que poucos entendiam os importantes benefícios que a astaxantina poderia trazer para a sua vida e muitos nunca haviam ouvido falar dela. Portanto, o mercado ainda era muito pequeno.

Nesse sentido, caberia aos produtores criar uma maior conscientização do produto na sociedade. Apesar de requerer um significativo investimento, os pesquisadores acreditavam que as campanhas de conscientização pudessem aumentar a demanda e superar a capacidade de produção atual.

O autor apresenta ainda análises importantes para a elaboração de um plano operacional futuro, informando que a biomassa de *Haematococcus* para a produção de astaxantina tem a capacidade de gerar células grandes e fortes durante as fases de carotenogênese e encistamento.

Nesse contexto, esclarece que tanto as esferas de moagem quanto os homogeneizadores de alta pressão haviam sido utilizados com sucesso na quebra das células da microalga, melhorando a recuperação da astaxantina do *Haematococcus* em escala comercial, mas outros métodos também seriam possíveis. O uso de solventes e enzimas poderia melhorar a quebra das células e a recuperação do produto, apesar do cuidado necessário na utilização desses métodos, caso o produto fosse direcionado para o consumo humano.

Além disso, a ausência de água na biomassa melhora a recuperação de componentes lipídicos solúveis, como a astaxantina e  $\beta$ -caroteno. No caso de compostos sensíveis ao calor, como a astaxantina, os produtores desenvolveram tecnologias que limitavam a exposição da astaxantina a condições que pudessem lhe causar degradação (como altas temperaturas e oxigênio).

Seguindo a desidratação, a astaxantina era recuperada a partir da biomassa utilizando extração de CO<sub>2</sub> supercrítico ou técnicas de extração com óleo. Os produtores de astaxantina não viam a necessidade purificar a astaxantina do extrato obtido.

Seca, a astaxantina do *Haematococcus* poderia ser prensada em comprimidos. Entretanto, nessa forma era facilmente degradada pela oxidação. Os produtores da astaxantina tentaram suspender a biomassa de *Haematococcus* em óleos comestíveis, esperando que o óleo pudesse criar uma barreira entre o oxigênio atmosférico e a biomassa rica. A Cyanotech (<http://www.cyanotech.com>) tentou suspensões em óleo de alecrim, mas verificou que a astaxantina ficou muito instável. Acreditava-se que partículas secas suspensas em óleo poderiam gerar vazamentos nas cápsulas gelatinosas, resultando em um produto inaceitável para o consumidor.

A solução para esses problemas foi o desenvolvimento de metodologias de extração que utilizam solventes não petroquímicos. Para aplicações humanas, o uso de solventes petroquímicos poderia criar preocupações de saúde ou aceitação, devido aos possíveis resíduos no produto final.

Por fim, a governança necessária ao processo de desenvolvimento do produto é citada pelo autor

<sup>8</sup> Nota: Mercados ainda muito pequenos para que as empresas possam se interessar em produzir e comercializar a astaxantina natural.

através de duas atividades: (i) a implementação de melhorias e ações corretivas, indicada pelo desenvolvimento de um método próprio de extração a óleo no qual óleos comestíveis seriam utilizados como solventes para a extração e, alternativamente, extrações de CO<sub>2</sub> supercrítico poderiam ser utilizadas para produzir um óleo de resina rico em astaxantina que seria então diluído em óleo comestível para a concentração apropriada para encapsulação; e (ii) o registro de lições aprendidas, em que declara que a astaxantina produzida a partir do *Haematococcus* ainda não atingiu todo o seu potencial, por causa de erros cometidos por seus produtores.

Completa o autor indicando que esses erros ou lições aprendidas são sintetizados em: (i) projeções de custo demasiadamente otimista; (ii) falta de pesquisas de mercado; (iii) atitude otimista, de produção empurrada, na qual basta produzir e a demanda será criada; (iv) falta de recursos para conscientização dos consumidores, através de estudos que demonstrem a segurança e eficácia do produto, afirmando que apesar de os produtores de biotecnologia microalgal estarem convencidos do grande potencial da área, eles tiveram pouco sucesso em justificar seu otimismo.

Em suma, este estudo de caso mostra que mesmo não seguindo um processo estruturado de desenvolvimento de produto, a empresa Mera e os produtores de biotecnologia microalgal perceberam a necessidade de entender minimamente o mercado, planejar o negócio e o *marketing*, identificar possibilidades operacionais, garantir a viabilidade técnica, econômica, ambiental e social, implementar melhorias e registrar lições aprendidas. Tais necessidades corroboram a necessidade da utilização do modelo de PDPS sugerido, para facilitar o trajeto do produto ao mercado e à sociedade.

## REFERÊNCIAS

Brasil (2015) **Emenda Constitucional n. 85, de 26 de fevereiro de 2015**. Altera e adiciona dispositivos na Constituição Federal para atualizar o tratamento das atividades de ciência, tecnologia e inovação. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Constituicao/Emendas/Emc/emc85.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Emendas/Emc/emc85.htm)>. Acesso em: 13 maio 2016.

Brasil (2004) **Lei n. 10.973, de 2 de dezembro de 2004**. Dispõe sobre incentivos à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/lei/l10.973.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/lei/l10.973.htm)>. Acesso em: 15 mar. 2016.

Brasil (2016) **Lei n. 13.243, de 11 de janeiro de 2016**. Dispõe sobre estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação e altera a Lei n. 10.973, de 2 de dezembro de 2004, a Lei n. 6.815, de 19 de agosto de 1980, a Lei n. 8.666, de 21 de junho de 1993, a Lei n. 12.462, de 4 de agosto de 2011, a Lei n. 8.745, de 9 de dezembro de 1993, a Lei n. 8.958, de 20 de dezembro de 1994, a Lei n. 8.010, de 29 de março de 1990, a Lei n. 8.032, de 12 de abril de 1990, e a Lei n. 12.772, de 28 de dezembro de 2012, nos termos da Emenda Constitucional n. 85, de 26 de fevereiro de 2015. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2016/Lei/L13243.htm#art2](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13243.htm#art2)>. Acesso em: 13 maio 2016.

Brasil (1996) **Lei n. 9.279, de 14 de maio de 1996**. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L9279.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9279.htm)>. Acesso em: 15 mar. 2016.

Brasil (2010) Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecno-

logia. **Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil**. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília, 2010.

Brennan, L.; Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 14(2): 557-577.

Chesbrough, H. (2012) **Inovação aberta: como criar e lucrar com a tecnologia**. Porto Alegre: Bookman.  
European Science Foundation (ESF)(2010) Marine biotechnology. A New Vision and Strategy for Europe. **Marine Board-ESF Position Paper 15**.

Ministério Da Ciência, Tecnologia E Inovação (2016) **Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação 2016-2019**. Disponível em: <<http://www.mcti.gov.br/>>. Acesso em: 10 maio 2016.

Morais, E.; Mattos, J.; Gastal, C. (2006) **Mecanismos de inovação e competitividade**. Movimento Brasil Competitivo. Brasília.

Olaizola, M. (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**. 20: 459-466.

Rozenfeld, H. et al. (2006) **Gestão de desenvolvimento de produtos: uma referência para a melhoria do processo**. São Paulo: Saraiva. p. 542.

Sampaio, A. (2013) **Aplicações biotecnológicas de substâncias bioativas de organismos marinhos: progressos realizados e novas fronteiras**. Disponível em: <<http://www.blogdolibs.com/2013/07/aplicacoes-biotecnologicas-de.html>> Acesso em: 02 fev. 2017.

Valle, R.; Costa, M. (2009) **Introdução**. In: **Análise e modelagem de processos de negócio: foco na notação BPMN (Business Process Modeling Notation)**. São Paulo: Atlas.

Veiga, C. (2019) **Da invenção à inovação: um processo de desenvolvimento de produtos sustentáveis para a biotecnologia marinha**. Tese de Doutorado. UFRJ, COPPE, Rio de Janeiro.

World Commission On Environment And Development (WCED)(1987) **Our Common Future**. Disponível em: <<http://www.un-documents.net/our-common-future.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2017.



# AVALIAÇÃO DO CICLO DE VIDA

Ana Carolina Maia Angelo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal Fluminense

## RESUMO

Este capítulo apresenta uma das melhores ferramentas quantitativas para avaliação do desempenho ambiental de produtos, serviços e modelos de negócio: a Avaliação do Ciclo de Vida (ACV). Por considerar a visão do ciclo de vida, isto é, a visão holística do sistema produtivo de um produto que vai desde a extração dos recursos naturais, produção, distribuição, consumo até a disposição final na forma de resíduo, a ACV é considerada uma poderosa ferramenta de apoio à decisão, pois possibilita identificar e quantificar os potenciais impactos ambientais associados a cada estágio do ciclo de vida do produto. Com crescente aplicação em biotecnologia marinha, a ACV tem sido usada não só para comparar produtos e sistemas produtivos a fim de identificar as melhores opções em termos ambientais, mas também para identificar e quantificar as cargas ambientais positivas e negativas em cada estágio do ciclo de vida.

# 1 | O QUE É ACV?

A Avaliação do Ciclo de Vida (ACV) é uma ferramenta de apoio à decisão usada para avaliar o desempenho ambiental de um produto, processo ou serviço, considerando as emissões e recursos consumidos em todas as fases do ciclo de vida. Também conhecida como *metodologia do berço ao túmulo*, a ACV compila e avalia as entradas, saídas e potenciais impactos ambientais de um produto<sup>1</sup> através do seu ciclo de vida, buscando quantificar todos os fluxos de massa e energia envolvidos desde a extração das matérias-primas, passando pela produção e distribuição, até chegar ao consumo e disposição final (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de Vida do produto.

A ACV pode ser aplicada para gerenciamento e preservação dos recursos naturais, identificação dos pontos críticos (*hot spots*) de processo, otimização de sistemas produtivos, desenvolvimento produtos sustentáveis (*ecodesign*), definição de parâmetros para rotulagem ambiental<sup>2</sup>, para identificar as consequências ambientais de um produto ou os *trade-offs* ambientais e como suporte à construção de políticas públicas.

Existem duas abordagens para a modelagem de ACV: atribucional e consequencial. Por apresentar metodologia já consolidada e padronizada, a ACV atribucional é a mais utilizada e preocupa-se em responder o que é preferencial em termos de melhor desempenho ambiental (ex.: na comparação de produtos), onde o sistema modelado reflete o passado, o presente ou o futuro, porém sempre baseada em fatos com incerteza conhecida. Já a ACV consequencial é

<sup>1</sup> Para fins de simplificação, sempre quando aparecer a palavra “produto”, significa um bem material, processo ou serviço (ABNT NBR ISO 14040:2009).

<sup>2</sup> A ACV é obrigatória na Declaração Ambiental de Produto (DAP) – rotulagem tipo III.

considerada uma abordagem orientada ao efeito ou à mudança. Ainda em discussão no meio acadêmico, essa abordagem tem como objetivo identificar as consequências ambientais de uma decisão considerando, portanto, os efeitos indiretos. Muito mais complexa que a atribucional, a modelagem da ACV consequential baseia-se em mecanismos de mercado, alterações políticas, comportamento de consumidores e identificação de processos marginais (ex.: qual mudança pode ocorrer caso haja aumento do nível de determinado produto?).

## 2 | HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DA ACV

A ideia da ACV surgiu no final da década de 60 e princípios da década de 70, a partir de um estudo encomendado pela Coca-Cola Company com o objetivo de analisar diferentes tipos de embalagens de refrigerante em termos de emissões e utilização de recursos. A partir de então, mesmo com diversas abordagens e terminologias<sup>3</sup>, a ACV passou a ser empregada por diversas empresas para avaliação dos impactos ambientais na comparação de produtos, principalmente embalagens (Guinée et al., 2011). Na década de 90, ocorreu um grande desenvolvimento metodológico da ACV, em termos de busca por uma abordagem consensual teórica da ferramenta, incentivado pela Society for Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Em 1997, foi publicada a primeira norma ISO<sup>4</sup> de ACV – a ISO 14040. A década de 90 ficou conhecida, portanto, como a década da padronização da ACV. A partir dos anos 2000 até a presente data, observa-se o aumento da importância da ACV, marcada pelo crescente número de publicações científicas e promoção do conceito do Ciclo de Vida em âmbito global pela *Life Cycle Initiative*<sup>5</sup>.

Uma breve pesquisa em uma das plataformas de pesquisa científica mais utilizadas no mundo – *Science Direct* – evidencia o aumento da importância dessa ferramenta no meio acadêmico. Em 2001, eram apenas 547 artigos científicos com o termo ACV. Já em 2016, esse número ultrapassava a marca dos 3880 artigos. Diversos fatores podem justificar o aumento do interesse pela ACV, tanto por parte de pesquisadores e acadêmicos, quanto por parte de empresas e governos: aumento da preocupação e consciência ambiental da sociedade em geral; uso da ACV na avaliação de impactos ambientais não comerciais de políticas públicas, principalmente em países da União Europeia – por exemplo, na Alemanha, a ACV é utilizada para orientar cotas obrigatórias de reuso e reciclagem de resíduos; reconhecimento, por parte das empresas, de que a ACV é umas das melhores ferramentas de apoio à tomada de decisão no que diz respeito à avaliação de potenciais impactos ambientais de produtos, auxiliando na escolha de materiais, tecnologias, no próprio *design* de produto e na identificação de oportunidades de melhoria em toda a cadeia de valor.

No Brasil, as primeiras ações relacionadas à ferramenta se deram a partir da criação de

<sup>3</sup> Resource and Environmental Profile Analysis (REPA), Ecobalances, etc.

<sup>4</sup> International Standardization Organization.

<sup>5</sup> Surgiu em 2002 a partir da parceria entre a UNEP (ou PNUMA em português) e SETAC.

um subcomitê específico sobre ACV em 1994. Mas foi só no final da década de 90 que se teve o primeiro estudo de avaliação de impactos ambientais por meio da metodologia de ACV, chamado de Análise do Ciclo de Vida de Embalagens para o Mercado Brasileiro. Em 2001, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) editou a primeira versão da norma ISO 14040, e em 2002 foi criada a Associação Brasileira de Ciclo de Vida (ABCV), cujo principal objetivo é difundir e consolidar a Gestão do Ciclo de Vida no país. A partir daí, a ACV ganhou cada vez mais notoriedade no contexto nacional. Em 2004, a ACV foi considerada questão estratégica para a avaliação de conformidade para o Programa Brasileiro de Conformidade (PBAC); em 2006, iniciou-se o projeto Inventário do Ciclo de Vida para a competitividade Ambiental da Indústria Brasileira – SICV Brasil; em 2010, foi criado o Programa Brasileiro de Avaliação do Ciclo de Vida (PBACV), com a finalidade de apoiar o desenvolvimento sustentável e a competitividade ambiental da produção industrial brasileira; em 2012, foi criada a Rede Empresarial Brasileira de ACV, das quais participam empresas como a Braskem, Embraer, Danone, Natura, Grupo Boticário, Tetra Pak e Oxiteno.

### 3 | METODOLOGIA DE ACV

A ACV é padronizada internacionalmente pelas normas ISO 14040:2006 e 14044:2006, que determinam a estrutura, os princípios, os requisitos e as diretrizes que devem ser seguidos na elaboração de um estudo de ACV. No Brasil, a normatização da ACV é feita pela ABNT, com a publicação da versão traduzida das normas internacionais. Assim, segundo as normas ABNT NBR ISO 14040:2009 e 14044:2009, a estrutura da ACV divide-se em quatro fases iterativas: definição de objetivo e escopo, inventário do ciclo de vida (ICV), avaliação de impacto do ciclo de vida (AICV) e interpretação (Figura 2). A natureza iterativa da ACV se dá em função do processo de refinamento do objetivo e escopo à medida que se avança nas fases subsequentes, uma vez que a maior disponibilidade de informações permite que sejam feitas verificações de integridade, sensibilidade e consistência.



**Figura 2.** Fases da ACV. Fonte: ABNT, 2009.

#### 3.1 DEFINIÇÃO DE OBJETIVO E ESCOPO

A definição do objetivo e escopo é decisiva para todas as demais fases da ACV, pois é a etapa em que são definidos os itens cruciais para o estudo e que permitirão uma correta interpretação dos resultados. A definição do objetivo consiste na declaração da aplicação pretendida do estudo, das limitações, pressupostos e cobertura de impacto, das razões para a realização do estudo, o contexto decisório e o público-alvo.

A aplicação pretendida refere-se à determinação da finalidade do estudo, ou seja, se a ACV será realizada para a comparação de produtos ou serviços, análise de pontos críticos para identificação de oportunidades de melhoria, apoio à formulação de políticas públicas, *ecodesign*, *marketing*, avaliar as consequências e *trade-offs* ambientais de um produto ou rotulagem ambiental<sup>6</sup>. Uma vez declarada a aplicação pretendida, deve-se definir as limitações, pressupostos e cobertura de impacto considerada no estudo. Comumente, estudos de ACV podem ser aplicados com limitação relacionada à cobertura de impacto, como exemplo os estudos de Pegada de Carbono, que consideram apenas emissões de gases associadas à categoria de impacto Mudanças Climáticas, e os estudos de Pegada Hídrica, que está relacionada ao consumo de água. As razões para realização do estudo, o contexto decisório e a definição do público-alvo são fundamentais para indicar as ambições em termos de qualidade dos dados, a necessidade de revisão crítica e qual abordagem de ACV utilizar – se atribucional ou consequential. Por exemplo, se a decisão analisada sobre a escolha de qual material (X ou Y) para ser usado em determinado produto resultar na necessidade de uma quantidade adicional de material a ser produzida, deve-se adotar a abordagem consequential.

A elaboração do escopo de estudo de ACV deve considerar a definição clara de diversos itens, como: a fronteira do sistema e o sistema de produto a ser estudado, a função do produto, a unidade funcional (UF) e fluxo de referência, tratamento de processos multifuncionais, método de avaliação de impacto e categorias de impacto analisadas, requisitos de qualidade dos dados. Cada item do escopo é detalhado a seguir.

### 3.1.1 FRONTEIRA DO SISTEMA E SISTEMA DE PRODUTO

A fronteira do sistema determina quais estágios do ciclo de vida serão considerados no estudo de ACV, e o sistema de produto determina o conjunto de processos, conectados material e energeticamente, incluídos na fronteira do sistema. Embora a metodologia de ACV seja do berço ao túmulo, a fronteira do sistema pode considerar partes do ciclo de vida do(s) produto(s) analisado(s): do berço ao portão, portão ao portão, portão ao túmulo, túmulo – para o caso de análise de sistemas de tratamento de resíduos (Figura 3). É importante salientar que se deve considerar, sempre que possível, todo o ciclo de vida do produto. A exclusão de estágios do ciclo de vida na fronteira do sistema deve ser justificada e só é permitida se não afetar de forma significativa os resultados da ACV. Na comparação entre embalagens de refrigerante (garrafa PET 1 L x garrafa vidro 1 L), a comparação do berço ao portão é inválida, visto que ambas possuem diferentes implicações de transporte e diferentes métodos de reciclagem, que devem ser incluídos na fronteira do sistema para proporcionar um suporte decisório adequado.

<sup>6</sup> A ACV é obrigatória para rotulagem ambiental tipo III – DAP (Declaração Ambiental de Produto).

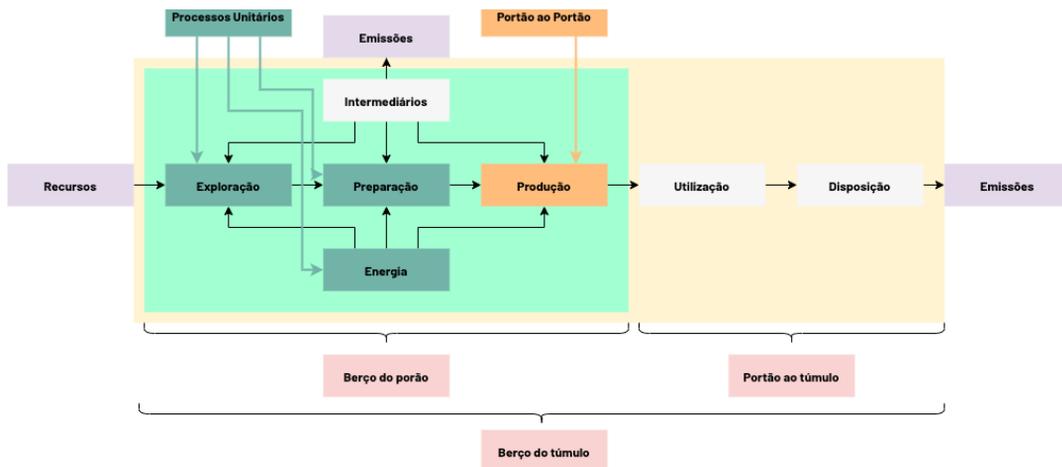


Figura 3. Exemplos de Fronteira do Sistema.

### 3.1.2 FUNÇÃO, UNIDADE FUNCIONAL E FLUXO DE REFERÊNCIA

A função está relacionada aos requisitos necessários para o produto, processo ou serviço, ou seja, às características de desempenho do sistema modelado no estudo de ACV. Em estudos comparativos, só é possível comparar o desempenho ambiental de produtos que desempenham a mesma função (ex. copo descartável e copo de vidro, copinho descartável e xícara de café, sabão líquido e sabão em pó, garrafa PET e garrafa de vidro, latinha de alumínio e garrafa PET, metrô e ônibus, etc.). A quantificação dessa função identificada é chamada de Unidade Funcional (UF). Dos elementos definidos na primeira fase da ACV, a tarefa crucial está na escolha da UF, pois ela deve ser relevante para o sistema estudado e permitir uma comparação<sup>7</sup> justa entre os produtos analisados (em caso de ACV comparativa). A UF é a quantificação dos aspectos qualitativos e quantitativos da função identificada, respondendo às seguintes perguntas: o quê?, quanto?, quão bem? e por quanto tempo?. Na comparação de duas tintas para revestimento externo, a UF deve estar relacionada com a função dos produtos analisados, i.e., cobertura de uma determinada área de parede externa, visto que cada tinta possui qualidade, rendimento e durabilidade diferentes. Nesse caso, a UF mais adequada na comparação das duas tintas é "cobrir 1 m<sup>2</sup> de parede externa por 10 anos".

O fluxo de referência é a quantidade de produto necessária para cumprir a UF, ou seja, é o fluxo ao qual todos os demais fluxos de entradas (insumos) e saídas devem estar quantitativamente relacionados. No exemplo da comparação de duas tintas (A e B), considerando que a tinta A, em lata de 18L, possui supercobertura com rendimento de 380m<sup>2</sup> por demão e durabilidade de cinco anos; e a tinta B, em galão de 3,6L, rende até 75m<sup>2</sup> com necessidade de três demãos e possui uma fórmula com silicone que cria uma película com proteção prolongada que garante uma durabilidade de 10 anos, o fluxo de referência para a tinta A é 0,095L e para a tinta B é

<sup>7</sup> Comparações entre materiais diferentes com base na massa (ex. 1kg de vidro x 1kg de plástico) são irrelevantes e enganosas, visto que tais materiais compõem uma gama de produtos com diversos potenciais impactos ambientais.

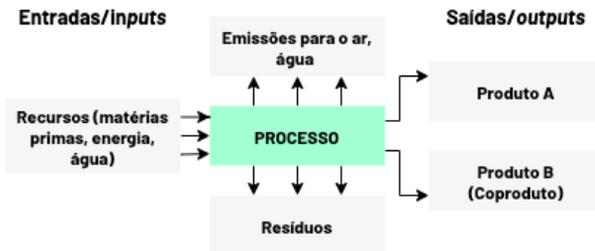
0,144L, conforme mostrado abaixo.

Fluxo Ref. TINTA A =  $0,047L/m^2 * 1 \text{ demão} * 2 \text{ aplicações em 10 anos} = 0,095L$

Fluxo Ref. TINTA B =  $0,048L/m^2 * 3 \text{ demãos} * 1 \text{ aplicações em 10 anos} = 0,144L$

### 3.1.3 TRATAMENTO DOS PROCESSOS MULTIFUNCIONAIS

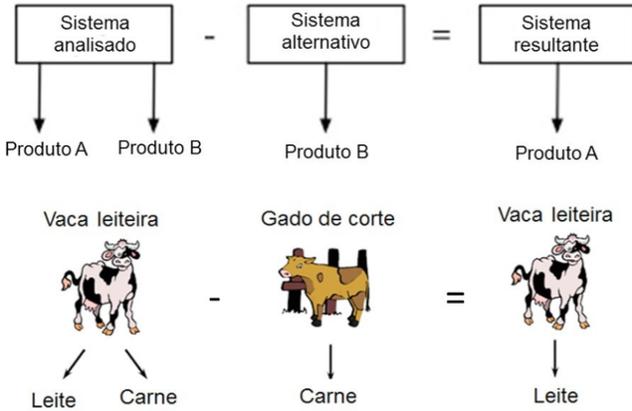
Os processos multifuncionais são aqueles que apresentam múltiplas saídas, i.e., múltiplos produtos (Figura 4). Existem três abordagens para resolver o problema da multifuncionalidade: subdivisão dos processos multifuncionais, expansão do sistema e alocação ou particionamento. A escolha da abordagem deve ser clara e dependerá do objetivo do estudo de ACV, dos dados e informações disponíveis. A subdivisão dos processos multifuncionais, como o próprio nome diz, consiste na subdivisão desses processos até chegar aos processos monofuncionais (um único produto como saída). A expansão do sistema é um procedimento um pouco mais complexo, pois pode significar a inclusão de outra função não fornecida para tornar o sistema comparável ou a subtração de uma ou mais funções não necessárias. Como exemplo, a quantificação das cargas ambientais do leite de vaca também leva em conta as cargas ambientais da carne, uma vez que a carne é produto da vaca leiteira ao final de sua “vida útil”. Mas como desassociar as cargas ambientais da carne desse processo? É necessária a inclusão das cargas ambientais apenas do gado de corte para posterior subtração ao sistema do gado leiteiro (Figura 5). Por fim, tem-se o procedimento de alocação, em que as entradas e saídas são alocadas entre os produtos segundo critérios de alocação. Segundo a ISO 14040:2006, a alocação deve ser evitada em função da grande subjetividade nela contida. Entretanto, caso não seja possível resolver o problema da multifuncionalidade pelas duas abordagens anteriores, a alocação pode ser feita pela relação física (ex.: alocação por massa), relação econômica (ex.: preço de mercado) ou relação baseada em outras propriedades (ex.: teor energético).



**Figura 4.** Exemplo de processo multifuncional.

### 3.1.4 CATEGORIAS DE IMPACTO E MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE IMPACTO

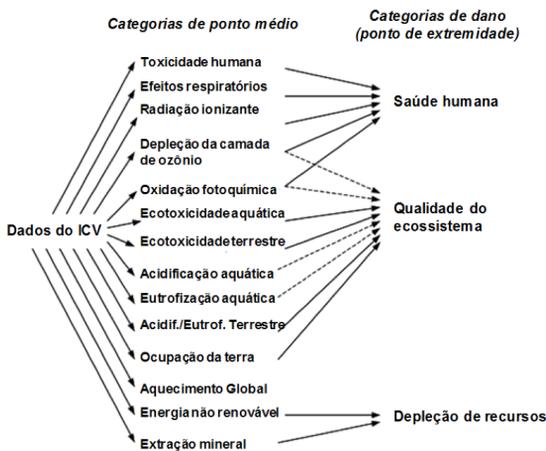
Deve-se selecionar as categorias de impacto que serão analisadas no estudo de ACV e qual método de avaliação desses impactos será adotado. A seleção das categorias de impacto deve ser justificada e consistente com o objetivo e escopo da ACV, além de refletir um conjunto abrangente de questões ambientais relacionado aos grandes focos de preocupação ambiental



**Figura 5.** Exemplo de expansão do sistema para substituição das cofunções desnecessárias.

do sistema analisado. São inúmeras as categorias de impacto que podem ser analisadas em um estudo de ACV, sendo as principais: mudança climática, depleção da camada de ozônio, toxicidade humana, substâncias inorgânicas respiratórias/material particulado, radiação ionizante, formação fotoquímica de ozônio (ao nível do solo), potencial de acidificação (terra e água), potencial de eutrofização (terra e água), ecotoxicidade, uso da terra, depleção de recursos bióticos e/ou abióticos. Tais categorias são chamadas de categorias de ponto médio (midpoints) e podem ser agrupadas em categorias de ponto de extremidade ou de dano (endpoints) – saúde humana, qualidade do ecossistema e depleção de recursos (Figura 6).

Existem diversos métodos de avaliação de impacto e cada um deles abrange determinado número de categorias de impacto (Tabela 1) e metodologia de cálculo específica. Maior detalhamento sobre a metodologia de cada um deles pode ser visto no ILCD<sup>8</sup> Handbook: Analysing of existing Environmental Impact Assessment Methodologies for use in Life Cycle Assessment, disponível em: <http://eplca.jrc.ec.europa.eu/>.



**Figura 6.** Exemplo de categorias de ponto médio e agrupamento para categorias de dano. Fonte: European Union, 2010.

<sup>8</sup> International Reference Life Cycle Data System.

**Tabela 1.** Categorias de impacto incluídas nos principais métodos de avaliação de impacto do ciclo de vida.

MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE IMPACTO / CATEGORIAS DE IMPACTO INCLuíDAS	ACIDIFICAÇÃO	MUDANÇA CLIMÁTICA	DEPLEÇÃO DE RECURSOS	ECOTOXICIDADE	USO DE ENERGIA	EUTROFICAÇÃO	TOXICIDADE HUMANA	RADIAÇÃO IONIZANTE	USO DA TERRA	ODOR	DEPLEÇÃO DA CAMADA DE OZÔNIO	MATERIAL PARTICULADO	OXIDAÇÃO FOTOQUÍMICA
CML (baseline)	✓	✓	✓	✓		✓	✓				✓		✓
CML (non baseline)	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Cumulative Energy Demand					✓								
Eco-Indicator 99	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	
Eco-Scarcity 2006			✓										
ILCD <sup>1</sup>	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
ReCiPe	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
TRACI2.1	✓	✓	✓	✓		✓	✓				✓	✓	✓
USETox				✓									

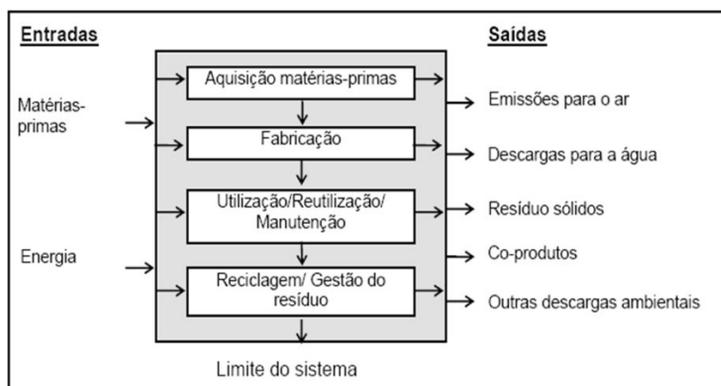
<sup>1</sup> Proposto pelo International Reference Life Cycle Data System como resultado de um projeto conduzido pela Comissão Europeia (JCR) que analisou diversas metodologias de avaliação de impacto para alcançar um consenso sobre qual metodologia é a mais apropriada para cada categoria de impacto.  
 Fonte: Adaptado de Acero et al., 2015.

### 3.1.5 REQUISITOS DE QUALIDADE DOS DADOS

A qualidade dos dados é um aspecto importante, uma vez que pode prevenir a interpretação enganosa dos resultados da ACV. Os dados podem ser primários, a partir de fontes primárias de dados ou coleta direta nos locais de produção (ex.: experimentos, empresas produtoras, etc.); ou secundários que, em geral, são provenientes de banco de dados nacional ou internacional, grupos de pesquisa, entre outros. Sempre que possível, devem ser utilizados dados primários, principalmente quando estão relacionados diretamente com o(s) produto(s) analisado(s). Com relação aos bancos de dados, tem-se o SICV<sup>9</sup> Brasil, que é o Banco de Nacional de Inventários do Ciclo de Vida, lançado pelo Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia (IBICT), e o Ecoinvent<sup>10</sup>, um banco de inventários de ACV suíço que possui abrangência internacional.

### 3.2 FASE 2 – ANÁLISE DE INVENTÁRIO DO CICLO DE VIDA

Esta é a fase em que se exige mais esforços e recursos de um estudo de ACV, pois compreende a coleta de dados para quantificar as entradas e saídas relevantes do sistema estudado, como: entradas de energia, matérias-primas, água e outras entradas físicas, saídas na forma de produto e/ou coprodutos, resíduos, descargas para água, solo e atmosfera (Figura 7). Dessa maneira, devem ser coletados dados quantitativos e qualitativos para cada processo incluído na fronteira do sistema, de modo que sejam correlacionados à unidade funcional para posterior classificação e análise. Segundo a NBR ISO 14044:2009, a fase de análise do ICV é composta de algumas etapas posteriores à coleta dos dados, como a validação dos dados, a correlação dos dados aos processos modelados e à unidade funcional/fluxo de referência, e a agregação desses dados – possivelmente definindo uma média.



**Figura 7.** Entradas e saídas do sistema de produto. Fonte: ABNT, 2009.

### 3.3 FASE 3 – AVALIAÇÃO DE IMPACTO DO CICLO DE VIDA

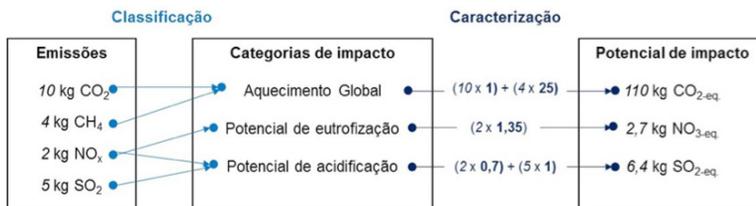
Na terceira fase, Avaliação do Impacto do Ciclo de Vida (AICV), os resultados do balanço

<sup>9</sup> <https://sicv.ibict.br>

<sup>10</sup> <http://www.ecoinvent.org>

das entradas e saídas realizado na fase de inventário são traduzidos em potenciais impactos ambientais, a partir dos quais é possível avaliar a magnitude e a significância do desempenho ambiental do sistema de produto estudado.

Segundo a norma ABNT NBR ISO 14040:2009, a classificação e a caracterização são elementos obrigatórios da AICV. Dentre os elementos opcionais que contribuem para uma melhor compreensão da ACV, estão a normalização, agrupamento e ponderação. A classificação refere-se à correlação dos resultados do ICV às categorias de impacto escolhidas na fase 1, e a caracterização, à conversão dos resultados do ICV, por meio de fatores de caracterização, para unidades comuns dentro da mesma categoria de impacto. A normalização, como o próprio nome diz, refere-se à equalização dos resultados das categorias de impacto com relação a algum valor de referência, que pode ser interno ou externo. Geralmente, é realizada a normalização interna pela soma ou pelo valor máximo, em que o resultado de cada categoria de impacto é dividido pela soma dos valores naquela categoria ou pelo valor máximo. Já a normalização externa utiliza como parâmetro de equalização o impacto total, calculado com base em um inventário de todas as atividades da região considerada no estudo de ACV em um determinado período de tempo. Embora seja mais completa, a normalização externa é de difícil aplicação, devido à necessidade de utilização de dados fora do sistema de estudo analisado. O agrupamento é a reunião das categorias de impacto em um ou mais conjuntos, de acordo com a relevância da informação (ex.: impactos de escala global, regional e local). Já a ponderação consiste na atribuição de pesos relativos às categorias de impacto para atingimento de um escore total, a partir da multiplicação dos resultados ao fator de ponderação.



**Figura 8.** Obs. Os valores numéricos são ilustrativos; valores em negrito representam os fatores de caracterização. Exemplo de classificação e caracterização na fase de AICV

### 3.4 FASE 4 – INTERPRETAÇÃO

Por fim, a quarta fase é a da interpretação dos resultados, em que as constatações feitas nas duas fases anteriores são interpretadas em conjunto, de modo a fornecer resultados que levem a conclusões, expliquem limitações e provejam recomendações. A partir dos resultados da AICV, são identificadas as questões ambientais mais significativas do(s) produto(s) analisado(s). Ainda nessa fase, são realizadas verificações de completeza, sensibilidade e consistência. A completeza refere-se à verificação se os dados de entrada e saída que compõem o ICV e os resultados da AICV representam, de fato, as informações mais importantes para o estudo, de acordo com o estabelecido no objetivo e escopo. Análises de sensibilidade podem ser realizadas

a fim de verificar se alterações nos dados e parâmetros usados no estudo afetam os resultados finais da ACV. Um estudo pode ser considerado inconsistente, caso pequenas alterações nos dados de entrada levem a mudanças significativas nos resultados da ACV.

## 4 | SOFTWARES

Existem diversos softwares para modelagem de ciclos de vida e sistemas de produção que auxiliam na elaboração de estudos de ACV. Os softwares mais utilizados são o SimaPro®, da Holanda, o GaBi e o Umberto, ambos da Alemanha. Todos eles possuem os bancos de dados (ex.: Ecoinvent, LCA Food etc.) e os principais métodos de avaliação de impacto (ex.: ILCD, ReCiPe, CML etc.). Por serem softwares pagos e geralmente caros, constituem uma das barreiras ao avanço da ACV no Brasil. O único software de ACV disponibilizado gratuitamente é o Open-LCA ([www.openlca.org](http://www.openlca.org)) que, embora seja grátis e possua interface amigável, não disponibiliza dados dos bancos de dados de forma gratuita.

## 5 | ACV & BIOTECNOLOGIA MARINHA

É notável a importância da aplicação da ACV em biotecnologia marinha, uma vez que é indiscutível a necessidade de explorar os recursos marinhos de maneira sustentável, garantindo não só os menores impactos à biodiversidade marinha como também a consistência, a segurança e a qualidade do abastecimento de biomassa. Os estudos de ACV nessa área concentram-se em avaliações dos impactos ambientais da produção de energia a partir de biomassa algal (ex.: bioetanol, biodiesel e biogás), da produção de frutos do mar e de diferentes sistemas de cultivo/maricultura. A ACV também tem se mostrado uma poderosa ferramenta na avaliação do desempenho ambiental da produção de bioprodutos de alto valor agregado, como os biocompostos ativos. Em alguns países da Europa e nos Estados Unidos, a ACV tem sido adotada em estudos de viabilidade técnica, econômica e ambiental (EVTEA) a fim de quantificar os potenciais impactos ambientais negativos e positivos de projetos relacionadas à biotecnologia marinha. A seguir, são mostrados quatro exemplos de aplicação da ACV em biotecnologia marinha com os principais enfoques: (i) enfoque energético, em que a ACV é aplicada para avaliar a sustentabilidade ambiental de um modelo conceitual de biorrefinaria de macroalgas; (ii) enfoque em sistemas produtivos, em que a ACV é usada na comparação de diferentes sistemas de cultivo de camarão, a fim de identificar qual sistema é o mais adequado em termos ambientais; (iii) enfoque em bioprodutos, em que são quantificados os potenciais impactos ambientais de todas as etapas de produção de um biocomposto ativo de esponjas; e (iv) enfoque em gestão de resíduos, em que são analisados dois cenários de fim de vida dos resíduos (concha) da ostra.

### 5.1 EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DA ACV

### 5.1.1 COM ENFOQUE ENERGÉTICO

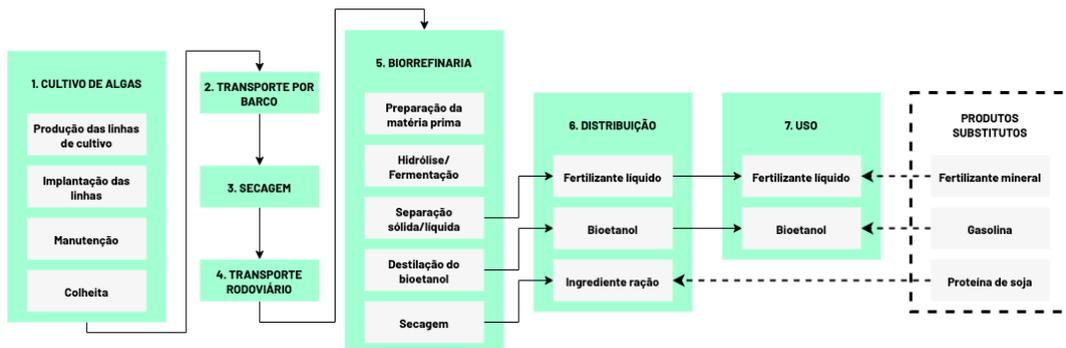
Em artigo intitulado “Life cycle assessment of macroalgal biorefinery for the production of ethanol, proteins and fertilizers – a step towards a regenerative bioeconomy”, Seghetta et al. (2016) aplicaram a ACV para avaliar os potenciais impactos ambientais de um modelo conceitual de biorrefinaria de macroalgas para produção de bioetanol, fertilizante líquido e suplemento proteico para ração de peixe. Foram comparados sete cenários (cenário base + seis cenários alternativos) de produção no modelo de biorrefinaria de macroalgas, a fim de maximizar os benefícios e minimizar os trade-offs ambientais, conforme mostrado abaixo.

**Tabela 2.** Cenários da biorrefinaria analisados. Fonte: Traduzido de Seghetta et al. (2016).

CARACTERÍSTICA	CENÁRIO BASE	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Produtividade	Média	Baixa	Alta	Média	Média	Média	Média
Espécie	<i>L. digitata</i>	<i>L. digitata</i>	<i>L. digitata</i>	<i>S. latissima</i>	<i>L. digitata</i>	<i>L. digitata</i>	<i>L. digitata</i>
Biorrefinaria	SHF	SHF	SHF	SHF	SSF	SHF	SHF
Cultivo	Corda 8 mm	Corda 8 mm	Corda 8 mm	Corda 8 mm	Corda 8 mm	Corda 8 mm	Corda/ Pedra
Estação	Verão	Verão	Verão	Primavera	Verão	Primavera	Verão

A fronteira do sistema analisada foi do berço ao túmulo, incluindo toda a cadeia de valor desde a produção da biomassa, processamento na biorrefinaria para produção dos três produtos: bioetanol, biofertilizante e proteína. Assim, o sistema de produto, que representa as condições da Dinamarca, considerou os processos de cultivo das macroalgas, secagem, processamento na biorrefinaria hipotética, distribuição e uso dos produtos, além dos processos de transporte entre as etapas – transporte de barco do cultivo até o porto, transporte rodoviário do porto até a biorrefinaria e transporte rodoviário da biorrefinaria até o mercado consumidor (Figura 9). Como o estudo adotou a modelagem de ACV consequencial, foram analisados os benefícios ambientais pela substituição dos produtos convencionais pelos produtos da biorrefinaria (gasolina pelo bioetanol, fertilizante mineral pelo biofertilizante líquido, proteína da soja pela proteína de alga).

A definição dos cenários considerou cinco características-chaves: produtividade, espécie utilizada, tecnologia de conversão, estação do ano e *design* de cultivo. O cenário base adotou uma produtividade média de 10Mg de biomassa úmida por hectare, a *Laminaria digitata* como espécie de macroalga cultivada, a tecnologia de conversão para produção de etanol a partir da separação por hidrólise e fermentação, a colheita das algas no verão e o cultivo em cordas de 8mm de diâmetro. Cada cenário alternativo modelado alterou uma determinada característica: os cenários A1 e A2 consideraram alterações na produtividade da biomassa – o primeiro com uma produtividade baixa e o segundo, alta; o cenário A3 alterou a espécie de macroalga cultivada e a época de colheita; o A4 considerou outra tecnologia de conversão da biorrefinaria



**Figura 9.** Sistema de produto (biorrefinaria de macroalgas). Fonte: Traduzido de Seghetta et al. (2016).

- a sacarificação e fermentação simultâneas; o cenário A5 alterou a estação do ano para da colheita do verão para a primavera; e o cenário A6 teve alteração no *design* do cultivo, usando uma corda oca cheia de pedras em vez da corda de 8mm de diâmetro com lastros de ferro (Tabela 2).

A UF adotada foi 1 hectare de mar cultivado, e o estudo seguiu as normas ISO 14040 e 14044:2006, com expansão do sistema para incluir os produtos substitutos de acordo com a modelagem consequential. Os cálculos foram feitos no SimaPro 8.0.4 e foram usados dados do Ecoinvent v3.1. As categorias de impacto analisadas foram: mudanças climáticas, com os impactos quantificados em kg CO<sub>2</sub>-eq.; demanda acumulativa de energia - total e fóssil, expressa em MJ; eutrofização marinha, quantificada em kg Neq., e eutrofização marinha limitada em fósforo, expressa em kg Peq.; por fim, toxicidade humana carcinogênica e não carcinogênica, com os impactos quantificados em unidades tóxicas comparativas (CTUh), ou seja, o aumento estimado da morbidade na população humana total por unidade de massa de produto químico emitido. Três métodos de avaliação de impacto foram usados em conjunto: o ReCiPe foi usado para caracterizar as emissões associadas às categorias de impacto mudanças climáticas e eutrofização marinha; o USEtox foi usado para a categoria toxicidade humana; e o Cumulative Energy Demand para a categoria de demanda energética. Os resultados de cada cenário para cada categoria de impacto são mostrados a seguir.

**Tabela 3.** Resultados da ACV para a UF de 1 hectare de cultivo de macroalgas. Fonte: Traduzido de Seghetta et al. (2016).

CENÁRIO/ CATEGORIAS IMPACTO	MUDANÇA CLIMÁTICA 10 <sup>2</sup> kg CO <sub>2</sub> -eq	DEMANDA ENERGÉTICA TOTAL 10 <sup>3</sup> MJ	DEMANDA ENERGÉTICA FOSSIL 10 <sup>3</sup> MJ	EUTROFIZAÇÃO MARINHA kg N eq.	EUTROFIZAÇÃO MARINHA LIM. FÓSFORO kg P eq.	TOXICIDADE HUMANA CARCINOGÊNICA 10 <sup>-4</sup> CTUh	TOXICIDADE HUMANA NÃO CARCINOGÊNICA 10 <sup>-4</sup> CTUh
Base	-0,1	3,9	0,5	-16,3	-1,1	2,1	20,3
A1	2,6	3,2	0,9	-11,0	-0,7	2,2	14,4

CENÁRIO/ CATEGORIAS IMPACTO	MUDANÇA CLIMÁTICA 10 <sup>2</sup> kg CO <sub>2</sub> -eq	DEMANDA ENERGÉTICA TOTAL 10 <sup>4</sup> MJ	DEMANDA ENERGÉTICA FOSSIL 10 <sup>4</sup> MJ	EUTROFIZAÇÃO MARINHA kg N eq.	EUTROFIZAÇÃO MARINHA LIM. FÓSFORO kg P eq.	TOXICIDADE HUMANA CARCINOGÊNICA 10 <sup>-4</sup> CTUh	TOXICIDADE HUMANA NÃO CARCINOGÊNICA 10 <sup>-4</sup> CTUh
A2	-2,8	4,6	0,2	-21,7	-1,5	2,2	26,2
A3	6,6	6,2	1,7	-41,5	-6,3	2,2	29,3
A4	2,3	4,5	1,0	-16,3	-1,1	2,1	20,4
A5	3,2	4,6	1,7	-84,6	-10,4	2,2	29,4
A6	-1,9	4,0	0,6	-16,4	-1,2	0,2	18,5

Os resultados mostraram que os impactos em mudanças climáticas estiveram associados à troca da espécie de macroalga e à colheita na primavera, pois geraram menos de açúcar e, como consequência, menos bioetanol produzido e menor eficiência na substituição com a gasolina. A maior contribuição para as emissões de CO<sub>2</sub>-eq. estava na produção das cordas de cultivo. O processo de secagem da biomassa foi o maior contribuinte para a categoria de impacto demanda energética (cerca de 63% das emissões totais). A eutrofização marinha apresenta-se com valores negativos, pois representa um serviço ambiental das macroalgas pela bioextração de nitrogênio e fósforo do ambiente marinho. Por fim, os impactos relacionados à toxicidade humana mostraram que a maior toxicidade cancerígena estava no cultivo, devido à liberação de substâncias pelas barras de ferro que sustentam as cordas de cultivo e potencial absorção dessas substâncias pelas macroalgas.

### Discussão

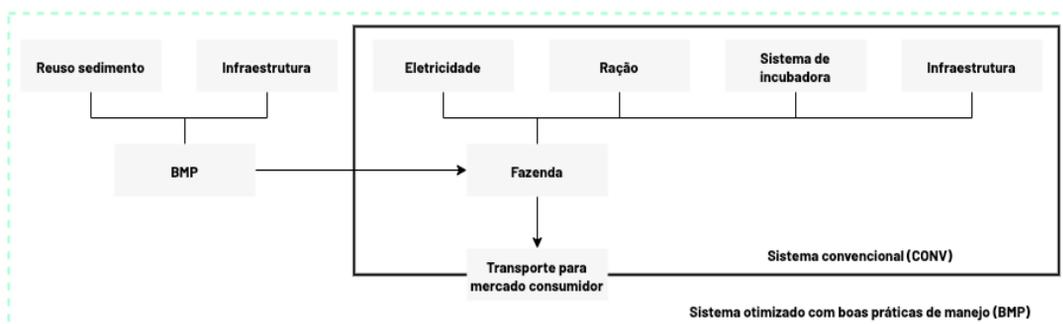
Este exemplo evidencia a importância da ACV como ferramenta de apoio à decisão em temas estratégicos como energia, por exemplo. Por trazer uma abordagem consequencial, através da expansão do sistema para substituição dos produtos convencionais pelos produtos da biorrefinaria, este estudo possibilitou analisar as consequências ambientais de diversos cenários de produção da biorrefinaria, de modo a identificar aquele com os menores impactos potenciais para o meio ambiente e para a saúde humana. A fronteira do sistema analisada foi do berço ao túmulo. Porém, vale a pena ressaltar que, no caso dos produtos avaliados (bioetanol, biofertilizante e suplemento proteico para ração de peixe), o fim de vida ocorre no estágio de uso desses produtos.

#### 5.1.2 COM ENFOQUE NO SISTEMA PRODUTIVO

O artigo intitulado “Comparing environmental impacts of native and introduced freshwater prawn farming in Brazil and the influence of better effluent management using LCA”, de San-

tos et al. (2015), aplica ACV atribucional comparativa com base nas normas ISO 14040 e 14044, a fim de estimar e comparar os potenciais impactos ambientais de dois sistemas hipotéticos de cultivo de camarão tropical de água doce: um com a espécie exótica *Macrobrachium rosenbergii* (camarão gigante da Malásia) e o outro sistema com a espécie nativa *Macrobrachium amazonicum* (camarão da Amazônia).

A UF adotada no estudo foi uma tonelada de camarão fresco, sendo vendido para o mercado consumidor situado em Belém-PA, a uma distância média de 60km das fazendas hipotéticas. Os sistemas hipotéticos de cultivo de camarão de água doce foram modelados com base em dados técnicos e resultados experimentais, representando sistemas já aprovados para construção no estado do Pará. Para cada espécie analisada, foram modelados dois sistemas de cultivo dos camarões, com o intuito de avaliar o potencial de melhoria com a adoção de um melhor tratamento de efluentes: sistema convencional (CONV) e sistema com boas práticas de manejo (BMP), que considera constructed wetlands (adoção de processos naturais e altamente estáveis) e reuso de sedimentos em outras culturas como fertilizantes. A Fronteira do Sistema adotada foi do berço à distribuição para o mercado consumidor, conforme apresnetado na figura abaixo, que inclui os estágios de construção da infraestrutura (todos os equipamentos e construções, cujos impactos ambientais foram divididos pela vida útil), incubadora, crescimento da biomassa, produção de fertilizantes e insumos alimentares (ração) e transporte em todos os estágios. Somente equipamentos e insumos para abate do camarão foram considerados, o processamento e empacotamento foram excluídos da Fronteira do Sistema.



**Figura 10.** Fronteira do Sistema adotada no estudo (camarão). Fonte: Traduzido de Santos et al. (2015).

Para construção do ICV, foram adotados dados do crescimento do *M. amazonicum* obtidos por medição direta e dados públicos, e do *M. rosenbergii* baseados em dados médios já publicados na literatura e de incubadoras. Os ciclos de crescimento de ambas as espécies foram assumidos para durar 165 dias e a estrutura foi dimensionada de acordo com práticas comuns de cada tipo de sistema modelado, considerando desvio da água de um córrego local através de tubulação de PVC. Todos os sistemas analisados utilizaram fertilizantes químicos nos tanques e os fluxos de N e P foram estimados a partir do balanço de massa de nutrientes baseado nas quantidades de N e P contidos nas rações e no peso dos camarões. A tabela abaixo apresenta as

características anuais de cada sistema de cultivo e espécie, baseadas em dados da literatura, e que compõem o ICV.

**Tabela 4.** Resultado do inventário anual das larviculturas. Fonte: Traduzido de Santos et al. (2015)

PARÂMETRO	<i>M. amazonicum</i>		<i>M. rosenbergii</i>	
	CONV	BMP	CONV	BMP
<b>Infraestrutura</b>				
Área de cultivo (m <sup>2</sup> )	120.000	120.000	120.000	120.000
Profundidade média (m)	1	1	1	1
Sistema de tratamento de efluente (m <sup>2</sup> )	-	20.000	-	20.000
<b>Entradas</b>				
Energia total (MJ)	3.048,1	3.048,1	4.030,2	4.030,2
Água doce (m <sup>3</sup> )	5.291.150	5.291.150	5.820.265	5.820.265
Densidade de estocagem inicial (ind.m <sup>2</sup> )	40	40	10	10
Total pós-larvas (ind.)	10.560.000	10.560.000	2.640.000	2.640.000
<b>Entradas via alimentação</b>				
Proteína (kg)	28.690,2	28.690,2	34.270,7	34.270,7
Nitrogênio (kg)	4.590,4	4.590,4	5.582,7	5.582,7
Fósforo (kg)	1.024,6	1.024,6	1.223,9	1.223,9
<b>Saídas (emissões de nutrientes)</b>				
Nitrogênio sólido (kg)	5.078,9	0	3.187,8	0
Nitrogênio dissolvido (kg)	801,7	137,9	1.976,1	1.045,0
Fósforo sólido (kg)	774,2	0	774,2	0
Fósforo dissolvido (kg)	30,9	14,6	243,2	50,4
Gás nitrogênio (kg)	1.343	1.343	1.343	1.343
<b>Desempenho zootécnico</b>				
Taxa de conversão alimentar (%)	3,0	3,0	3,0	3,0
Produtividade final por ano (tonelada)	32,46	32,46	45,54	45,54

Dados relacionados ao transporte, eletricidade, consumo de combustível (diesel), infraestrutura e materiais foram retirados do Ecoinvent v.2.2, com devidas adaptações para o contexto brasileiro em termos do *mix* de energia elétrica e dados de inventários específicos do país para algumas culturas locais. Ingredientes, formulação e quantidade anual de alimentos foram considerados para cada espécie. Como os sistemas estudados possuem vários processos unitários resultando em mais de um produto ou coproduto (ex.: farelo de soja e óleo de soja, amido de milho e glúten), foi adotado o processo de alocação pelo valor econômico, a fim de alocar as

cargas ambientais para cada produto e coproduto.

O método de AICV utilizado foi o CML 2001, onde sete categorias de impacto foram analisadas: mudanças climáticas, potencial de eutrofização, potencial de acidificação, uso de energia, uso de superfície, uso de produção primária e dependência de água. As duas últimas categorias de impacto analisadas permitem relacionar a aquicultura com o uso de recursos naturais, onde o uso de produção primária estima a quantidade de carbono usado na produção do camarão, baseado no nível trófico de produtos vegetais e animais usados como insumos alimentares, e a dependência de água quantifica o volume de água necessário para o sistema de produção durante o ciclo produtivo de 165 dias. Os cálculos foram feitos no *software* Simapro v.7.3 e os resultados são apresentados nas tabelas a seguir.

**Tabela 5.** Potenciais impactos ambientais do *M. amazonicum* nos cenários modelados para sistema produtivo convencional (CONV) e otimizado (BMP) no Brasil (resultados para 1 t de camarão fresco). Fonte: Traduzido de Santos et al. (2015)

CATEGORIA DE IMPACTO	CENÁRIO	1	2	3	4	5	6	7	Total
Acidificação (kg SO <sub>2-eq.</sub> )	A	0	27,9	3,7	4,8	0	0,5	0,0	36,9
	B	0	27,9	3,7	4,6	0	0,5	1,8	38,1
Eutrofização (kg PO <sub>4-eq.</sub> )	A	151,9	15,3	6,7	0,9	0	0,1	0	175,1
	B	3,2	15,3	6,7	0,8	0,1	0,1	-34,2	-8,1
Mudanças climáticas (kg CO <sub>2-eq.</sub> )	A	0	4.079,7	1.580,6	866,5	6,8	142,9	0	6.676,6
	B	0	4.079,7	1.580,6	896,9	6,8	142,9	296	6.862,7
Uso de superfície (m <sup>2</sup> .ano <sup>-1</sup> )	A	176,7	2.144,7	320,1	3.703,8	0,2	3,9	0	6.348,7
	B	176,7	2.144,7	320,1	3.706,7	0,2	3,9	154,7	6.503,2
Uso de produção primária (t C)	A	0	142,3	6,6	0	0	0	0	148,9
	B	0	142,3	6,6	0	0	0	0	148,9
Dependência de água (m <sup>3</sup> )	A	163.010,0	77,0	8.987,0	9,7	0	1,5	0	172.085,2
	B	163.010,0	77,0	8.987,0	10,4	0	1,5	1,2	172.087,1
Uso de energia (GJ)	A	0	48,7	29,8	11,8	0,1	2,4	0	92,9
	B	0	48,7	29,8	12,5	0,1	2,4	4,5	95,7

Onde: (A) CONV; (B) BMP; (1) operação da fazenda; (2) ração; (3) incubadora; (4) infraestrutura; (5) eletricidade; (6) transporte; (7) BMP.

**Tabela 6.** Potenciais impactos ambientais do *M. rosenbergii* nos cenários modelados para sistema produtivo convencional (CONV) e otimizado (BMP) no Brasil (resultados para 1 t de camarão fresco). Fonte: Traduzido de Santos et al. (2015)

CATEGORIA DE IMPACTO	CENÁRIO	1	2	3	4	5	6	7	Total
Acidificação (kg SO <sub>2-eq.</sub> )	A	0	16,7	1,0	3,4	0	0,5	0	21,8
	B	0	16,7	1,0	3,0	0	0,5	1,3	22,6

CATEGORIA DE IMPACTO	CENÁRIO	1	2	3	4	5	6	7	Total
Eutrofização (kg PO <sub>4-eq.</sub> )	A	116,1	9,2	0,5	0,7	0	0,1	0	126,6
	B	13,0	9,2	0,5	0,6	0	0,1	-25,9	-2,5
Mudanças climáticas (kg CO <sub>2-eq.</sub> )	A	0	2.447,8	440	622,7	5,8	152,6	0	3.668,9
	B	0	2.447,8	440	544,3	5,8	152,6	216,6	3.807,1
Uso de superfície (m <sup>2</sup> .ano <sup>-1</sup> )	A	126,1	1.286,8	87,3	2.643,4	0,1	4,2	0	4.146,4
	B	126,1	1.286,8	87,3	2.641,7	0,1	4,2	317	4.463,2
Uso de produção primária (t C)	A	0	85,4	0,4	0	0	0	0	85,8
	B	0	85,4	0,4	0	0	0	0	85,8
Dependência de água (m <sup>3</sup> )	A	127.917,0	46,2	366,2	7,0	0	1,6	0	128.338,0
	B	127.917,0	46,2	366,2	6,7	0	1,6	1,1	128.338,8
Uso de energia (GJ)	A	0	29,2	8,2	8,4	0,1	2,6	0	48,6
	B	0	29,2	8,2	7,3	0,1	2,6	3,2	50,6

Onde: (A) CONV; (B) BMP; (1) operação da fazenda; (2) ração; (3) incubadora; (4) infraestrutura; (5) eletricidade; (6) transporte; (7) BMP.

Os resultados mostraram que a ração apresenta as maiores cargas ambientais para a categoria de mudanças climáticas. Para o *M. amazonicum*, nessa categoria de impacto a contribuição da ração foi de 59–61% para o sistema CONV e o otimizado BMP. Já a ração do camarão *M. rosenbergii* contribuiu para 66% no sistema CONV e 64% no BMP. O estágio de incubação contribuiu em 23% (*M. amazonicum*) e 12% (*M. rosenbergii*) para mudanças climáticas. Na comparação entre os sistemas CONV e BMP, não houve redução significativa nos impactos dessa categoria.

Na categoria de potencial de eutrofização, o cultivo do *M. amazonicum* no sistema CONV apresentou as operações da fazenda e a ração como os processos mais impactantes, 87% (= 151,9kg PO<sub>4-eq.</sub>) e 29% (= 15,3kg PO<sub>4-eq.</sub>) respectivamente. Para o *M. rosenbergii* CONV, as operações da fazenda contribuíram para 92% (= 116,1kg PO<sub>4-eq.</sub>), e a ração para 7% (= 29,2kg PO<sub>4-eq.</sub>). O cultivo no BMP para ambas as espécies apresentou significativa redução no total do potencial impacto de eutrofização, devido à redução das emissões de N e P para o ambiente. Para a categoria de acidificação, a ração e a infraestrutura foram os que mais contribuíram em ambos os sistemas produtivos para ambas as espécies: mais de 70% das cargas ambientais de SO<sub>2-eq.</sub> provieram da ração e cerca de 13% da infraestrutura.

Com relação ao uso de energia, a ração do *M. amazonicum* representou cerca de 50% do consumo total de energia tanto no sistema CONV quanto no BMP, enquanto que a contribuição da incubação foi de aproximadamente 31% em ambos os sistemas produtivos. Comparativamente com o *M. rosenbergii*, a ração teve contribuição maior (60%) e a incubação menor (17%). Infraestrutura e ração foram os que mais contribuíram para o uso de superfície em ambos os sistemas produtivos para as duas espécies. A infraestrutura teve cerca de 58% de participação para ambas as espécies. Já a ração contribuiu para 33% do uso total de superfície do

*M. amazonicum* e 37% do *M. rosenbergii*.

Na categoria uso de produção primária, a ração representa quase a totalidade do consumo total de carbono dos sistemas analisados: 95% para o *M. amazonicum* e 99% do *M. rosenbergii*. Observou-se que a dependência de água foi maior para o cultivo do *M. amazonicum* do que para o *M. rosenbergii*. As operações da fazenda corresponderam a 94% e 99% do consumo total de água para ambos os cenários do *M. amazonicum* e *M. rosenbergii*, respectivamente.

De acordo com a ACV, o camarão gigante convencional (*M. rosenbergii* no sistema CONV) possui menores impactos ambientais do que o camarão convencional da Amazônia (*M. amazonicum* no sistema CONV) em todas as categorias de impacto avaliadas. A produção de ração foi a que mais contribuiu para os impactos. Entretanto, como a taxa de conversão alimentar do *M. rosenbergii* é menor, este apresentou menores impactos por tonelada que o *M. amazonicum*. Melhorar os rendimentos de ambas as espécies é, portanto, crucial para reduzir esses impactos. Já a adoção do sistema produtivo otimizado BMP diminuiu consideravelmente o potencial de eutrofização, apresentando, assim, vantagens com relação ao sistema de produção convencional.

## **Discussão**

Este exemplo evidencia a utilidade da aplicação da ACV como ferramenta comparativa, a fim de comparar o desempenho ambiental de dois produtos ou sistemas produtivos que desempenham a mesma função. Neste caso, a ACV possibilitou não só identificar qual espécie de camarão tropical de água doce apresenta melhor desempenho ambiental, como também identificar e quantificar os potenciais impactos ambientais do sistema de produção convencional *versus* um sistema otimizado com boas práticas de manejo, relacionados ao tratamento de efluentes. Embora os resultados tenham sido apresentados em números absolutos, o que dificulta a interpretação já que cada categoria de impacto possui uma unidade de medida diferente, a interpretação dos resultados foi feita a partir de uma análise de contribuição (%) que permite identificar qual processo tem maior participação na categoria de impacto analisada.

### **5.1.3 COM ENFOQUE EM BIOPRODUTO**

Pérez-López et al. (2017), em seu artigo "Life Cycle Assessment of *in situ* mariculture in the Mediterranean Sea for the production of bioactive compounds from the sponge *Sarcotragus spinosulus*", aplicaram a ACV atribucional com base nas normas internacionais ISO 14040-44, com o objetivo de avaliar a sustentabilidade ambiental da maricultura de esponjas em cordas de nylon ancoradas em estruturas plásticas para extração do biocomposto ativo fenil-hidroquinona.

A UF adotada no estudo foi de 100Mg de biocomposto ativo produzido, que corresponde a um ano de cultivo de esponjas na costa do Mar Mediterrâneo. A Fronteira do Sistema foi do berço ao portão (*cradle-to-gate*), abrangendo sete estágios do cultivo experimental da esponja: (S1) instalação da estrutura de cultivo, (S2) coleta e transporte do exemplar de esponja do habitat natural, (S3) cultivo dos explantes, (S4) monitoramento e manutenção do cultivo, (S5) colheita

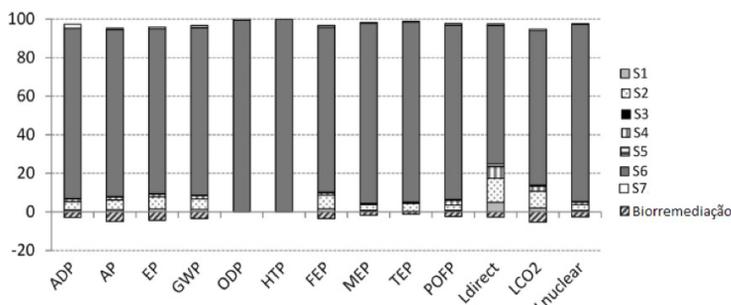
anual da biomassa, (S6) preparação do extrato cru de biomassa, e (S7) extração da fração de fenil-hidroquinona por meio de solvente. Como o cultivo de esponjas apresenta um potencial benefício ambiental através da biorremediação, esta foi considerada por meio da expansão do sistema.

Dentre as entradas do ICV, destacam-se: as cordas de nylon, os polímeros policloreto de vinila (PVC) e polietileno de baixa densidade (LDPE em inglês) e os ganchos de pressão em aço, que foram usados na etapa da instalação da estrutura de cultivo; embarcação, equipamentos de mergulho, combustível e óleo lubrificante (para manutenção do barco), que foram usados para coleta e transporte da esponja de seu hábitat natural; químicos, energia elétrica e equipamentos usados nos processos de preparação da biomassa e extração do biocomposto ativo. Os dados referentes a esses materiais e equipamentos foram retirados do banco de dados internacional Ecoinvent v2.2. Já com relação aos parâmetros de cultivo (produtividade, escala do cultivo etc.), foram usados dados primários baseados em dados médios reais obtidos de medições *on-site* de diversos cultivos localizados na costa do Mar Mediterrâneo.

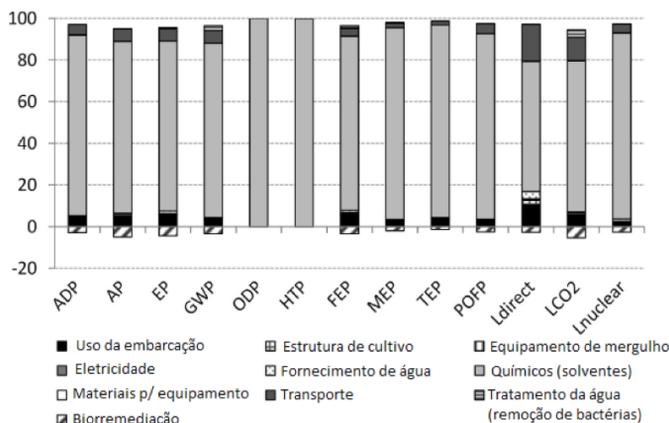
Dentre as saídas do ICV, foram utilizados dados secundários para estimar as emissões para o ar advindas, principalmente, do combustível da embarcação usada para coleta dos exemplares da esponja de seu hábitat natural. Já as emissões para a água, que ocorreram nos diferentes processos do cultivo, foram assumidas como descargas diretas para o ambiente. A disposição final dos resíduos sólidos considerada foi aterro sanitário, exceto para a borracha sintética do casco do barco, em que se adotou a incineração. Ambos os processos foram modelados de acordo com os dados do Ecoinvent.

O método de AICV escolhido foi o CML 2001, em que são analisadas as seguintes categorias de impacto: depleção abiótica (ADP), acidificação (AP), eutrofização (EP), aquecimento global (GWP), depleção da camada de ozônio (ODP), toxicidade humana (HTP), ecotoxicidade de água doce (FEP), ecotoxicidade marinha (MEP), ecotoxicidade terrestre (TEP) e formação de oxidantes fotoquímicos (POFP). Adicionalmente, categorias de impacto relativas à ocupação do solo foram inseridas na AICV através do método de Pegada Ecológica, são elas: uso direto do solo (LDirect), uso do solo para emissões de CO2 (LCO2) e uso do solo para demanda de energia nuclear (LNuclear).

Embora diversos bioprodutos de alto valor agregado possam ser extraídos das esponjas, o cultivo analisado teve por objetivo a extração de apenas um composto ativo. Assim, não foram realizados procedimentos de alocação e todas as cargas ambientais foram associadas ao fenil-hidroquinona. O software Simapro 8.0.2 foi usado na modelagem da ACV, cujos resultados estão apresentados a seguir:



**Figura 11.** Contribuição relativa (%), por estágio e categoria de impacto, da produção de fenil-hidroquinona a partir da maricultura de *S. spinosulus*. Fonte: Traduzido de Pérez-López et al. (2017).



**Figura 12.** Contribuição relativa (%), por processo e categoria de impacto, da produção de fenil-hidroquinona a partir da maricultura de *S. spinosulus*. Fonte: Traduzido de Pérez-Lopéz et al. (2017)

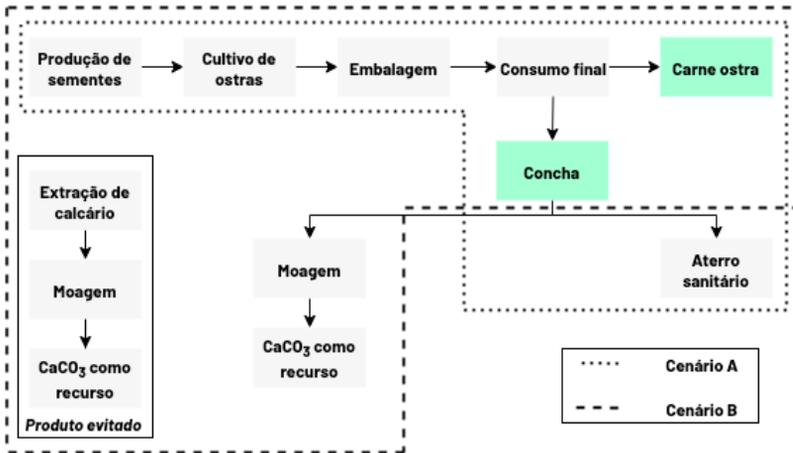
Os resultados mostraram que o estágio S6 (preparação do extrato cru de biomassa) é o maior contribuinte das cargas ambientais em todas as categorias de impacto analisadas, em função da utilização de solventes como o metanol, por exemplo. Como o uso de solventes é responsável por mais de 80% das cargas ambientais associadas à produção de fenil-hidroquinona, os autores realizaram uma análise de sensibilidade a fim de avaliar a redução dos impactos ambientais com a recuperação dos solventes usados na preparação do extrato cru, de modo que foram identificadas reduções de 1 a 50% dos impactos ambientais em relação ao cenário base.

## Discussão

Este estudo é um exemplo típico da aplicação da ACV para identificação de oportunidades de melhoria. Além disso, é um dos primeiros estudos de ACV com ICV detalhado da produção de biomassa de esponja (em particular a espécie *S. spinosulus*) *in situ* para extração de biocompostos ativos. A partir da aplicação da metodologia de ACV, foi possível avaliar não só o desempenho ambiental do cultivo de esponjas para produção de biocomposto ativo, mas também identificar os pontos críticos do sistema de produto, possibilitando assim a implementação de melhorias no processo. Em outras palavras, a aplicação da ACV permitiu constatar que o uso de solventes para preparação do extrato cru de biomassa é o maior responsável pelo desempenho ambiental da produção de fenil-hidroquinona a partir de esponjas, de modo que a otimização de seu uso (ex.: recuperação dos solventes) pode levar a uma melhoria global no desempenho ambiental desse biocomposto ativo.

### 5.1.4 COM ENFOQUE EM GESTÃO DE RESÍDUOS

No artigo “The recycling of oyster shells: An environmental analysis using Life Cycle Assessment”, Alvarenga et al. (2012) aplicaram a ACV para analisar o ciclo de vida de 1kg de ostras produzidas no sul do Brasil, considerando dois cenários de fim de vida: a reciclagem das ostras e a disposição final em aterro sanitário. A fronteira do sistema analisada foi do berço ao túmulo, considerando o seguinte sistema de produto para os dois cenários (Figura 13):



**Figura 13.** Sistema do produto para os dois cenários de fim de vida (ostras). Fonte: Traduzido de Alvarenga et al. (2012).

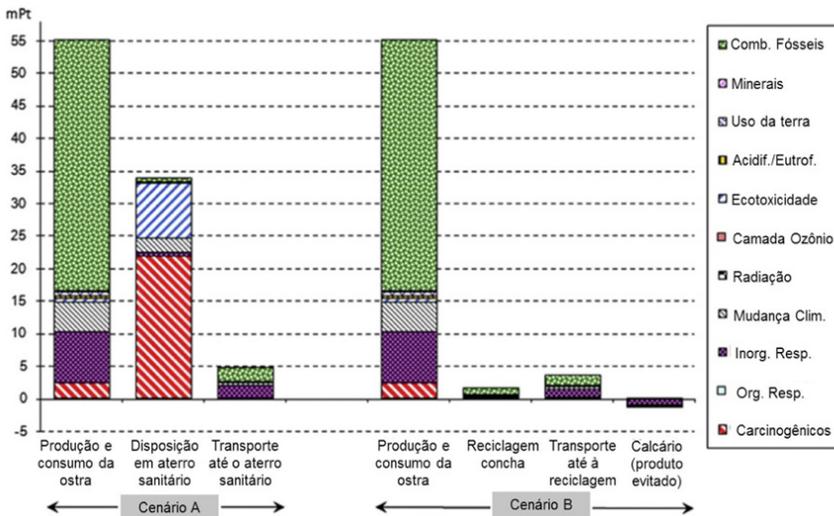
Ambos os cenários possuem quatro estágios em comum: (1) a produção das sementes a partir de gametas produzidos pela criação de ostras do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); (2) o cultivo das ostras; (3) embalagem; e (4) o consumo final da ostra em um restaurante. O primeiro cenário de fim de vida analisado considera a disposição final das conchas, i.e., dos resíduos do consumo de ostras em restaurantes, em aterro sanitário. Já o segundo cenário, que é hipotético, considera a reciclagem dessas conchas como fonte de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). Com o objetivo de calcular as emissões evitadas com relação à produção de CaCO<sub>3</sub> a partir das conchas, foi analisada também a produção convencional de CaCO<sub>3</sub> a partir do calcário como produto evitado. Todo o processo de transporte foi considerado, com as seguintes distâncias adotadas: 2,5km do local de cultivo das ostras até o restaurante, 58km do restaurante até o aterro sanitário e 30,4km até à planta de reciclagem.

A UF adotada foi 1kg de ostras servidas, que equivale a uma refeição única de ostras oferecida em restaurantes de Florianópolis, Sul do Brasil. Esse valor corresponde a aproximadamente 12 unidades de ostras, das quais cerca de 370 a 700g são conchas, cujo principal componente é o CaCO<sub>3</sub> (80-95%). Assim, os autores adotaram valores intermediários para a produção de conchas: 550g de conchas por uma dúzia de ostras, dos quais 500g são CaCO<sub>3</sub>.

O ICV foi composto por dados primários, relacionados à produção das sementes de ostra, ao cultivo e embalagem; dados secundários, relacionados à reciclagem das conchas; e dados do Ecoinvent, relacionados ao consumo de água e energia e às informações de segundo plano. O método de avaliação de impacto Ecoindicator 99 foi usado no estudo, com as seguintes categorias analisadas: carcinogênicos, orgânicos respiratórios, inorgânicos respiratórios, mudança climática, radiação ionizante, depleção da camada de ozônio, ecotoxicidade, acidificação e eutrofização, uso da terra, consumo de recursos minerais e combustíveis fósseis. A modelagem e os cálculos foram realizados no software SimaPro.

O método de AICV utilizado possibilita o agrupamento das categorias de impacto em um impacto global, expresso em *milli-points* (mPt). Assim, os resultados mostraram que o cenário A, em que os resíduos (conchas) são dispostos em aterro sanitário, é o que apresenta o pior desempenho ambiental - 93,71 mPt, enquanto no cenário B, de processamento das conchas para

produção de carbonato de cálcio, o impacto global foi de 58,97 mPt. Esses resultados são mostrados por macroprocessos e por categoria de impacto, de modo que é possível verificar que o consumo de combustíveis fósseis é o maior responsável pelo desempenho ambiental da produção e consumo de ostras (Figura 13). Embora o cenário B tenha tido melhor resultado, depende fortemente da distância do restaurante até a planta de processamento das conchas. Dessa maneira, uma distância maior que 323km altera significativamente o resultado do estudo.



**Figura 14.** Resultados da ACV divididos em macroprocessos (ostras). Fonte: Traduzido de Alvarenga et al. (2012).

**Discussão**

Este estudo evidencia a importância da ACV como ferramenta estratégica de gestão de resíduos, pois permite avaliar qual opção de tratamento de resíduos é mais adequada em termos ambientais. Adicionalmente, ela possibilita quantificar os benefícios ambientais associados à substituição de um produto convencional pelo produto reciclado. Embora tenha sido realizada a ACV do berço ao túmulo, poderia ter sido avaliado apenas o estágio do fim de vida para orientar na escolha entre a disposição em aterro sanitário ou reciclagem dos resíduos.

**6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

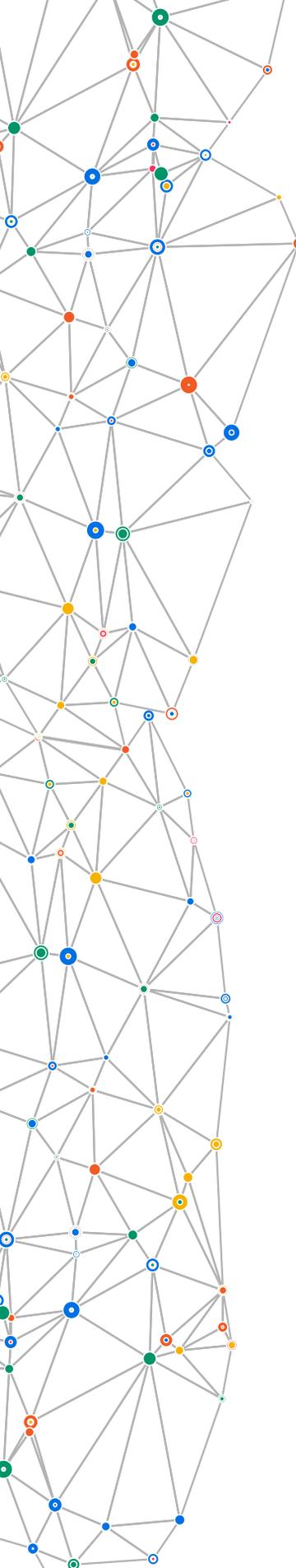
A ACV tem-se configurado como uma poderosa ferramenta não só para a gestão ambiental, mas também para o alcance da sustentabilidade. É importante ressaltar que a ACV é uma ferramenta de apoio à decisão, em que são apresentados ao tomador de decisão os potenciais impactos ambientais quantificados para o produto ou sistema analisado. De forma similar à ACV, tem-se o Custeio do Ciclo de Vida (CCV) e a Avaliação Social do Ciclo de Vida (S-ACV), que, quando aplicadas em conjunto, representam a Avaliação da Sustentabilidade do Ciclo de Vida (ASCV).

As principais barreiras à ACV são a necessidade de grande quantidade de dados, muitas vezes com limitações em relação à disponibilidade e qualidade desses dados, e a própria complexidade da modelagem. Entretanto, à medida que aumenta o reconhecimento da ACV como ferramenta estratégica para a produção e consumo sustentáveis, aumentam os esforços na construção e melhoria dos bancos de dados de inventário do ciclo de vida a fim de facilitar a execução dos estudos de ACV. A biotecnologia marinha, em função da riqueza de produtos, organismos e processos produtivos associados, configura-se como uma área com grande potencial de aplicação da ferramenta de ACV. Espera-se que, cada vez mais, os resultados da ACV contribuam para a formulação de políticas públicas que incentivem o desenvolvimento dessa área, principalmente no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ABNT (2009) **NBR ISO 14040: Gestão Ambiental – Avaliação do Ciclo de Vida – Princípios e Estrutura. Brasil & NBR ISO 14044: Requisitos e orientações.** Brasil.
- Aceró, A.P.; Rodríguez, C.; Cirolin, A. (2015) **LCIA Methods: Impact assessment methods in Life Cycle Assessment and their impact categories.** Available in <<https://www.openlca.org/wp-content/uploads/2015/11/LCIA-METHODS-v.1.5.4.pdf>>
- Alvarenga, R.A.F.; Galindro, B.M.; Helpa, C.F.; Soares, S.R. (2012) The Recycling Of Oyster Shells: An Environmental Analysis Using Life Cycle Assessment. **Journal Of Environmental Management.** 106. Elsevier Ltd: 102–9. Doi:10.1016/J.Jenvman.2012.04.017.
- European Union (2010) **ILCD Handbook: analysis of existing environmental impact assessment methodologies for use in Life Cycle Assessment.** Available in <<http://eplca.jrc.ec.europa.eu>>.
- Guinée, J.; Heijungs, R.; Huppes, G.; Zamagni, A.; Masoni, P.; Buonamici, R.; Ekvall, T.; Rydberg, T. (2011) Life Cycle Assessment: past, present, and future. **Environ. Sci. Technol.** 45: 90–96. Doi:10.1021/Es101316v.
- Pérez-López, P.; Perino, E.; Pronzato, R.; Manconi, R. Teresa, M. (2017) Life Cycle Assessment of in situ mariculture in the Mediterranean sea for the production of bioactive compounds from the sponge *Sarcotragus spinosulus*. **Journal of Cleaner Production.** 142: 4356–68. Doi:10.1016/J.Jclepro.2016.11.137.
- Santos, A.A.O.; Aubin, J.; Corson, M.S.; Valenti, W.C.; Camargo, A.F.M. (2015) Comparing environmental impacts of native and introduced freshwater prawn farming in Brazil and the influence of better effluent management using LCA. **Aquaculture.** 444. Elsevier B.V.: 151–59. Doi:10.1016/J.Aquaculture.2015.03.006.
- Seghetta, M.; Hou, X.; Bastianoni, S.; Bjerre, A.B.; Thomsen, M. (2016) Life Cycle Assessment of macroalgal biorefinery for the production of ethanol, proteins and fertilizers: A step towards a regenerative bioeconomy. **Journal of Cleaner Production.** 137. Elsevier Ltd: 1158–69. Doi:10.1016/J.Jclepro.2016.07.195.





# TOMADA DE DECISÃO MULTICRITÉRIO

Eduardo Infante<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de São João del Rei

## RESUMO

A Biotecnologia Marinha é a área da ciência que trata do desenvolvimento de drogas viáveis obtidas pela bioprospecção marinha e desenvolvimento de organismos geneticamente modificados para propósitos ambientais ou aquicultura. Neste capítulo, associa-se essa área temática com a Análise Multicritério, que possibilita a tomada de decisão de forma integrada, coesa e objetiva. Alguns métodos Multicritério aqui descritos são capazes de distinguir, selecionar, ordenar e classificar alternativas viáveis a partir da análise de critérios específicos dentro das áreas de atuação da Biotecnologia Marinha. A Análise Multicritério possibilita a otimização de decisões e garante eficiência no estudo específico da Biotecnologia Marinha.

# 1 TOMADA DE DECISÃO MULTICRITÉRIO

A análise multicritério surgiu nos anos 60, enquanto instrumento de apoio à decisão. É aplicada na análise comparativa de projetos alternativos ou medidas heterogêneas. Através dessa técnica podem ser levados em conta diversos critérios, em simultâneo, na análise de uma situação complexa. O método destina-se a ajudar os decisores políticos a integrar diferentes opções nas suas ações, refletindo sobre as opiniões de diferentes atores envolvidos num quadro prospectivo ou retrospectivo. A participação dos decisores políticos no processo é um dos elementos centrais da abordagem.

Os resultados, em geral, orientam decisões de natureza operacional ou para a apresentação de recomendações para futuras atividades. A avaliação multicritério pode ser organizada com o objetivo de produzir uma conclusão sintética simples no final da avaliação, ou com o objetivo de produzir conclusões adaptadas às preferências e prioridades de diferentes parceiros.

A análise multicritério é similar às técnicas adaptadas no campo do desenvolvimento organizacional ou gestão de sistemas de informação. Também se assemelha à análise custo-benefício, embora não reduza os fenômenos díspares a uma base unitária (monetária) comum.

## 1.1 VISÃO GERAL SOBRE TOMADA DE DECISÃO MULTICRITÉRIO

O apoio multicritério à decisão proporciona ao decisor algumas ferramentas que lhe possibilitam resolver problemas levando em consideração diferentes pontos de vista, muitas vezes contraditórios. Essa técnica pode ser definida como a atividade de um analista que, com base em modelos formalizados, busca respostas às questões colocadas pelos decisores ao longo do processo, levando, muitas vezes, a recomendações de ação ou simplesmente ao favorecimento de uma evolução do processo mais coerente com os objetivos e sistemas de valores dos decisores.

É importante ressaltar que os métodos de decisão multicritério não visam encontrar uma solução que seja uma verdade única representada pela ação selecionada, e sim apoiar o processo decisório. Portanto, tão importante quanto a qualidade da informação disponível é a forma de tratamento analítico aplicada.

### 1.1.1 ATORES DO PROCESSO DECISÓRIO

Todos os indivíduos ou grupo de pessoas, que participam direta ou indiretamente do processo decisório, podem ser considerados como atores. Entre os atores, têm-se os decisores, aos quais a atividade de apoio está especialmente dirigida, e os analistas de decisão.

Os seguintes atores estão envolvidos no processo de decisão:

- **Decisor:** exerce influência no processo de decisão de acordo com o juízo de valor que repre-

representa e/ou relações que se estabeleceram. É a pessoa e/ou instituição que estabelece os limites do problema, especifica os objetivos a serem alcançados e emite julgamentos. É aquele sobre quem normalmente recai o financiamento e/ou a responsabilidade legal/moral pela escolha.

- **Facilitador:** é um líder experiente que deve focalizar a sua atenção na resolução do problema, coordenando os pontos de vista dos decisores, mantendo o decisor motivado e destacando o aprendizado no processo de decisão. Seu papel é esclarecer e modelar o processo de avaliação e/ou negociação conducente à tomada de decisão, permanecendo sempre com uma postura neutra em relação ao processo decisório.
- **Analista:** é o que faz a análise, auxilia o facilitador e o decisor na estruturação do problema e identificação dos fatores do meio ambiente que influenciam na sua evolução, configuração e solução.

Para a tomada de decisão, existem também:

- **“grupos de decisão”,** ou *stakeholders*, na terminologia consagrada em inglês, que, mesmo não tendo responsabilidade formal pela escolha, conseguem, muitas vezes, por sua ação, participar ativamente do processo decisório; e
- **grupo dos terceiros,** que são aqueles grupos que não participam ativamente do processo de decisão, sendo, no entanto, afetados pelas consequências que dele decorrem, de maneira direta ou indireta.

Suas preferências precisam, portanto, ser consideradas pelos decisores.

### 1.1.2 PROBLEMÁTICAS DE REFERÊNCIA

No contexto do apoio à decisão, o resultado pretendido em determinado problema pode ser identificado entre quatro tipos de problemáticas de referência:

- **Problemática de Escolha –  $P_{\alpha}$ :** tem como objetivo esclarecer a decisão pela escolha de um subconjunto tão restrito quanto possível, tendo em vista a escolha final de uma única ação;
- **Problemática de Classificação –  $P_{\beta}$ :** tem como objetivo esclarecer a decisão por uma triagem resultante da alocação de cada ação a uma categoria (ou classe). As diferentes categorias são definidas *a priori* com base em normas aplicáveis ao conjunto de ações;
- **Problemática de Ordenação –  $P_{\gamma}$ :** tem como objetivo esclarecer a decisão por um arranjo obtido pelo reagrupamento de todas ou parte (as mais satisfatórias) das ações em classes de equivalência. Essas classes são ordenadas de modo completo ou parcial, conforme re-

ferências;

- **Problemática de Descrição – Pδ:** tem como objetivo esclarecer a decisão a ser tomada, por uma descrição, em linguagem apropriada, das ações e de suas consequências.

A maneira de formular o problema de decisão depende de se precisar a natureza do que se procura e do espírito da recomendação, podendo ser escolhida uma problemática, um caso especial de uma delas, uma sequência de mais de uma problemática ou até mesmo uma mistura diferente, quando não se verificar nenhuma das opções citadas.

## 1.2 CONCEITOS BÁSICOS

Decisão significa tomar uma atitude que faça com que um processo evolua ou não. Decidir ou tomar uma decisão pode interferir negativa ou positivamente num fluxo de rotinas de uma empresa, de um setor ou até mesmo em nossa vida pessoal. Daí a necessidade de se avaliar bem o ato, pois as consequências dele vão se refletir no sucesso de nossas escolhas.

É preciso analisar, avaliar e utilizar todas as ferramentas disponíveis, buscando sempre encontrar a melhor opção, entre simples ou complexas e específicas ou estratégicas etc. Nessa linha de raciocínio, as consequências de uma decisão podem ser imediatas, a curto e longo prazo ou combinar todas as formas apresentadas.

Decidir implica o processo de coletar informações, avaliar a importância destas e buscar alternativas de solução. Diariamente tomamos decisões. A todo momento avaliamos nossos atos, baseados nas informações obtidas através de conhecimento prévio, experiência ou coleta de dados. O simples fato de decidirmos comprar um móvel novo, por exemplo, leva-nos a analisar dados que podem influir em nossa decisão, por exemplo, o tamanho, a cor, o preço etc.

Partindo desse princípio, deparamo-nos com outros parâmetros a serem avaliados, como:

- **Durabilidade;**
- **Prazo de entrega;**
- **Conforto proporcionado;**
- **Tipo de material utilizado na confecção etc.**

A análise então é feita, de acordo com os quesitos apresentados, respeitando-se sua relevância.

Alguns conceitos fundamentais:

### 1.2.1 CRITÉRIO

Um critério pode ser definido como uma função  $g$  definida em um conjunto  $A$ , que toma seus valores em um conjunto totalmente ordenado, representando as preferências do decisor sob determinado ponto de vista.

De acordo com a estrutura de preferência verificada, os critérios classificam-se em:

- **Critério verdadeiro:** se a estrutura de preferência é uma estrutura de pré-ordem completa (modelo tradicional) – qualquer diferença implica preferência estrita.
- **Semicritério:** no caso de ser a estrutura de preferência uma estrutura de quase-ordem (modelo de limiar), existe uma zona de indecisão, variável ao longo da escala, entre a indiferença e a preferência estrita;
- **Critério de intervalo:** se a estrutura de preferência é uma estrutura de intervalo (modelo de limiar variável), existe uma zona de indecisão, variável ao longo da escala, entre indiferença e a preferência estrita;
- **Pseudocritério:** a estrutura de preferência é uma estrutura de pseudo-ordem (modelo duplo limiar) quando se evita uma passagem repentina entre a indiferença e a preferência estrita, existindo uma zona de hesitação, representada pela preferência fraca.

A avaliação de uma ação  $a$ , de acordo com o critério  $j$ , é representada por  $g_j$ . Nesse sentido, um problema de decisão multicritério é uma situação em que, tendo se definido um conjunto  $A$  de ações e uma família consistente  $F = \{g_1, \dots, g_j, \dots, g_n\}$  de critérios, se procede a uma (ou mais) das problemáticas citadas anteriormente.

### 1.2.2 RELAÇÃO DE DOMINÂNCIA

Dados dois elementos  $a$  e  $b$  de  $A$ ,  $a$  domina  $b$  ( $a D b$ ), se e somente se:

$$g_j(a) \geq g_j(b), j = 1, 2, \dots, n \quad (1)$$

onde pelo menos uma das inequações é estritamente dominante.

Uma ação  $a$  é não-dominada ou eficiente se e somente se nenhuma outra ação do conjunto  $A$  a domina. O conjunto de ações eficientes de  $A$  pode ser o próprio  $A$  se a relação de dominância é vazia, sendo geralmente considerado como um conjunto que contém as ações interessantes a serem analisadas com maior profundidade.

### 1.2.3 INFORMAÇÃO INTRACRITÉRIO E INTERCRITÉRIO

As informações intracritério correspondem às avaliações das alternativas, dentro de cada critério. Em teoria da utilidade, corresponde à própria função utilidade de um dado atributo. No caso mais geral, corresponde à função  $g_j(a)$ , para o critério  $j$ .

Em relação às informações intercritério, os conceitos de ponderação, compensação e independência merecem atenção especial quando da sua aplicação nos diversos métodos multicritério.

Muitos métodos traduzem a importância relativa entre os critérios em números, denominados *pesos*, embora essa noção esteja estreitamente relacionada com a forma como são levantados e com que objetivo são utilizados. Dessa forma, sugere-se um cuidado especial quando se utiliza a mesma ponderação em diferentes métodos para comparação de resultados.

No contexto de apoio à decisão, conhecer as preferências do decisor e determinar pesos dos critérios são questões muito difíceis e essenciais. No entanto, do ponto de vista prático, vários métodos têm sido propostos na literatura para estimar os “pesos” dos critérios.

A escolha da utilização de um método de agregação de critérios, como o MAUT (*Multi-Attribute Utility Theory*), por exemplo, é equivalente a escolher um tipo de “compensação entre os critérios”. Intuitivamente, o aspecto de compensação de um método sugere uma quantidade que contrabalance a desvantagem de um critério em relação à vantagem de um outro. Já os métodos não-compensatórios, métodos de sobreclassificação, requerem uma informação intercritério correspondente à relativa importância entre os critérios. Assim, os métodos compensatórios podem favorecer ações não balanceadas, ou seja, aquelas cuja performance é excelente sob algum aspecto, mas que é sofrível nos demais. Já os métodos compensatórios favorecem a ações mais balanceadas, o que significa que possuem um melhor desempenho médio.

No que diz respeito à independência dos critérios, é sabido que muitos métodos assumem a hipótese de independência preferencial entre os critérios, como no modelo aditivo, por exemplo, no qual os critérios podem ser analisados individualmente, sem sofrer interferências dos demais critérios. Em muitas aplicações práticas, torna-se difícil reduzir a uma família de critérios consistentes, na qual não exista relação de dependência entre eles. Por outro lado, a simples eliminação dos critérios fortemente dependentes pode levar a uma perda de informações indispensáveis, que não são necessariamente redundantes.

### 1.3 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE MULTICRITÉRIO

A análise multicritério é uma ferramenta de comparação, em que são tidos em conta vários pontos de vista, tornando-se dessa forma particularmente útil durante a formulação de uma conclusão sobre questões complexas. A análise pode ser aplicada com critérios de apreciação contraditórios (por exemplo, na comparação do emprego com o ambiente) ou quando for difícil a escolha entre os critérios. Em termos gerais, recorre-se a essa técnica principalmente em avaliações de intervenções e projetos públicos e suas variantes (o traçado de uma autoestrada, a construção de uma nova infraestrutura etc.).

Embora menos habitual, a análise multicritério tem sido igualmente aplicada em avaliações intercalares de programas. Contudo, é provável que tenha potencial para aplicações mais abrangentes em avaliações intercalares enquanto instrumento que contribui para a formulação de uma conclusão. No âmbito de programas de desenvolvimento socioeconômico, diz respeito a apreciações sobre o sucesso das diferentes medidas para efeitos de formulação de conclusões sintéticas. Essa apreciação tem em consideração os principais critérios pertinentes

para o grupo de acompanhamento e gestão da intervenção.

#### 1.4 ESPECIFICIDADES E OBJETIVOS

O objetivo da técnica consiste em estruturar e combinar as diferentes análises a ter em consideração no processo de tomada de decisão, sendo que a tomada de decisão se baseia em escolhas múltiplas e o tratamento dado a cada uma das escolhas condiciona, em grande medida, a decisão final. A análise multicritério será usada para retratar o raciocínio e as convicções subjetivas das diferentes partes interessadas sobre cada questão em particular. É, normalmente, usada para sintetizar opiniões expressadas, para determinar prioridades, para analisar situações de conflito, para formular recomendações ou proporcionar orientações de natureza operacional. As suas aplicações podem incluir, por exemplo:

- Fazer recomendações sobre a repartição de um orçamento, em um programa em curso ou durante a preparação do programa seguinte. As principais decisões a esse respeito são tomadas ao nível das medidas do programa. As medidas vistas como sendo as menos eficazes têm de ser reconsideradas com o intuito de reduzir os seus orçamentos ou reorganizá-las no sentido de melhorar a sua eficácia. Caso seja pertinente, também podem ser feitas recomendações para aumentar os orçamentos das medidas avaliadas como as “melhores”;
- Divulgar as melhores práticas, identificando áreas de sucesso e as medidas mais eficazes de um programa. A informação sobre as medidas consideradas como sendo as mais bem-sucedidas (melhores práticas) pode ser divulgada através de uma diversidade de meios, incluindo comunicação social, se as autoridades responsáveis pelo programa desejarem expor ao público a maneira como os fundos do programa foram gastos. A publicação de exemplos concretos das medidas mais bem-sucedidas pode ajudar a informar os gestores de medidas similares, financiadas por outras fontes;
- Dar o retorno (*feedback*) sobre os métodos de seleção de projetos. A escolha de critérios de avaliação, a sua precisa definição e a sua ponderação constituem uma contribuição útil para a análise multicritério. Esse trabalho possibilita formular uma descrição clara, completa e coerente das intenções e prioridades dos parceiros do programa. É então possível usar esses resultados para difundir mensagens claras aos gestores das medidas e ao corpo técnico responsável pela sua implementação;
- Melhorar o processo de seleção de projetos. É relativamente fácil transferir critérios, escalas de classificação e graus de ponderação para o sistema de seleção de projetos, se o sistema também estiver organizado com base num esquema de pontuação/ponderação. Baseando a seleção de projetos na mesma lógica da avaliação de medidas, aumentam-se as probabilidades de incentivar e financiar projetos que contribuam efetivamente para as prioridades dos programas.

A análise multicritério foi usada, por exemplo, para reunir as opiniões de diferentes parceiros e partes interessadas na avaliação de um programa de desenvolvimento regional co-financiado pelos três Fundos Estruturais Europeus e pelo governo da região de Walloon, na Bélgica. A análise multicritério ajusta-se bem à gestão e avaliação de programas estruturais em parceria, dado que as opiniões dos membros nacionais e supranacionais podem ser expressas em conjunto, sem perder nenhuma das suas especificidades, ou sem terem de fazer demasiadas concessões em relação às suas escalas de valor. No exemplo de Walloon, foi desenvolvida uma variante do método designada de análise “multicritério” (*multicriteria-multijudge*), que permitiu a cada parceiro construir a sua própria apreciação com base nos seus próprios critérios e elementos de ponderação.

### **BOX 1 - Exemplo de aplicação walloon**

A análise multicritério foi usada na avaliação de um programa de desenvolvimento regional co-financiado pelos três Fundos Estruturais Europeus e pelo governo da região de Walloon. O contexto da avaliação prendia-se com a intenção de afetar parte do orçamento durante o curso do programa.

O instrumento de análise multicritério foi escolhido pela sua característica “multi-apreciação” que possibilita a consideração de sistemas de ponderação específicos de cada parceiro. Oito critérios de avaliação foram definidos em acordo com os representantes de diferentes níveis de governação:

- **Viabilidade económico-financeira das empresas apoiadas;**
- **Empregabilidade dos beneficiários de formação;**
- **Diversificação setorial da economia;**
- **Abertura da economia;**
- **Integração ambiental da atividade;**
- **Distribuição territorial da atividade;**
- **Serviços a empresa;**
- **Sinergias entre as diferentes componentes do programa.**

Em primeiro lugar, pediu-se aos gestores das medidas para avaliarem a eficácia de cada uma das medidas no âmbito do programa, através de entrevistas, em que foram atribuídas pontuações à eficácia de cada medida face aos critérios. Como era de se esperar, os resultados revelaram grandes diferenças nas pontuações atribuídas à eficácia, dependendo das medidas e dos critérios.

Em segundo lugar, através de um procedimento com base em entrevistas formais, seis “juizes” (dois membros da Comissão Europeia, dois do governo de Walloon e dois da Região de Hainaut) estabeleceram uma ponderação para cada um dos critérios usados, com base na importância que lhes era atribuída.

Mais uma vez, os resultados foram muito diversos, refletindo os diferentes núcleos de interesse (por exemplo, as pontuações relativas ao critério de viabilidade das empresas variaram entre 3 e 26 pontos). Depois de serem processadas em computador, as medidas foram classificadas por ordem de eficácia, tendo em conta o fato de haver uma escala para cada juiz (dado que cada um tinha o seu próprio sistema de ponderação dos critérios). Apesar das diferenças de opinião – entre os gestores, sobre as pon-

tuações atribuídas à eficácia, e entre os juízes, sobre a ponderação dos critérios – as várias classificações convergiram em função de um resultado virtualmente idêntico sobre o valor relativo das medidas entre si. A compreensão dos valores relativos atribuídos foi de utilidade considerável para os decisores políticos, em particular, no contexto das decisões sobre a redistribuição dos orçamentos.

**Fonte: MEANS Handbook nº 4 (1995). *Applying the Multicriteria Method to the Evaluation of Structural Programmes*. Bruxelas: União Europeia.**

## 1.5 PRINCÍPIOS E PROCESSOS PARA A TOMADA DE DECISÃO MULTICRITÉRIO

As primeiras publicações catalogadas do auxílio à decisão multicritério remontam ao final da década de 1960.

O auxílio multicritério à decisão é denominado, pela escola francesa, Análise Multicritério e, pela escola americana, Métodos Multicritérios de Auxílio à Decisão (MCDA – *Multiple Criteria Decision-Aid*) ou Tomada de Decisão Multicritério (MCDM – *Multiple Criteria Decision Making*).

Quanto aos estudos em MCDA, a corrente europeia se distingue da corrente americana em relação ao uso e às definições dos métodos multicritério. A corrente americana concentra seus esforços no descobrimento e descrição do tomador de decisões, além de tomar como base teoremas, corolários, conceitos e axiomas na busca da “solução ótima”. Já a vertente europeia busca encontrar a “solução de melhor compromisso”, a qual se entende que, no caso de múltiplos critérios, é impossível pensar em solução ótima.

Sendo vários os métodos de análise multicritério, são várias também as classificações dos mesmos. A escola americana classifica esses métodos segundo as técnicas de resolução dos problemas, enquanto a europeia apresenta uma classificação de acordo com o tipo de agregação, admitindo que a linha que separa as categorias é um tanto vaga:

**CLASSE I – Programação Matemática Multiobjetivo:** esta categoria engloba os métodos que têm como base a busca das soluções não dominadas; em geral, as alternativas não estão explícitas, mas representadas por um conjunto de restrições;

**CLASSE II – Teoria da Utilidade Multiatributo:** este conjunto abrange os métodos que procuram modelar as preferências do decisor através da função de valor, que representa a decisão do tomador de decisões;

**CLASSE III – Relações das Aproximações Hierárquicas:** os métodos relacionados nesta categoria são muito utilizados pela escola europeia, devido ao fato de não haver um direcionamento nas decisões; dentre esses métodos, podem-se destacar as famílias PROMETHEE e ELECTRE, os métodos da incerteza de hierarquização, entre outros;

**CLASSE IV – Métodos Baseados na Desagregação de Preferências:** esta categoria se

assemelha à da Teoria da Utilidade Multiatributo, diferindo apenas pelo fato de que seus parâmetros são indiretamente estimados e o problema principal é estimar uma função utilidade aditiva.

Há uma classificação dos métodos de auxílio à decisão multicritérios em três grandes famílias, a saber:

- **Teoria da utilidade com múltiplos atributos:** esta família tem inspiração americana e consiste na agregação de diversos pontos de vista em uma única função, a qual deverá ser otimizada;
- **Métodos de ordenamento:** nesta família, primeiramente se constrói uma relação (relação de ordenamento), a qual representa as preferências fortes do tomador de decisões. Na sequência, tem-se uma exploração das relações de ordenamento para auxiliar o tomador de decisões a resolver seu problema. Esta família tem inspiração na escola francesa;
- **Métodos interativos:** os métodos interativos se caracterizam por alternar passos de cálculo e de diálogo com o tomador de decisões, o qual fornece informações extras sobre suas preferências.

Através dos modelos multicritérios, o “decisor” poderá estimar as possíveis implicações de cada curso de ação, de modo a obter uma melhor compreensão das vinculações entre suas ações e seus objetivos. O desafio é identificar, entre critérios conhecidos ou implícitos, quais são relevantes para o problema de decisão.

O auxílio à decisão multicritério é considerado um conjunto de ferramentas que permite ao tomador de decisões um avanço, na resolução de problemas de decisão que possuem vários pontos de vista, os quais devem ser levados em conta na decisão. Em geral, não existe qualquer solução ótima sob todos os pontos de vista apresentados.

A análise multicritério estrutura um problema, com o objetivo de criar um modelo lógico para o mesmo, através de uma abordagem sistemática para a tomada de decisão. A estruturação do problema pode se dar através da compartimentação do mesmo em seus elementos, objetivando maior facilidade no tratamento dos dados.

A abordagem proposta pelas análises multicritério procura resolver problemas de decisão que possuem mais de um objetivo, em que as incertezas ou conflito entre objetivos se apresentam em inúmeros patamares e de vários tipos, formando um complexo quadro desses objetivos, causando uma dificuldade de identificação pelo agente decisor da avaliação das alternativas.

A forma de tratamento analítico da informação é, inquestionavelmente, tão importante quanto a própria qualidade da informação disponível ao longo do processo de resolução de um problema complexo. Fundamentalmente, ela deve agregar valor à qualidade da informação, havendo, por conseguinte, uma relação estreita entre a qualidade da informação e a qualidade do apoio à tomada de decisão. Conseqüentemente, os resultados obtidos pela análise multicritérios

dependem do conjunto de ações consideradas, da qualidade dos dados, da escolha e estruturação dos critérios, dos valores de ponderação atribuídos aos critérios, do método de agregação utilizado e da participação dos diferentes atores.

### 1.5.1 A MATRIZ DE DESEMPENHO: ALTERNATIVAS, CRITÉRIOS E INDICADORES

É necessário apresentar alguns conceitos básicos para melhor compreensão do modelo multicritério:

- **Atores:** são indivíduos, entidades, ou grupo de pessoas que possuem interesse na decisão a ser tomada, pois serão afetados direta ou indiretamente por ela;
- **Decisor:** é formado por um indivíduo ou grupo que possui o mais importante papel no processo de tomada de decisão, pois tem a função de avaliar as alternativas do problema e identificar a melhor alternativa de acordo com sua relação de preferência;
- **Analista:** é considerado como especialista ou consultor em multicritério; pode ser uma pessoa ou uma equipe que tem a função de auxiliar o processo decisório.
- **Alternativas ou ações potenciais:** consiste no conjunto de opções possíveis com base no qual o decisor fará sua escolha;
- **Crítérios ou atributos:** em muitos problemas de decisão, verifica-se que há mais de um objetivo a ser atingido que são denominados de conjunto de critérios ou atributos. Os critérios são utilizados como parâmetros de avaliação para o conjunto de alternativas. Por meio da definição dos critérios do problema podem-se utilizar estes para fazer comparações entre as alternativas;
- **Matriz de Avaliação:** também chamada matriz de decisão, é aquela que apresenta as alternativas com relação aos  $n$  critérios de avaliação;
- **Escalas:** muitos dos critérios podem ter caráter quantitativo ou qualitativo. Uma avaliação de escala tem como propósito graduar um fator, visto que a natureza dos critérios é bastante heterogênea;
- **Tipos de Problemáticas:** durante a estruturação de um processo de tomada de decisão, faz-se necessário verificar o tipo de problemática na qual está inserida a decisão. Na literatura, definem-se quatro tipos de problemáticas: escolha, classificação, ordenação e descritiva. A problemática de escolha ( $P_\alpha$ ) tem como objetivo selecionar uma alternativa ou um subconjunto de alternativas dentro de um conjunto de ações possíveis. A problemática de classificação ( $P_\beta$ ) tem a finalidade de alocar as ações dentro de uma classe ou categoria. Já na problemática de ordenação ( $P_\gamma$ ) procura-se obter um subconjunto de forma que seus

elementos sejam ordenados. No que diz respeito à problemática descritiva (Pδ), busca-se descrever e detalhar as ações de um conjunto e suas consequências.

- **Modelagem de Preferência:** realizar esta modelagem significa estudar a relação de preferência ou desejabilidade de um decisor diante de duas ações potenciais. Modelar preferência;
- **Análise de Sensibilidade:** consiste em estudar como as variações nos parâmetros do problema influenciam em seus resultados;

A estruturação do processo de decisão tem origem no século XVIII. Nessa época de estudo puderam-se identificar duas das principais fases de apoio multicritério à decisão: a estruturação e a avaliação.

Foi somente em 1969, durante o VII Simpósio de Programação Matemática, que foi apresentada uma seção sobre a organização de funções de múltiplos objetivos. Após a década de 1970, começaram a surgir novos métodos voltados para problemas de decisão com múltiplos critérios com abordagens diferenciadas.

O interesse pelo estudo do processo de tomada de decisão fez com que houvesse grande evolução neste tema. Atualmente, metodologias multicritérios são amplamente empregadas em diversas organizações, com a aplicação de sistemas complexos de apoio à decisão. Assim, é de grande valia analisar os elementos e as etapas do processo de apoio à decisão multicritério.

O processo de apoio multicritério de decisão é exemplificado na Figura 1, com as principais variáveis do processo. A figura representa os estágios do processo da metodologia multicritério desde a identificação do problema até o desenvolvimento de um plano de ação com os resultados obtidos. No processo, são apresentadas três fases principais – estruturação do problema, construção do modelo e a utilização do modelo para informar – para um ciclo de cinco fases. Os autores descrevem as três fases da seguinte forma:

1. **Estruturação do problema** – é a fase que tem como característica o pensamento divergente, em que se amplia a questão em estudo, para investigar e comprovar o seu grau de complexidade.
2. **Construindo o modelo** – modalidade em que a forma de pensar é mais convergente. O processo consiste em extrair a essência da questão por meio de uma representação complexa de forma a agregar maiores detalhes e informações mais precisas.
3. **Utilizando o modelo para informar** – esta é a fase em que se precisa pensar com criatividade sobre as opções a serem implementadas, além de realizar síntese sobre os resultados obtidos.

### 1.5.2 MODELAGEM MULTICRITÉRIO: PRINCÍPIOS BÁSICOS

Os principais passos para a implementação da análise multicritério podem ser dividi-

dos em diversas fases, descritas abaixo por ordem sequencial. É possível repetir as fases e, assim, efetuar as devidas correções.

- **Fase 1. Definição dos projetos ou ações para apreciação:** esta definição envolverá um inventário das ações programadas e implementadas, ou dos elementos sobre os quais será realizada a apreciação comparativa.
- **Fase 2. Definição dos critérios de apreciação:** deve ser dada particular atenção à definição dos critérios, de forma a serem tão exaustivos quanto possível; as questões devem igualmente ser definidas de forma adequada. Os critérios devem refletir as preferências dos decisores políticos e diferentes pontos de vista, de modo a resumir e a reunir as diversas dimensões tipo usadas para avaliar uma ação.

Uma questão de máxima importância na análise multicritério é o envolvimento, ou não, dos diferentes atores na definição dos critérios e na sua respectiva ponderação. Se o avaliador estiver ativamente envolvido na análise, a credibilidade dos resultados é prejudicada. Por outro lado, quando os parceiros e diferentes partes interessadas na avaliação participam na definição dos critérios, cada interveniente prolongará a discussão até se encontrar pelo menos um critério de apreciação que coloque a sua ação “preferida” na primeira posição. Em geral, os responsáveis que “encomendaram” a avaliação terão a palavra final na especificação dos critérios. Nessa fase, a equipe de avaliação deve verificar se os critérios escolhidos são logicamente independentes uns dos outros.

## 1.6 PRINCIPAIS MÉTODOS MULTICRITÉRIO DE APOIO À DECISÃO

Considerando a importância dos métodos multicritério no tratamento da realidade humana, várias abordagens têm sido propostas. Todas substituem a busca da solução ótima por aquelas soluções de melhor compromisso.

Os métodos são divididos em três grandes grupos ou famílias de abordagens que se referem aos princípios de modelagem de preferência. Pode-se distinguir então, a abordagem do critério único de síntese, a abordagem da sobreclassificação, e do julgamento interativo (Roy, 1985). A abordagem do julgamento interativo não é abordada neste trabalho.

### 1.6.1 ABORDAGEM DO CRITÉRIO ÚNICO DE SÍNTESE

Idealizada pela Escola Americana, essa abordagem consiste na agregação de diferentes pontos de vista em uma única função que deve ser subsequentemente otimizada. Consiste em substituir o problema multicritério inicial:

$$\text{Max} \{f_1(x), f_2(x), \dots, f_j(x), \dots, f_k(x) \mid x \in A\} \quad (2)$$

onde  $A$  é um conjunto finito de  $n$  ações potenciais e  $\{f_j(\cdot), j = 1, 2, \dots, k\}$ , um conjunto de critérios

de avaliação, pelo problema multicritério seguinte:

$$\text{Max } \{U(x) \mid x \in A\} \tag{3}$$

onde  $U(x)$  chamado função utilidade ou função de valor é do tipo:

$$U(x) = U[f_1(x), f_2(x), \dots, f_j(x), \dots, f_k(x)] \tag{4}$$

e agrega  $k$  critérios em um único critério de síntese.

A utilização de uma função utilidade possibilita ordenar as soluções da melhor à pior, permitindo que seja tratada tanto a problemática de escolha quanto a de ordenação. O método mais abordado é a Teoria da Utilidade Multiatributo (MAUT). O VIP (*Variable Interdependent Parameters*) Analysis também será apresentado.

**Teoria da Utilidade Multiatributo (MAUT)**

A MAUT derivou da teoria da utilidade, incorporando a esta a questão do tratamento de problemas com múltiplos objetivos. A ideia básica da teoria da utilidade é a quantificação do desejo do decisor pelos bens que poderá ter, associando a esses bens um valor que represente um critério de escolha por parte do decisor.

No conjunto de métodos de apoio multicritério à decisão, esse é o único que recebe o nome de teoria. Essa distinção está associada à forma como se obtém a função utilidade multiatributo. Como teoria, a determinação da função está associada à confirmação da relação que existe entre a estrutura axiomática da teoria e a estrutura de preferências do decisor. Como método, essa confirmação não é efetuada, pelo menos em alguns estágios do processo de análise.

A MAUT inicia-se com a avaliação de várias condições de independência sobre as atitudes do decisor acerca de suas preferências relativas ao problema que se está analisando e, em seguida, obtém-se uma forma funcional consistente com as condições consideradas.

Essa forma funcional consistente deve agregar as funções de utilidade de cada atributo na forma:

$$u(x_1, x_2, \dots, x_n) = f[u_1(x_1), u_2(x_2), \dots, u_n(x_n)] \tag{5}$$

A forma mais utilizada para a função de utilidade multiatributo é a função de utilidade aditiva:

$$u(a) = \sum_{j=1}^n k_j u_j(a) \tag{6}$$

Nessa expressão,  $u_j(a)$  representa a função utilidade unidimensional da alternativa  $a$  segundo o  $j$ -ésimo atributo e  $k_j$  (com  $k_j > 0$ ) representa uma constante de escala relativa ao  $j$ -ésimo atributo, frequentemente chamado de peso. No entanto, essa função só pode ser usada se as

condições de preferência forem satisfeitas, uma vez que essas constantes  $k$  têm a função de trazer a utilidade de determinado atributo para a escala que será utilizada na função de utilidade aditiva.

Alguns autores apresentam uma metodologia que permite a determinação da função utilidade por um processo composto de cinco etapas que proporcionam a intensificação de aspectos importantes do problema e permitem uma discussão mais profunda entre o analista e o decisor sobre as variáveis que compõem a estrutura do problema. As cinco etapas que compõem a metodologia para a elicitação da função utilidade multiatributo são:

- Preparação do decisor para a avaliação;
- Identificação da independência;
- Avaliação da função utilidade condicional;
- Avaliação das constantes de escala;
- Checagem da consistência.

### O método VIP Analysis

O propósito do *VIP Analysis* é apoiar a avaliação de um conjunto de alternativas discretas, no intuito de escolher a preferida, de acordo com a função de valor aditiva multiatributo. O valor global de uma alternativa  $a_i$  é a soma de seus valores para os  $n$  critérios  $(v_1(a_i), \dots, v_n(a_i))$ , ponderados por  $n$  pesos escalares  $k = (k_1, k_2, \dots, k_n)$ :

$$v(a_i, k) = \sum_{j=1}^n k_j v_j(a_i), \text{ com } \sum_{j=1}^n k_j = 1 \text{ e } k_j \geq 0. \quad (7)$$

Uma das mais difíceis partes do processo de decisão é a determinação desses parâmetros, uma vez que irão refletir as preferências e os *trade-offs* do decisor. No entanto, além de os decisores acharem difícil fornecer informações precisas sobre suas preferências, essas preferências podem mudar à medida que o processo decisório se desenvolve, além de divergirem, frequentemente, em situações de decisão em grupo.

As informações parciais nesse método dizem respeito apenas aos parâmetros de importância  $k = (k_1, k_2, \dots, k_n)$ , assumindo-se que as restrições que definem  $K$  são lineares. Essas restrições podem limitar os pesos através de limites superior e inferior, como também podem relacionar os pesos entre si, impondo um ordenamento definido pelo decisor e restrições para os *trade-offs*. Respectivamente, estas restrições podem ser do tipo:

$$l_j \leq k_j \leq L_j \quad (8)$$

$$k_1 \leq k_2 \quad (9)$$

$$k_2/k_1 \geq 0,5 \tag{10}$$

Dessa forma, se o decisor estiver em dúvida na determinação dos valores precisos dos pesos, ele pode achar mais fácil ordená-los, por exemplo.  $K$  denota o conjunto de todas as combinações dos valores dos parâmetros que satisfaçam todas as restrições estabelecidas.

Os resultados obtidos pelo *VIP Analysis* para um conjunto  $K$  de combinações de valores para os parâmetros de importância e um conjunto  $A = \{a_1, a_2, \dots, a_n\}$  de alternativas incluem:

- Um intervalo de variação de valores para cada alternativa  $a_i$ , do  $\min \{V(a_i, k): k \in K\}$ . Se o maior valor possível de uma alternativa  $a_x$  é sempre menor do que o menor valor possível para uma alternativa  $a_y$ , então a primeira alternativa pode ser descartada;
- A maior diferença de valor para cada par ordenado de alternativas  $(a_i, a_j) \in A^2$ , ou seja,  $\max \{V(a_i, k) - V(a_j, k): k \in K\}$ . Se a diferença máxima é negativa ou nula, então  $V(a_i, p) \geq V(a_j, p) \forall p \in P$ , que é denotado como  $a_j \Delta a_i$  ( $a_j$  domina  $a_i$ ). Se a diferença máxima não excede o parâmetro  $\epsilon$ , então  $V(a_i, k) \geq V(a_j, k) - \epsilon \forall k \in K$ , que é denotado por  $a_j \Delta_\epsilon a_i$  ( $a_j$  quase-domina  $a_i$ , com tolerância  $\epsilon$ );

$$\text{Arrependimento}_{\max}(a_i) = \max_{k \in K} \{ \max_{j=1, \dots, m} \{V(a_j, k)\} - V(a_i, k) \} \tag{11}$$

Se  $\text{Arrependimento}_{\max}(a_i) = 0$  então podemos dizer que  $a_i$  é ótimo; se

$\text{Arrependimento}_{\max}(a_i) \leq \epsilon$ , pode-se dizer que  $a_i$  é quase-ótimo com tolerância  $\epsilon$ .

A realização de uma análise de sensibilidade *a posteriori* para os pesos não é necessária, uma vez que todas as suas combinações consideradas aceitáveis pelo decisor são investigadas, o que possibilita a obtenção de uma conclusão mais robusta.

### 1.6.2 ABORDAGEM DE SOBRECLASSIFICAÇÃO (OUTRANKING OU SURCLASSEMENT)

Idealizada pela Escola Francesa, essa abordagem consiste na construção das relações de sobreclassificação, ou *surclassement*, que representam as preferências estabelecidas pelo decisor, e sua posterior exploração, de forma a apoiá-lo na solução do problema.

A ideia básica desses métodos de sobreclassificação consiste no enriquecimento das relações de dominância. Evitam, dessa forma, hipóteses matemáticas muito rígidas e questionamentos intrigantes ao decisor, exigidos pela teoria da utilidade multiatributo, e que introduzem uma série de dificuldades na modelagem de problemas reais.

Requerem uma informação intercritério correspondente à relativa importância entre os critérios – dessa forma, esses métodos favorecem as ações mais balanceadas, que possuem melhor performance média. O Condorcet foi o primeiro método que introduziu uma ideia similar ao método de sobreclassificação.

Destacam-se nesse método as famílias ELECTRE e PROMETHEE.

## Métodos da família ELECTRE

A família ELECTRE (*Elimination et Choix Traduisant la Réalité*), de origem francesa, tem o intuito de obter um subconjunto de  $N$  alternativas, que sobreclassificam as que não entraram no subconjunto  $N$ . O procedimento é continuado até se obter um pequeno subconjunto, representado por alternativas de melhor compromisso com o problema.

Dito de outra forma, o método ELECTRE se propõe reduzir o tamanho do conjunto de alternativas, explorando o conceito de dominância. É utilizado um índice de concordância  $C(a,b)$  para medir a vantagem relativa de cada alternativa sobre todas as outras. De forma similar, é definido um índice de discordância  $D(a,b)$ , que mede a relativa desvantagem.

É assumido que o decisor é capaz de fornecer informações intercritérios, que refletem a importância relativa entre os  $k$  objetivos, ou seja, pesos dos critérios. Esses pesos podem ser decorrentes de cálculos técnicos ou de expressões de julgamento de valor.

As seguintes versões do ELECTRE são apresentadas, cada uma aplicável a um caso diferente:

**ELECTRE I:** indicado para problemáticas de escolha ( $P, \alpha$ ), busca selecionar um conjunto de alternativas dominantes;

**ELECTRE II:** adequado para problemáticas de ordenação ( $P, \gamma$ ), resulta numa ordenação das alternativas não dominadas;

**ELECTRE III:** aplicável aos casos em que a família de pseudocritério se verifica, sendo indicado para problemáticas de ordenação ( $P, \gamma$ );

**ELECTRE IV:** é igualmente aplicado nos casos em que a família de pseudocritério se verifica. Sua característica principal consiste na não-utilização de ponderação associada à importância relativa dos critérios, sendo indicado para problemáticas de ordenação ( $P, \gamma$ );

**ELECTRE IS:** indicado para problemáticas de escolha ( $P, \alpha$ ) e para a família de estrutura de pseudocritério;

**ELECTRE TRI:** aplicável aos casos da família de pseudocritério, sendo indicado para problemáticas de classificação ( $P, \beta$ ).

As versões apresentadas neste trabalho são as do ELECTRE III e IV. Isso deve-se ao fato de atualização dos *softwares* e aplicações na literatura. Para a contextualização multicritério da escola europeia, hoje, a utilização desses dois métodos é recorrente e mais importante.

## O métodos ELECTRE III

O método ELECTRE III introduz ao modelo acima descrito um valor limiar de preferência

$p_j$  e um valor limiar de indiferença  $q_j$ , a cada critério  $g_j$ . Dessa maneira o tomador de decisões pode estabelecer um intervalo de valores no qual uma ação é estritamente preferível à outra e um intervalo no qual uma ação é indiferente à outra. Com a introdução destes limites, as relações de preferência ficam da seguinte maneira:

$$aPb: a \text{ é preferível a } b, \text{ se } g_j(a) > g_j(b) + p_j \tag{12}$$

$$alb: a \text{ é indiferente a } b, \text{ se } |g_j(a) - g_j(b)| \leq q_j \tag{13}$$

Estes limiares de indiferença e preferência são estabelecidos pelo tomador de decisão, sendo que os mesmos mostram o grau de sensibilidade que o decisor deseja ao comparar duas ações. Como a mudança de indiferença para preferência estrita não ocorre em um ponto, pode-se estabelecer uma faixa de valores, que se denomina zona de preferência fraca. Com isso, as relações anteriormente citadas apresentam-se da seguinte forma:

$$aPb: a \text{ é estritamente preferível a } b, \text{ se } g_j(a) > g_j(b) + p_j \tag{14}$$

$$aQb: a \text{ tem preferência fraca a } b, \text{ se } g_j(b) + q_j(b) < g_j(a) \leq g_j(b) + p_j \tag{15}$$

$$alb: a \text{ é indiferente a } b, \text{ se } g_j(b) - q_j \leq g_j(a) \leq g_j(b) + q_j \tag{16}$$

Através destes limites, os métodos ELECTRE estabelecem uma relação de hierarquização denotada por  $S$ , onde uma ação  $aSb$ , ou seja, a ação “ $a$  é, no mínimo, tão boa quanto  $b$ ” ou “ $a$  não é pior que  $b$ ”. Essa relação deverá ser analisada para cada critério  $j$ . Dessa maneira, a notação é  $aS_jb$  ( $a$  é, no mínimo, tão bom quanto  $b$ , para o critério  $j$ ).

Cabe aqui comentar que a introdução dos limiares de preferência ( $p$ ) e indiferença ( $q$ ) redefine os critérios em pseudocritérios, pois a diferença entre  $g_j(a)$  e  $g_j(b)$  deixa de ser apenas avaliada pelo valor, para o referido critério, e passa a se estabelecer uma zona de indiferença, através destes limites ( $p$  e  $q$ ). Optou-se pela comodidade em chamar os critérios de critérios e não pseudocritérios, porém o leitor deve ter em mente a explicação anterior.

Dois novas definições são apresentadas, no intuito de desenvolver as relações de hierarquização: os conceitos de concordância e discordância:

- O critério  $j$  está em concordância com a afirmação  $aSb$  se e somente se  $aS_jb$ . Isto é, se  $g_j(a) \geq g_j(b) - q_j$ . Desse modo, até mesmo se  $g_j(a)$  é menor que  $g_j(b)$  para uma quantidade até  $q_j$ , isso não contradiz a afirmação  $aS_jb$  e então está em concordância com tal afirmação;
- O critério  $j$  está em discordância com a afirmação  $aSb$  se e somente se  $bS_ja$ . Isto é, se  $g_j(b) \geq g_j(a) + p_j$ . Isto é, se  $b$  for estritamente preferível a  $a$  pelo critério  $j$ , então torna-se clara a não-concordância com a afirmação  $aSb$ .

A análise anteriormente apresentada procura avaliar a afirmação  $aSb$ , ou seja, se  $a$  é,

no mínimo, tão bom quanto  $b$ . Partindo-se desta análise, torna-se necessário determinar quão forte é a afirmação  $a \geq b$ . Essa determinação é realizada através do chamado índice de concordância "C", para cada par de ações  $a$  e  $b$ .

O índice  $C(a,b)$ , para as ações  $a$  e  $b$ , é definido da seguinte maneira:

$$C(a,b) = \frac{1}{k} \cdot \sum_{j=1}^n k_j \cdot c_j(a,b) \tag{17}$$

onde:

$C(a,b)$  – índice de concordância das ações  $a$  e  $b$ ;

$k$  – soma dos pesos de todos os critérios;

$k_j$  – peso do critério  $j$ , para  $j = 1, 2, 3, \dots, n$ ;

$c_j$  – índice de concordância das ações  $a$  e  $b$ , sob o critério  $j$ .

Os valores para o índice de concordância  $c_j$  são dados pela função linear por partes, a saber:

$$c_j(a,b) = \begin{cases} 1 & \text{se } g_i(a) + q_i(b) \geq g_i(b) \\ 0 & \text{se } g_i(a) + p_i(b) \leq g_i(b) \\ p_i + g_i(a) - g_i(b) & \text{nos demais casos} \\ & p_j - q_j \end{cases} \tag{18}$$

O índice de concordância  $C(a,b)$  representa, em porcentagem, em função de todos os critérios analisados e para cada par  $(a,b)$  de ações, o quanto se concorda com a afirmação de que a ação  $a$  é tão boa quanto  $b$ .

Na análise multicritério, realizada pelo método ELECTRE, além do índice de concordância, tem-se o índice de discordância, o qual mede quanto se discorda da afirmação  $a \geq b$ . Neste ponto, surge uma das inovações do método ELECTRE III, com a introdução de um novo limiar, o chamado limiar de veto  $v$ . O limiar de veto  $v$  é aquele valor tal que, a partir dele, a afirmação  $a \geq b$  é refutada, ou seja, não existe possibilidade de  $a$  ser, no mínimo, tão bom quanto  $b$ , neste caso ocorre que  $g_j(b) \geq g_j(a) + v_j$ .

O índice de discordância é determinado da seguinte maneira:

$$d_i(a,b) = \begin{cases} 1 & \text{se } g_i(a) + v_i \leq g_i(b) \\ 0 & \text{se } g_i(a) + p_i \geq g_i(b) \\ g_i(b) - g_i(a) - p_i & \text{nos demais casos} \\ & v_j - p_j \end{cases} \tag{19}$$

Para a definição do ordenamento final são apresentadas as seguintes regras de classificação:

- Se  $a$  é preferível a  $b$ , dentro das duas pré-classificações, então  $a$  será preferível a  $b$  no ordenamento final;

- Se  $a$  é equivalente a  $b$ , em uma das pré-classificações, mas ela é preferível na outra, então  $a$  é preferível a  $b$ ;
- Se  $a$  é preferível a  $b$  em uma das pré-classificações, mas na outra pré-classificação  $b$  é preferível a  $a$ , então as duas ações serão incomparáveis entre si.

Após a análise realizada, faz-se necessária uma análise de robustez dos resultados apresentados. Essa análise é realizada variando-se os parâmetros, pesos e limites de preferência, indiferença e veto, estabelecidos originalmente, no intuito de determinar o domínio de variação de certos parâmetros dentro do qual uma recomendação permaneça estável. Serve para fornecer ao decisor uma recomendação sintética e robusta, que o informe quanto à capacidade da solução proposta de resistir às variações entre a realidade e o modelo pressuposto para representá-la.

### **O método ELECTRE IV**

O método ELECTRE IV baseia-se numa família de pseudocritérios, tendo como objetivo ordenar as alternativas sem introduzir qualquer ponderação entre esses critérios. Pode-se dizer que, de forma geral, a estrutura desse método é mais simples que as demais, uma vez que, como o ELECTRE III, utiliza os critérios associados a um limite de preferência estrita ( $p$ ) e a um limite de indiferença ( $q$ ), em vez de utilizar as noções de concordância e discordância.

Dessa forma, o ELECTRE IV destina-se à problemática de ordenação, sem a atribuição de pesos (importância relativa) aos critérios. Algumas razões podem ser citadas, que tornam o estabelecimento dos pesos dos critérios difícil:

- A existência de vários atores envolvidos no processo de decisão;
- Não se pode impor o sistema de valor de um decisor;
- Os sistemas de valores (as opiniões) de cada um podem ser incompatíveis quantitativamente;
- Não haver razões científicas de se selecionar uma forma de dar pesos aos critérios quando objetivos políticos estão envolvidos.

As relações de sobreclassificação são então definidas por referência direta aos níveis de performance das alternativas. Duas relações de sobreclassificação são construídas:

**Sobreclassificação Forte – aSFb:** uma alternativa  $a$  sobreclassifica fortemente uma alternativa  $b$  se não existe critério em que  $b$  seja estritamente preferível a  $a$  e o número de critérios nos quais  $b$  é fracamente preferível a  $a$  é no máximo igual ao número de critérios em que  $a$  é preferível (fortemente ou fracamente) a  $b$ .

**Sobreclassificação Fraca – aSfb:**  $a$  sobreclassifica fracamente  $b$ , se:

- Não existe critério em que  $b$  seja fortemente preferível a  $a$ , embora a segunda condição para sobreclassificação forte não seja satisfeita, ou;
- $b$  é estritamente preferível a  $a$  em um único critério, sob condição de que  $a$  seja estritamente preferível a  $b$  em pelo menos metade dos critérios, e que a diferença em favor de  $b$  não seja maior do que o limiar de veto.

Da mesma forma que o ELECTRE III, a exploração das relações de sobreclassificação é realizada usando-se os processos de destilação ascendente e descendente, resultando na ordenação das alternativas da melhor para a pior, sendo o presente método mais simples pelo fato de haver só dois níveis de sobreclassificação. O conceito de qualificação é usado baseado nas relações de sobreclassificação forte ou fraca, para definir as duas ordenações. A qualificação inicial das alternativas é determinada pela relação de sobreclassificação forte. A relação fraca é usada para distinguir, se possível, entre aquelas alternativas que têm o mesmo valor de qualificação inicial.

Para a exploração da relação de sobreclassificação, determina-se o subconjunto de alternativas que possuem as melhores qualificações de  $A$  para  $SF$ . A qualificação de  $A$  é o número de alternativas sobreclassificadas por  $a$ , menos o número de alternativas que sobreclassificam  $a$ . Exclui-se esse subconjunto da análise e refaz-se o procedimento com o conjunto das alternativas restantes com um grau menor de qualificação. Se o subconjunto tem mais de uma alternativa, o mesmo procedimento é realizado considerando-se a relação de  $Sf$ . Esse procedimento descendente é continuado até que fique apenas uma alternativa de  $A$ , portanto forme-se uma pré-ordem completa. A segunda pré-ordem é construída por um procedimento similar, sendo ascendente, ou seja, inicia-se pelo conjunto das piores qualificações.

### **Métodos da Família PROMETHEE**

O método PROMETHEE (*Preference Ranking Organization Method for Enrichment Evaluation*) consiste na construção de uma relação de sobreclassificação – agregando informações entre alternativas e os critérios; e exploração dessa relação para apoio à decisão.

A etapa de construção engloba o enriquecimento da estrutura de preferência, no qual a noção de critério generalizado é introduzida com a finalidade de captar a amplitude das diferenças entre as avaliações de cada um dos critérios; e o enriquecimento da estrutura de dominância na qual é estabelecida, para cada par de ações, um grau de preferência global de uma ação sobre a outra. Na fase de exploração, tem-se o apoio à decisão no qual a relação de sobreclassificação de valor é explorada visando esclarecer melhor o decisor.

#### *Enriquecimento da Estrutura de Preferência*

Nas comparações paritárias, as diferenças entre os valores das alternativas em cada

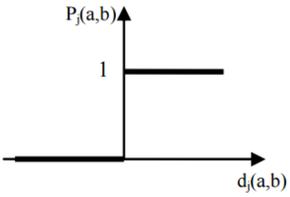
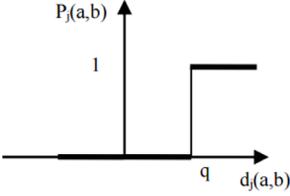
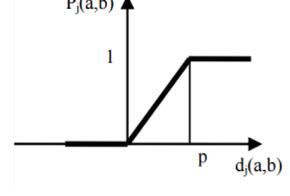
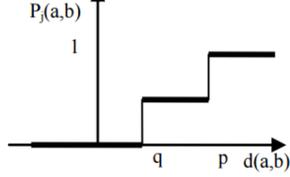
critério são apresentadas.

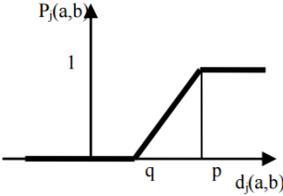
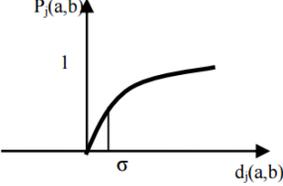
As preferências do decisor, em função das diferenças observadas, assumirão número real variando entre 0 e 1, o que significa que para cada critério  $f_j(\cdot)$ , o decisor tem uma função do tipo (Brans; Mareschal, 1992):

$$P_j(a,b) = P_j | d_j(a,b) | a, b \in A, \text{ com: } 0 \leq P_j(a,b) \leq 1 \tag{20}$$

O par  $\{f_j(a), P_j(a,b)\}$  é chamado critério generalizado associado ao critério  $f_j(\cdot)$ . Trata-se simplesmente do critério de avaliação completado pela sua função de preferência. É uma informação complementar importante. Para facilitar a tarefa, um conjunto de seis tipos é proposto ao decisor. A escolha é efetuada interativamente pelo analista e pelo decisor, levando-se em conta os graus de preferência em função das diferenças observadas (Tabela 1). Em cada caso é preciso fixar no máximo dois parâmetros.

**Tabela 1.** Critério generalizado.

TIPO DE CRITÉRIO	REPRESENTAÇÃO	REPRESENTAÇÃO
<p>(I) Critério Usual</p>		$P_j(a,b) = \begin{cases} 0 & \text{se } d_j(a,b) \leq 0 \\ 1 & \text{se } d_j(a,b) > 0 \end{cases}$
<p>(II) Quase-Critério</p>		$P_j(a,b) = \begin{cases} 0 & \text{se } d_j(a,b) \leq q \\ 1 & \text{se } d_j(a,b) > q \end{cases}$
<p>(III) Critério de preferência linear</p>		$P_j(a,b) = \begin{cases} 1 & \text{se } d_j(a,b) > p \\ d_j(a,b)/p & \text{se } 0 < d_j(a,b) \leq p \\ 0 & \text{se } d_j(a,b) \leq 0 \end{cases}$
<p>(IV) Critério de nível</p>		$P_j(a,b) = \begin{cases} 1 & \text{se } d_j(a,b) > p \\ 1/2 & \text{se } q < d_j(a,b) \leq p \\ 0 & \text{se } d_j(a,b) \leq q \end{cases}$

TIPO DE CRITÉRIO	REPRESENTAÇÃO	
<p>(V) Critério gaussiano</p>		$P_j(a,b) = \begin{cases} 1 & \text{se } d_j(a,b) > p \\ [d_j(a,b) - q] / (p - q) & \text{se } q < d_j(a,b) \leq p \\ 0 & \text{se } d_j(a,b) \leq q \end{cases}$
<p>(VI) Critério de indiferença linear</p>		$P_j(a,b) = \{1 - \exp\{-[d_j(a,b)]^2 / 2\sigma^2\}\}$

Fonte: Adaptado de Roy (1996) e Vincke (1992)

Os parâmetros definidos ( $q_j$ ,  $p_j$ ,  $s_j$ ) têm o seguinte significado:

- **Limiar de indiferença ( $q_j$ ):** representa a maior diferença entre  $f_j(a)$  e  $f_j(b)$  abaixo da qual o decisor considera que  $a$  e  $b$  são indiferentes;
- **Limiar de preferência ( $p_j$ ):** é o menor valor dessa diferença acima do qual o decisor exprime uma preferência estrita em favor de uma das opções;
- **Limiar  $s_j$ :** corresponde a um grau de preferência médio e se situa entre um limiar de preferência  $q$  e um limiar de preferência estrita  $p$ .

*Relação de sobreclassificação de valor*

Uma vez que a tabela de avaliação, os pesos e os critérios generalizados foram definidos, pode-se dar início ao procedimento PROMETHEE.

A partir da intensidade de preferência estabelecida  $|P_j(a,b)|$ , calcula-se o índice de preferência multicritério  $[\pi(a,b)]$  - o qual é definido para todos os pares ordenados de alternativas - como sugere:

$$\pi(a,b) = \sum_{j=1}^k P_j(a,b) \times P_j \tag{21}$$

$$\left( \sum_{j=1}^k p_j = 1 \right)$$

com  $p_j > 0$ ,  $j = 1, 2, \dots, k$ , sendo os pesos representando a importância relativa de cada critério. Eles constituem a informação adicional requisitada para o enriquecimento da estrutura de pre-

ferência entre os critérios.

O índice de preferência multicritério expressa como e com que grau uma alternativa é preferível a outra sobre todos os critérios.

Os seguintes fluxos de sobreclassificação são definidos com o propósito de observar como cada ação de A se comporta diante de  $(n-1)$  outras opções:

- **Fluxo positivo de sobreclassificação:** representa a intensidade de preferência de a sobre todas as alternativas:

$$\phi^+(a) = \frac{1}{n-1} \sum_{b \in A} \pi(a, b) \tag{22}$$

- **Fluxo negativo de sobreclassificação (fluxo de entrada):** representa a intensidade de preferência de todas as outras alternativas sobre a;

$$\phi^-(a) = \frac{1}{n-1} \sum_{b \in A} \pi(a, b) \tag{23}$$

- **Fluxo líquido de sobreclassificação:** expressa o balanço entre o poder e a fraqueza da alternativa. Quanto maior  $\phi(a)$ , melhor a alternativa.

$$\phi(a) = \phi^+(a) - \phi^-(a) \tag{24}$$

O fluxo líquido pode ser positivo ou negativo. Sendo ele positivo, a ação sobreclassifica mais as outras do que é sobreclassificada, ou seja, expressa a vantagem dessa alternativa sobre todas as outras, caso contrário, o fluxo líquido será negativo.

Neste trabalho são apresentadas as versões I, II e VI do PROMETHEE, além do plano GAIA (Geometrical Analysis for Interactive Aid).

**O método PROMETHEE I**

A ordenação parcial do PROMETHEE I é a intersecção entre os fluxos de sobreclassificação positivos e negativos.

Tem-se assim:

$$aP^I b, se \begin{cases} \phi^+(a) > \phi^+(b) \text{ e } \phi^-(a) < \phi^-(b) \\ \phi^+(a) = \phi^+(b) \text{ e } \phi^-(a) < \phi^-(b) \\ \phi^+(a) > \phi^+(b) \text{ e } \phi^-(a) = \phi^-(b) \end{cases} \tag{25}$$

$$aI^I b, se \phi^+(a) = \phi^+(b) \text{ e } \phi^-(a) = \phi^-(b)$$

$$aR^I b \text{ em outros casos}$$

onde, PI, II e RI correspondem, respectivamente, a preferência, indiferença e incompatibilidade.

**O método PROMETHEE II**

A pré-ordem completa do PROMETHEE II é definida por Brans e Mareschal (1992) como segue:

$$aP^{II}b, se \phi(a) > \phi(b) \tag{26}$$

$$aI^Ib, se \phi(a) = \phi(b)$$

No caso da problemática de ordenação, o decisor usará o PROMETHEE II que fornece diretamente uma ordenação completa, enquanto que, ao tratar da problemática de escolha, o decisor deverá observar ao mesmo tempo o PROMETHEE I e II.

**O método PROMETHEE GAIA**

O procedimento GAIA completa os resultados obtidos pelo PROMETHEE, uma vez que, enquanto as análises do PROMETHEE I e II são mais prescritivas, o GAIA é mais descritivo e graficamente orientado. Esse método foi objeto de uma primeira publicação em 1988, tendo conhecido, desde então, desenvolvimentos complementares e sido utilizado em numerosas aplicações econômicas e industriais.

O procedimento GAIA consiste de um módulo de interação visual complementar ao PROMETHEE. O plano GAIA fornece uma informação gráfica clara sobre o caráter conflitante do critério e sobre o impacto dos pesos na decisão final, possuindo várias ferramentas de sensibilidade que enriquecem a visão que o decisor tem do seu problema.

A análise completa do GAIA é baseada na análise dos fluxos líquidos unicritério, obtidos pela decomposição do fluxo líquido. Cada alternativa pode então ser caracterizada por ser k fluxo líquido unicritério.

$$\alpha(a) : \{\phi_1(a), \phi_2(a), \dots, \phi_j(a), \dots, \phi_k(a)\} \tag{27}$$

Logo, os eixos correspondentes aos diferentes critérios podem ser representados por um ponto  $\alpha(a)$  de um tempo k – dimensional  $R^k$ .

Os fluxos unicritério para todas as alternativas determinam a seguinte matriz  $M(n \times k)$ :

	$\phi_1(.)$	$\phi_2(.)$	...	$\phi_j(.)$	...	$\phi_k(.)$
$a_1$	$\phi_1(a_1)$	$\phi_2(a_1)$	...	$\phi_j(a_1)$	...	$\phi_k(a_1)$
$a_2$	$\phi_1(a_2)$	$\phi_2(a_2)$	...	$\phi_j(a_2)$	...	$\phi_k(a_2)$
$\vdots$	...	...	...	...	...	...
$a_i$	$\phi_1(.)$	$\phi_2(.)$	...	$\phi_j(.)$	...	$\phi_k(.)$
$\vdots$	...	...	...	...	...	...
$a_n$	$\phi_1(.)$	$\phi_2(.)$	...	$\phi_j(.)$	...	$\phi_k(.)$

**Tabela 2.** Matriz de avaliação. Fonte: Adaptado de Roy (1996) e Vincke (1992).

Dessa forma, o plano GAIA inclui:

- Diferentes pontos  $\alpha_i$  representando as alternativas;

- Diferentes eixos  $c_j$  representando o critério:

As seguintes propriedades geralmente se verificam:

- Sendo as alternativas boas para um critério particular, elas serão representadas por pontos localizados na direção do eixo desse critério;
- As alternativas similares serão representadas por pontos localizados próximos uns aos outros;
- Os critérios que expressem preferências similares no conjunto das alternativas serão orientados no plano GAIA por eixos posicionados na mesma direção;
- Critérios expressando preferências conflitantes serão representados por eixos em direções opostas;
- Critérios independentes serão representados por eixos ortogonais; e;
- Quanto maior for o eixo de um critério no plano GAIA, mais esse critério diferencia as alternativas.

O vetor dos pesos  $p(p_1, p_2, \dots, p_j, \dots, p_k)$  no espaço  $K$ -dimensional pode ser considerado como um eixo de decisão. A projeção desse eixo no plano GAIA indica a direção na qual o decisor é convidado a decidir de acordo com os pesos considerados. Essa direção  $\pi$  é chamada de eixo de decisão do PROMETHEE.

Se  $\pi$  é longo, o eixo de decisão do PROMETHEE tem um forte poder de decisão e o decisor é convidado a selecionar as alternativas que estão localizadas o mais próximo possível nessa direção. Por outro lado, se  $\pi$  é curto, o eixo de decisão não tem um poder suficientemente forte para decidir. Nesse caso, o vetor  $p$  está quase ortogonal ao plano GAIA, o que significa que, de acordo com os pesos, os critérios são muito conflitantes e um bom compromisso deve ser selecionado próximo à origem.

### **O método PROMETHEE VI**

Esses métodos foram desenvolvidos diante da necessidade de apresentar um modelo menos prescritivo em que se preservasse alguma tolerância para o espaço de liberdade do decisor, oferecendo-lhe não só uma quantificação do mundo real, mas também uma visão da sua própria imagem e da liberdade que ele tem diante deste mundo.

O decisor sabe que, fixando os valores dos pesos, obterá respostas prescritivas. Tal situação não lhe agrada, por remover toda discussão, todo espaço de liberdade. Além do mais, ocorrem muitos casos em que o decisor não está apto a alocar valores precisos para os pesos, devido a vários fatores – por exemplo, indeterminação, imprecisão, dúvida, incerteza etc. sobre

os valores a serem determinados.

Por essa razão, deve-se definir um limite inferior e um superior entre os quais os pesos possam variar, uma vez que o decisor normalmente tem em mente uma ordem de grandeza para os pesos, que possibilita a determinação de intervalos nos quais os pesos dos critérios podem variar. Tem-se dessa forma:

$$p_j^- \leq p_j \leq p_j^+ \quad j = 1, 2, \dots, k. \quad (28)$$

Tais intervalos podem ser fixados a partir de um valor conhecido  $p_j$  tolerando uma porcentagem  $\theta_j$  de variação em torno deste valor:

$$p_j \pm \theta_j \cdot p_j, \quad j = 1, 2, \dots, k \quad (29)$$

Nesse caso, o *stick* de decisão  $P$  pode mover-se pela área limitada no espaço  $k$ -dimensional. A projeção dessa área no plano GAIA dá o espaço de liberdade do decisor. O eixo de decisão do PROMETHEE pode ser orientado, de acordo com a liberdade dada aos pesos, a qualquer ponto do espaço de liberdade.

Duas situações distintas podem ocorrer:

- **Problemas multicritério fáceis:** se o espaço de liberdade não contém a origem, o vetor  $\pi$  (eixo de decisão) permanece orientado na mesma direção e todas as alternativas localizadas nessa direção são boas para todos os possíveis pesos considerados;
- **Problemas multicritério difíceis:** se o espaço de liberdade contém a origem, o vetor  $\pi$  pode ser orientado em todas as direções do plano GAIA, dependendo do valor dos pesos, sendo difícil tomar uma decisão final.

Pode-se dizer, desse modo, que o grau de dificuldade de um problema multicritério pode ser verificado através do posicionamento do espaço de liberdade em relação à origem do plano GAIA.

Assim, um método multicritério de apoio à decisão se caracteriza por ser uma atividade que permite, através de modelos claramente explicitados, porém não necessariamente formalizados, auxiliar a obtenção dos elementos de resposta às questões que são apresentadas a um interventor em um processo de decisão. Tais elementos procuram esclarecer e, normalmente, prescrever a decisão, ou simplesmente favorecer um comportamento que venha a acrescentar coerência à evolução do processo, aos objetivos e sistema de valores utilizados pelo interventor.

A Biotecnologia Marinha e o Auxílio Multicritério à Decisão (MCDA) podem caminhar juntos com o objetivo tecnológico de construção de um saber focado na escolha ou classificação de melhores alternativas para um determinado projeto.

A adequação teórica e metodológica é fundamental para as discussões e interligações sobre esses dois grandes temas. Vejamos, a seguir, uma discussão sobre objetivos e perspectivas em comum.

## **2.1 BIOTECNOLOGIA MARINHA E AUXÍLIO MULTICRITÉRIO À DECISÃO: OBJETIVOS E APLICAÇÕES**

A tomada de decisão é um processo cognitivo, que tem por objetivo encontrar a alternativa mais eficiente/eficaz (levando-se em consideração uma série de critérios) entre uma gama de possibilidades. Todo processo de tomada de decisão produz uma opinião ou um plano de ação, mas para que esse método seja o menos subjetivo, ele precisa estar pautado em uma metodologia matemática, porém o menos complexa possível.

No processo decisório, tentamos levantar quais seriam os quesitos importantes e imprescindíveis para satisfação do resultado final. Em um processo decisório empresarial, nossas altitudes podem tornar-se mais complexas do que em decisões de cunho pessoal, considerando que o número de variáveis a considerar pode ser maior, e que a decisão escolhida terá repercussão coletiva.

Essas características específicas na Biotecnologia Marinha permitem classificá-la sob a análise multicritério, diante do estudo de métodos específicos, conforme visto no item 1. Têm-se como critérios possíveis:

1. Variabilidade de produtos;
2. Escala de produção;
3. Custo de manutenção e produção;
4. Rentabilidade;
5. Potencialidade de comercialização.

Os critérios analisados, dependendo do produto escolhido, permitirão uma tomada de decisão específica e eficaz.

De acordo com os objetivos a serem analisados em um problema multicritério contextualizado com o estudo em Biotecnologia Marinha, tem-se que:

- Métodos multicritério: priorizar a tomada de decisão de forma objetiva, robusta e coesa, a partir da análise complexa de critérios independentes;

- Biotecnologia Marinha: restaurar e estudar os habitats marinhos, a partir de produtos/variáveis específicas ao monitoramento.

**Biotecnologia Marinha e Análise Multicritério de Apoio à Decisão podem ser integradas a partir do seu contexto e do estudo das variáveis complexas, que serão transformadas em critérios/indicadores.**

Um exemplo de aplicação de um método Multicritério no contexto de Biotecnologia Marinha pode ser visto no box 2.

### **BOX 2 - Exemplo de aplicação Biotecnologia Marinha e Análise Multicritério:**

#### **Título da pesquisa:**

“Utilização do método AHP como ferramenta de auxílio multicritério no processo de decisão de priorização de projetos de ciência, tecnologia e inovação na Amazônia Azul”

#### **Instituição:**

UFF/RJ

#### **Problema de pesquisa:**

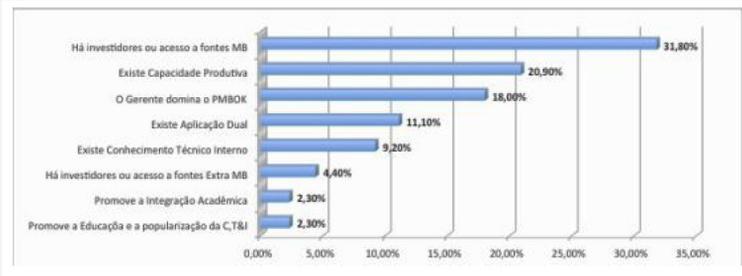
O problema a ser apresentado neste trabalho diz respeito à carteira de projetos de um Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) da Marinha do Brasil, que possui contratos de pesquisa e desenvolvimento em ciências do mar, com organizações da própria MB ou governamentais, além de organizações privadas. A problemática dos recursos se refere às verbas orçamentárias, ou seja, às verbas governamentais, que anualmente sofrem contingenciamentos, e não cobrem os custos de todos os projetos do portfólio.

#### **Critérios analisados no contexto Estratégico e Técnico:**

- Capacidade produtiva;
- Conhecimento técnico;
- Conhecimento de PMBOK;
- Integração técnica entre institutos;
- Qualidade ambiental;
- Mudança climática com influência marítima; e;
- Desenvolvimento de produtos;

#### **Resultados obtidos:**

Efetividade de Gestão, relacionada à capacidade do projeto executar demandas específicas de produtos Biotec Mar.



Fonte: UFF/RJ – Agápito, A. et.al., 2015.

- Biotecnologia Marinha: restaurar e estudar os habitats marinhos, a partir de produtos/variáveis específicas ao monitoramento.

**Biotecnologia Marinha e Análise Multicritério de Apoio à Decisão podem ser integradas a partir do seu contexto e do estudo das variáveis complexas, que serão transformadas em critérios/indicadores.**

Análise Multicritério e Biotecnologia Marinha podem e devem caminhar juntas para a construção de tomadas de decisão eficazes em diversas áreas, tais como:

- Desenvolvimento de áreas agrícolas;
- Especificidades de enzimas industriais;
- Nutrientes em suplementações;
- Tipos de reagentes em investigações moleculares; e;
- Produtos específicos em cosmética.

A delimitação da importância do produto *versus* sua melhor seleção corrobora na aplicação conjunta de Multicritério e BiotecMar.

### **3 | CONCLUSÃO**

Métodos multicritério têm sido bastante empregados na solução de problemas de tomada de decisão, uma vez que procuram esclarecer ao decisor as possibilidades de escolhas. Apoiam o processo decisório, embasados nas informações existentes, incorporando valores

dos agentes, na busca da melhor solução.

O uso crescente de produtos marinhos nos alimentos, cosméticos, indústrias e agricultura tem criado uma demanda de profissionais qualificados ao setor. Diante disso, a complexidade da tomada de decisões sobre o melhor produto ou melhor pesquisa a ser desenvolvida requer a utilização de métodos robustos e objetivos, capazes de solucionar demandas e expectativas estratégicas e de gestão.

## REFERÊNCIAS

Agapito, A.; Vianna, D.; Candido, L.; Meza, E. (2016) **Utilização do método AHP como ferramenta de auxílio multicritério no processo de decisão de priorização de projetos de ciência, tecnologia e inovação na Amazônia Azul**. Universidade Federal Fluminense.

Brans, J. P.; Mareschal, B. (1992) PROMETHEE V: MCDM problems with segmentation constraints. **INFOR**. 30(2): 85-86.

Roy, B. (1985) How outranking relation helps multiple criteria decision making. In: Cochrane, J.; Zeleny, M. (ed.) **Topics in Multiple Criteria Decision Making**. 179-201, University of South Carolina Press.

Roy, B. (1996) **Multicriteria methodology goes decision aiding**. Kluwer Academic Publishers, Berlin.

Vincke, P. (1992) **Multicriteria decision-aid**. London: John Wiley & Sons.



# BIOTECNOLOGIA MARINHA E GERAÇÃO DE PATENTES

Eric de Lima Silva Marques<sup>a</sup>  
Rachel Passos Rezende<sup>a</sup>  
João Carlos Teixeira Dias<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz

## RESUMO

Enquanto o agricultor depende de cultivo, sujeito às estações do ano e suas intempéries, os oceanos parecem ser uma fonte inesgotável para quem vive dele, respeita-o e o protege. Os oceanos compõem cerca de 70% da superfície terrestre, abrigando os maiores habitats e a maior parte das formas de vida existentes. Conforme avança a ciência, os mares podem revelar segredos que resultam em múltiplos biocompostos com atividades únicas. Dentro desse contexto, a biotecnologia abre diversos caminhos, tendo como principal objetivo a exploração racional de organismos, genes e moléculas também no ambiente marinho. A partir das últimas décadas observa-se em todo o mundo um aumento acelerado e contínuo de solicitações de depósito de patentes de produtos naturais extraídos dos mais diversos organismos marinhos, destinados a diversas áreas: saúde humana, cosméticos, biorremediação, alimentos, agricultura, farmacologia, produção de biocombustíveis, entre outras. O crescimento de patentes que incluem genes de origem marinha é ainda mais rápido. Como exemplo, a base de dados de patentes (PAT) no GenBank inclui cerca de 5000 sequências de genes marinhos. Todas as bases de dados para pesquisa de patentes possuem *websites* centralizados com documentos completos. A pesquisa pelas patentes pode ser rápida ou avançada e tem a grande vantagem de apresentar uma descrição suficiente e recente. As bases consultadas neste capítulo foram obtidas da World Intellectual Property Organization (WIPO), a base de dados PAT do GenBank e o Google Patents.

# 1 | INTRODUÇÃO

As patentes são consideradas concessões públicas que dão direitos exclusivos de uma invenção aos autores das mesmas e garantem ao seu portador a exclusividade em explorar a sua criação. Portanto, enquanto a patente estiver válida outras pessoas não poderão explorá-la sem o consentimento dos detentores. As patentes têm prazos de validade tanto espacial quanto temporal. Isso ocorre porque os órgãos reguladores só protegem os direitos dos detentores das patentes na sua área de atuação. Assim, patentes feitas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) no Brasil só protegem a propriedade intelectual no Brasil e em países que eventualmente tenham acordos mútuos para patentes, como os 38 membros atuais da European Patent Organization (<https://www.epo.org/about-us/foundation/member-states.html>). Além dessa limitação espacial de cobertura de patentes, há também uma limitação temporal, visto que muitas patentes têm os direitos exclusivos garantidos por até 20 anos, sendo que em alguns países é necessário pagamento de taxas anuais para manter a patente válida até o prazo final.

Em biotecnologia marinha temos diferentes tipos de patentes que serão apresentadas a seguir. Vão desde métodos de obtenção de compostos de uso rotineiro, como o ágar em laboratórios de microbiologia, a compostos com aplicação em áreas médico-industriais. Os códigos de depósito das patentes mencionadas estão presentes no texto e podem ser acessados nas bases de patentes como a World Intellectual Property Organization (WIPO) (<http://www.wipo.int/patentscope/search/en/search.jsf>), a base de dados PAT do GenBank e o Google Patents (<https://patents.google.com/>).

## 1.1 PATENTES EM METAGENÔMICA DE AMOSTRAS MARINHAS E ADJACENTES

Estudos e revisões recentes mostram o grande aumento de produtos para aplicação industrial através de metagenoma. A procura por produtos por meios genômicos tem se tornado prática rotineira, como demonstrado nas bases de busca como PUBMED e outras. O aumento de pesquisas e artigos publicados em metagenômica é bem mais significativo em contraponto aos depósitos de patentes nessa mesma área, apesar de todo o potencial existente e reconhecido. Logicamente isso se torna apenas uma questão de tempo, uma vez que pela tecnologia de metagenômica funcional são encontradas distintas bioatividades. A tecnologia da metagenômica fornece a capacidade de descoberta de novas enzimas microbianas através da pesquisa do DNA total de certa comunidade (seja terra vegetal, solo florestal, solo de rizosfera de plantas, deserto, solo, solo antártico, sedimento de mangue, compostagem, ambientes marinhos e sedimentos costeiros, águas superficiais e profundas, água doce, estações de tratamentos, entre outras). Portanto, são diversos os habitats que estão sendo explorados, como também o número de novas enzimas descritas. Em relação a patentes que usem o termo metagenômica, a base de dados do WIPO mostra 127 resultados de patentes requeridas. Destes 127, apenas um se refere ao requerimento de patente com o termo metagenômica com ambiente marinho. Combinados os

termos metagenômica e ambiente marinho, o mesmo resultado é apresentado. Utilizando os termos metagenômica, ambiente marinho e biotecnologia, nenhum resultado é apresentado na base de patentes WIPO. Listada pelo Google Patents, a patente de aplicação CN106011103A demonstra o aumento de atividade de uma esterase de expressão heteróloga de origem de sedimentos marinhos profundos EST4 na presença de caproato de p-nitrofenol (C6), podendo ser aplicada a medicamentos quirais, processamento de alimentos, modificação no sabor dos alimentos, no tratamento de águas residuais e indústria de lavagem e outras produções industriais. Também está no Google Patents a patente CN101962651B do gene de metagenoma de águas marinhas profundas que expressa atividade L methionine gamma-lyase. Algumas revisões mostram depósitos de patentes relacionados a ambientes não marinhos, o que demonstra ainda um grande caminho a ser percorrido nessa área. O nosso grupo de pesquisa tem contribuído um pouco para o aumento. Recentemente solicitamos o depósito de uma patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual do Brasil (INPI). Nesta foi realizado metagenoma de sedimento de mangue e foram indicadas propriedades de uma protease com atividades *in vitro* contra células HT29 de câncer colo-retal.

## 1.2 EXEMPLOS DE PATENTES DE PRODUTOS DE MICRO-ORGANISMOS MARINHOS

É um grande marco em biotecnologia marinha a busca por produtos naturais produzidos por micro-organismos, contudo há muito mais trabalhos publicados e revisões do que patentes propriamente ditas. É imensa a busca por produtos sobretudo em micro-organismos que apresentam relações simbióticas com outros organismos, como a impressionante relação entre esponjas e micro-organismos (Bhatnagar; Kim, 2010). Nesse aspecto a origem do biocomposto é baseada na complexidade das relações estabelecidas, na localização do micro-organismo no simbionte na competição entre outros grupos, como também em fatores abióticos como salinidade, pressão, pH e temperatura, o que pode ser todo o diferencial. Além disso, os organismos simbiontes escondem segredos primitivos que revelam distintos graus de atividades biológicas importantes, como compostos antitumorais, anti-inflamatórios, antibióticos, entre outros.

Na base Patent Scope da WIPO as buscas podem ser divididas pelos grupos microbianos tais como "Marine bacteria" ou "Marine fungi", uma vez que se buscar por "marine microorganism" não serão obtidos tantos resultados satisfatórios. Contudo, a base de Google Patents pode gerar resultados mais palpáveis se o leitor incluir na busca as palavras-chaves micro-organismo e marinho. Muitos produtos isolados de micro-organismos marinhos já são comercializados. Um dos exemplos é a enzima de reação de cadeia da polimerase, a "Vent™ & DeepVent™ DNA polimerase" (New England BioLabs, Inc.) produzida por *Pyrococcus* GB-D de fontes hidrotermais, cujo gene foi inserido em hospedeiro heterólogo para produção em maior escala. Outros mostram o grande potencial de comercialização, como exemplo a patente W01989000606A1, que indica produção de ômega-3 por micro-organismos eucarióticos marinhos cultivados em meios para-heterotróficos, já que outras patentes mostram a produção desses ácidos graxos por micro-organismos fotoautotróficos. E isso é muito importante, visto que em microbiologia sabemos que o cultivo de organismos heterotróficos é fácil, além disso os micro-organismos eucarióticos se

adaptam facilmente às condições industriais, são de fácil manipulação e manutenção. Muitas patentes enfatizam a importância do meio com sal ou meio com água do mar na produção de metabólitos e enzimas de importância comercial. Esse fato pode ser exemplificado na patente WO2002047610A2 citada pelo Google Patents.

É importante enfatizar que algumas vezes o organismo de origem do produto só é conhecido após sequenciamento e estudo proteômico, isso porque clones metagenômicos transformados com DNA total de comunidades microbianas podem expressar várias atividades sem a necessidade de determinação da origem. Aqui novamente citamos nosso requerimento de patente ao INPI, em que o produto (enzima protease com atividade alcalina) de invenção é expresso em hospedeiro heterólogo por meio de metagenômica, mas que vem de um organismo diferente reconhecido por sequenciamento como *Bacillus* sp. É importante para o leitor o acesso às revisões citadas nas referências, como também a leitura dos próximos tópicos que muitas vezes envolvem micro-organismos.

### 1.3 EXEMPLOS DE PATENTES A PARTIR DE PRODUTOS OBTIDOS DE ESPONJAS MARI-NHAS

As esponjas constituem o filo Porífero, representado por organismos filtradores e sésseis que estão entre os animais com características mais primitivas encontradas no planeta. As esponjas e sua microbiota simbiote associada são fontes de importantes biomoléculas usadas principalmente na indústria cosmética e de fármacos. Esses organismos são considerados os favoritos para obtenção de compostos naturais de origem marinha (Faukner, 2001). Em levantamento realizado por Arrieta et al. (2010), 1185 espécies de esponjas apresentavam um ou mais produtos naturais descritos associados a elas, sendo descritos 291 compostos em 2015, mantendo um número relativamente constante considerando valores próximos em outros anos (Blunt et al., 2013; 2017), último levantamento encontrado sobre o tema. Alguns desses compostos foram patenteados e serão relatados ao longo deste tópico.

Compostos produzidos por esponjas e/ou seus micro-organismos associados apresentam inúmeras patentes. O composto discorhabdin (US4731355A), por exemplo, é um composto oriundo de esponja do gênero *Latrunculia* patenteados para uso como antitumoral, antibacteriano e antifúngico. Essa atividade antitumoral foi verificada para muitos compostos oriundos de esponjas como, por exemplo, a Naamidine A (US5574057A). Já na espécie *Epipolasis reiswigi* foi identificado um composto bioativo com atividade antiviral (US4935439A). Além de compostos com atividades antitumorais e antimicrobianas, uma transflutaminase-like da esponja *Microciona prolifera* é eficiente no tratamento de hemofilia e outras doenças hemorrágicas (WO1989001512A1). Esses e outros compostos que tiveram seus pedidos de patente concedidos até a década de 90 estão representados na Tabela 1. Estudos e patentes dessas décadas mostram que mesmo duas décadas depois, as esponjas continuam sendo fontes de compostos bioativos, como demonstrado por Blunt et al. (2013).

Portanto, em se tratando de procura de produtos naturais em esponjas, podemos ver que muitos compostos são os já descobertos e continuam sendo atualmente. O poliquetideo ciclo-pentano denominado simplextone A apresenta atividade antitumoral contra células de cân-

**Tabela 1.** Algumas patentes de compostos oriundos de esponjas das décadas de 80 e 90.

COMPOSTO	ESPONJA	ANO	FUNÇÃO	PATENTES
Discorhabdin	<i>Latrunculia sp.</i>	1988	Antitumoral, antibacteriana, antifúngica	US4731366A
Naamidine A	-	1996	Antitumoral	US5574057A
-	<i>Epipolasis reisiwigi</i>	1990	Antiviral	US4935439A
Dictyostatin 1	<i>Spongia sp.</i>	1995	Anticâncer	US5430053A
Transglutaminase-like	<i>Microciona prolifera</i>	1989	Transglutaminase	WO1989001512A1
Sterol dissulfate	<i>Petrosia weinbergii</i>	1992	Antivírus	US5079239A
-	<i>Theonella sp.</i>	1989	Antivírus, antifungal, antitumor	US4808590A
Compostos Discodermolide	<i>Discodermia dissoluta</i>	1991	Imunomodulador e antitumoral	US5010099A

cer de cólon humano, assim como o composto I gama-butirolactona polyketone, formado pelos simplextone A e simplextone B, apresenta atividade antineoplásica, e ambas as patentes foram originadas a partir de extratos da esponja *Plakortis simplex* (CN102617521 e CN102225921). Compostos terpenoides obtidos de esponja *Suberea sp.* são utilizados em métodos para evitar danos celulares em casos de isquemia, derrame e inflamações generalizadas (US6750247B2). Inúmeras outras patentes na área médica e de fármacos poderiam ser citadas, a grande maioria relacionadas com o tratamento de câncer e antimicrobianos. Entretanto, outras áreas também podem se beneficiar a partir de produtos patenteados oriundos de esponjas.

As espículas das esponjas também têm vários usos biotecnológicos. Desde o processo de obtenção e purificação das espículas (CN106413723A e CN105858669A), até seu uso em diferentes formas na indústria. Na indústria cosmética, o pó das espículas da esponja *Spongilla sp.* foi patentado como um composto dermoabrasivo para remoção de pele morta nas camadas superficiais (US20100080853A1). Esse mesmo gênero já foi utilizado em outras patentes como um componente ativo de composto terapêutico para tratar de doenças da pele como acne, rosácea, dermatite, eczema, psoríases, *photo-aging* e ceratosa actínica (US20040109872A1; US20130309315A1). Na indústria de nanopartículas, as espículas também têm várias patentes, uma delas ligada à produção sustentável de *nanorods*, *nanowires* e/ou *nanobullets* a partir de silicatein e silintaphin-1 isoladas de esponjas (US20100273981A1). Um outro composto de esponjas com aplicação na indústria é a esponjina, um tipo de colágeno encontrado nesses animais. Essa substância tem várias patentes que vão desde métodos de obtenção (DE102005041414A1 e WO2015151030) a usos como revestimento de superfície de implantes biológicos e *drug carrier* (WO2008023025A1 e DE102009028980A1).

Por fim, um dos compostos originados de esponjas foi base para a síntese de princípio ativo de medicamentos largamente utilizados como o AZT, princípio ativo de medicamentos antivirais contra o HIV (US5108993), além de outros medicamentos contra herpes e leucemia baseados em compostos oriundos de esponjas.

## 1.4 EXEMPLOS DE PATENTES A PARTIR DE PRODUTOS OBTIDOS DE TUNICADOS

Os tunicados correspondem a um subfilo do filo Chordata, caracterizado por animais marinhos sem espinha dorsal, mas com notocorda em alguma fase da vida. Os tunicados correspondem à terceira maior fonte de produtos naturais marinhos (Arrieta et al., 2010), tendo sido descritos 51 novos produtos em 2013 (Blunt et al., 2014; 2017). Produtos originados de tunicados têm diversas aplicações e algumas das patentes oriundas desses organismos serão mencionadas abaixo.

A espécie *Ecteinascidia turbinata* produz um composto antitumoral potente denominado ecteinascidins, que apresenta muitas patentes relacionadas. O principal uso é como antitumoral (US20050004018A1), assim como de derivados desse composto (US20030216397A1), no tratamento de infecções pelo vírus herpes simplex tipo I (US5256663A), antibacteriano (US5089273A), além de métodos de cultivo dessa espécie (US6712023B2) e obtenção desses compostos (US5089273A).

O gênero *Trididemnum* também apresenta compostos com atividade antitumoral como as didemnin X e didemnin Y (EP0393883A1). Algumas didemnin também apresentam atividade imunomoduladora em animais endotérmicos, o que levou ao desenvolvimento de patentes com métodos de tratamentos que necessitem de imunossupressão (US6156724A). Antivirais desse gênero também foram patenteados, como as didemnins A, B e C e as nordidemnins A, B e C (EP0048149A1) e as didemnins A-E (US4493796A), além de algumas delas também serem patenteadas como antitumorais (US5137870A). Didemnins obtidas de outros gêneros de tunicados já foram patenteadas, como as do gênero *Aplidium* (WO1991004985A1), com alguns compostos análogos a eles como os tamandarins que foram patenteados com atividade antitumoral (US20070149446A1).

Assim como os tunicados citados anteriormente, muitos outros tunicados têm patentes associadas, como o antitumoral da espécie *Ritterella sigillinoides* (WO1988000826A1). Os tunicados do gênero *Eudistoma* também apresentam um composto característico com diversos usos patenteados. A eudistomins foi patenteada como antiviral, antibacteriano e antitumoral (US4631149A), e alcaloides naturais e derivados desse tunicado foram patenteados com atividade antitumoral (US5432172A). Outras patentes dessas espécies também são encontradas com análogos de tamandarin e didemnin (US7064105B2).

## 1.5 EXEMPLOS DE PATENTES A PARTIR DE PRODUTOS OBTIDOS DE MOLUSCOS

Os moluscos representam um grande filo de animais encontrados em ambientes marinhos, de água doce e terrestres. Os moluscos marinhos apresentam uma grande diversidade, correspondendo a várias classes de organismos, entre elas os gastrópodes, bivalves e cefalópodes, que são as classes mais conhecidas. Apesar de haver patentes envolvendo métodos de controle dos dois últimos, que podem causar prejuízos econômicos à atividade humana (US9414590B2), diferentes compostos podem ser produzidos por esses invertebrados. Segundo Arrieta et al. (2010), existem 445 espécies de moluscos com um ou mais produtos naturais associados com patentes anteriores à década de 1970, como os extratos de moluscos marinhos

usados em cosméticos (FR1350038A), assim como várias patentes da década de 1980, como uma que utilizou ovos de moluscos marinhos em cosméticos com propriedades cicatrizantes, rejuvenescedoras e revitalizadoras (FR2502007A), e outra de extrato lipídico de ostras, também para indústria cosmética (FR2850574A1).

Um composto antitumoral, denominado kahalalide, obtido do gastrópode *Elysia rufescens* (US20060234920A1), é um exemplo que também tem patentes como antifúngico, antiviral e no tratamento de psoríase (WO2004035613A2). Outros compostos, como alcaloides da classe das lamelarinas, foram obtidos de moluscos do gênero *Lamellaria* e patenteados com atividade antitumoral (WO1997001336A1), além de compostos análogos com patentes com a mesma atividade (WO2004014917A2), incluindo linhagens celulares de tumores resistentes a múltiplas drogas (US20030220320A1).

Os cefalópodes apresentam algumas patentes relacionadas. As tintas produzidas por alguns cefalópodes como mecanismo de defesa/fuga podem ser usadas como corantes de cabelo, cuja composição, de acordo com uma das patentes, minimiza os danos no couro cabeludo e no cabelo em si (KR100755525B1). As tintas de alguns representantes da ordem Sepiida foram utilizadas nessa patente (KR20090009661A) de tintura para cabelo.

Os bivalves também apresentam alguns produtos patenteados, como o antimicrobiano myticin, produzido pela espécie *Mytilus galloprovincialis* (US6911524B1) e a proteína antibacteriana sintetizada pela espécie *Chlamys islandica* (RU2325398C2).

## 1.6 EXEMPLOS DE PATENTES A PARTIR DE PRODUTOS OBTIDOS DE EQUINODERMOS

Os equinodermos correspondem a um filo de animais exclusivamente marinhos e bentônicos com grande potencial para descoberta de compostos bioativos. Até 2010, 301 espécies de equinodermos apresentavam ao menos um produto natural associado (Arrieta et al., 2010) das cerca de sete mil espécies viventes. Além disso, cerca de 37 novos metabólitos foram descritos no ano de 2012 (Blunt et al., 2013), mostrando um potencial para esses organismos, como em algumas patentes mencionadas abaixo.

O equinodermo *Holothuria scabra* produz um corante fluorescente que foi patenteadado para inúmeras aplicações relacionadas com sua fluorescência (US20020187202A1), incluindo patentes com o processo de extração desse composto fluorescente (US20030096988A1). Já a estrela-do-mar *Marthasterias glacialis* teve uma glicoproteína patenteadada com atividade anti-incrustação, anti-adesão e anti-inflamatória (US6991810B1). Já um extrato da classe Asteroidea foi patenteadado como um suplemento para ser usado no cuidado da saúde, por apresentar um bom efeito na melhora do sistema imunológico de pacientes com baixa imunológica, descrito na patente CN1091009A. Inúmeros compostos produzidos por equinodermos foram patenteados devido a suas ações antitumorais (CN101362790B e CN103638067A), anticoagulantes, anti-inflamatórias, antioxidantes e inibidoras da enzima colagenase (RU2509775C1).

## 1.6 EXEMPLOS DE PATENTES A PARTIR DE PRODUTOS OBTIDOS DE ALGAS

As algas representam seres uni- ou multicelulares formando um grupo polifilético de

organismos fotossintetizantes aquáticos ou terrestres úmidos diferentes das plantas. Muitos compostos estão associados a esses organismos, não sendo recentes as respectivas patentes. Em pesquisa no Google Patents (<https://patents.google.com>) aparecem 270 patentes associadas ao termo “algae” e “marine” até o final da década de 1960. Alguns exemplos de patentes desse período serão mostradas a seguir. Na década de 1910 foram registradas patentes associadas com a produção de iodine (US1249863A), ácidos fórmico, acético, butírico e sais de potássio (FR520456A) e métodos para obtenção de ácido butírico e acético (US1371611A). Na década de 1920, patentes relacionadas com o processo de produção de alginato a partir de extratos de algas marinhas (US1814981A) e de obtenção de ágar (US1712785A) e alginato (US2426125A e US2477861A). Na década de 1940 foi patenteado outro método de obtenção do ágar (US2551143A). Na década de 1950 registraram-se patentes relacionadas com a utilização de extratos mucilaginosos de algas na produção de pasta dental (US2751328A) e método para diminuir o nível de colesterol utilizando extrato de alga vermelha do gênero *Chondrus* (US3148114A). Na década de 1960, por exemplo, já havia patentes relacionadas com o método para cultura e obtenção de carragenina (US3195271A) e de carotenoides (US3142135A). Outros métodos de obtenção de diferentes compostos foram observados na pesquisa, mas a patente não estava disponível, como no caso do método de extração de manitol, mencionado no título de algumas patentes (FR1099972A).

Em patentes mais recentes foram observados processos para obtenção de novos compostos a partir de algas marinhas, como a L-ramnose (US4758283A) e ácidos orgânicos não relatados anteriormente (KR20100119698A), assim como novos métodos para obtenção de compostos já descritos, como os ácidos butírico e acético (KR20100119698A) e o ágar (US3901873A).

A seguir mencionaremos outros tipos de compostos com patentes mais recentes, principalmente dos últimos 20 anos. Muitas dessas patentes estão relacionadas com métodos para obtenção de diversos compostos ou uso de algas na composição de rações (WO2014015000A1) ou na indústria cosmética (US20110262505A1) utilizando extrato de algas marinhas como um dos componentes de formulação para tratamento de rosácea, psoríase, acne, dermatite, úlcera e outros (US20110217249A1). Na produção de compostos, além dos já citados podemos destacar patentes relacionadas com a produção e obtenção de ácidos graxos como o ácido palmítico e hidrocarbonetos a partir de algas *Nannochloropsis* sp. (US20120135478A1 e US20120034662A1), além de métodos de obtenção de compostos altamente insaturados, pigmentos fotossintéticos e/ou polissacarídeos em cultivo de algas marinhas (US6579714B1) e métodos para obtenção de biodiesel usando algas como substrato (US20090071064).

Vários compostos obtidos de algas também estão associados com produtos aplicados à medicina. Um produto anticâncer foi patenteado com um dos princípios ativos obtidos de uma alga verde marinha produtora de peptídeos cíclicos que apresenta propriedades de inibição de crescimento de tumores (CN1690076A). Um composto antitumoral derivado de cyclohexadione produzido por alga vermelha, assim como um método de extração, também aparecem nessa lista de patentes (US4708962A). Algas verdes do gênero *Bryopsis* produzem compostos conhecidos como kahalaide. O kahalaide F foi patenteado com composições farmacêuticas como princípio ativo das atividades antitumoral e antifúngica e no tratamento de psoríase (WO2004035613A2, US7323444B2, RU2292216C2, JP2011515330A). *Chlorella* é um gênero de alga

verde associado com várias patentes. O polissacarídeo ácido CH-1 foi extraído desse gênero e patenteado com atividade antitumoral e antiviral (US4533548A) além de atividade imunomoduladora de extratos de polissacarídeos em citocinas como o interferon (US6551596B2). Esses são alguns exemplos da grande quantidade de compostos produzidos por algas.

## 1.8 EXEMPLOS DE PATENTES A PARTIR DE PRODUTOS OBTIDOS DE CRUSTÁCEOS E BRIOZOÁRIOS

Os crustáceos são artrópodes majoritariamente aquáticos que podem ser marinhos ou de água doce. Os crustáceos marinhos são ubíquos no oceano, sendo encontrados em praticamente todos os ambientes marinhos com vida. Apesar disso, poucos compostos foram patenteados associados a esses animais, não aparecendo menção a eles em revisões de produtos naturais marinhos (Blunt et al., 2017). A maioria das patentes referentes a eles estão associadas com estratégias de produção de alguns desses crustáceos para consumo humano. Entretanto, há patentes relacionadas com métodos de obtenção do composto luminescente luciferina a partir de Ostracoda (US8343729B2) e peptídeos antimicrobianos obtidos de crustáceos marinhos da família Penaeidae (US6642203B1). Também foram patenteados peptídeos ricos em prolina obtidos de caranguejo *Hyas araneus* com reivindicações de atividades antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e antimetástase.

Os briozoários correspondem a um filo de animais invertebrados aquáticos com cerca de quatro mil espécies. Esses animais filtradores apresentam algumas patentes associadas a eles e seus micro-organismos simbiotes. Uma das patentes está associada com compostos designados bryostatins, que correspondem a ao menos 13 lactonas macrocíclicas antitumorais e antibióticas (US4611066A), anticâncer (CN1062866C) e anti-SARS coronavírus (CN1175809C) obtidas do gênero *Bugula*. Outros compostos também estão associados com esse gênero, como a neristatina, com patente associada à inibição da leucemia linfocítica (US5196447A). Tanto a bryostatin quanto a neristatina estão associadas também com patentes propostas para tratamento de Alzheimer (US6825229B2), além disso há algumas patentes com métodos para extração de bryostatins (CN1068004C) e de produção em aquicultura para obtenção em larga escala desse composto (JP2866042B2).

## 2 | CONCLUSÕES

Como podemos ver, a busca por produtos naturais e patentes em biotecnologia marinha é um campo altamente promissor, com crescimento linear bastante importante. São impressionantes e de grande importância os produtos naturais obtidos desses organismos marinhos. A biotecnologia marinha também deve ser associada às descobertas de caráter racional, em que os produtos são explorados racionalmente, pois, apesar de parecer fonte inesgotável, os oceanos devem ser preservados. Com isso muitas patentes envolvem métodos de cultivo do organismo e de obtenção do produto de interesse. Daí a necessidade do caráter multidiscipli-

nar da descoberta até a comercialização. Tudo tem que ter um porquê e seu impacto ambiental e social deve ser avaliado.

A busca por produtos microbianos por meios genômicos está ainda caminhando lentamente, contudo deve crescer bastante e se aliar a buscas por micro-organismos cultivados de forma tradicional. Um método não invalida o outro de forma alguma. Porém é comum encontrar artigos publicados com moléculas ou compostos que poderiam ser patenteados. Isso fica visível na baixa quantidade de patentes relacionadas com metagenomas associados à biotecnologia marinha em comparação a artigos publicados na área que poderiam levar a potenciais patentes. Ainda assim, o número de patentes relacionadas com metagenoma e ambiente marinho em geral tende a crescer, seja na forma de metodologias para obtenção de compostos ou na aplicação desses compostos em diversas atividades humanas.

## REFERÊNCIAS

- Arrieta, J.M.; Arnaud-Haond, S.; Duarte, C.M. (2010) What lies underneath: Conserving the oceans' genetic resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 107(43): 18318-18324. doi:10.1073/pnas.0911897107.
- Bhatnagar, I.; Kim, S-K. (2010) Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. **Marine Drugs**. 8(10): 2673-2701. doi: 10.3390/md8102673.
- Blunt, J.W.; Coop, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.; Prinsep, M.R. (2013) Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** 30(2): 237-323. doi: 10.1039/c2np20112g.
- Blunt, J.W.; Coop, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.; Prinsep, M.R. (2017) Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** 34: 235-294. doi: 10.1039/C6NP00124F.
- Faukner, D.J. (2001) Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** 18: 1R-49R. doi: 10.1039/B006897G.
- Gandhimathi, R.; Arunkumar, M.; Selvin, J.; Thangavelu, T.; Sivaramakrishnan, S.; Kiran, G.S.; Shanmughapriya, S.; Natarajaseenivasan, K. (2008) Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. **J. Mycol. Med.** 18: 16-22.
- Selvin, J.; Shanmughapriya, S.; Gandhimathi, S.; Kiran, G.S.; Ravji, T.R.; Natarajaseenivasan, K.; Hema, T.A. (2009) Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 83: 435-445.
- Trincone, A. (2017) Enzymatic Processes in Marine Biotechnology. In: Glaser, K.B. (ed.) **Marine Drugs**. 15(4):93. doi:10.3390/md15040093.
- Zhang, C.; Kim, S.-K. (2010) Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Marine Drugs**. 8(6): 1920-1934. doi:10.3390/md8061920.





# COMO COMEÇAR A SUA STARTUP

Jéssica Scherer<sup>a</sup>  
Carolina Bettker Vasconcelos<sup>a</sup>  
Mário Luiz Conte da Frota Júnior<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Regenera Moléculas do Mar

## RESUMO

Afinal, o que é uma *startup* mesmo? Por incrível que pareça, essa ainda é uma pergunta rotineira, principalmente no ambiente acadêmico. Contudo, apesar de parecer difícil e complexo estruturar uma empresa inovadora, é possível afirmar que, com o auxílio das metodologias e ferramentas apropriadas (e com uma boa dose de coragem), colocar “aquela ideia” em prática pode ser algo mais simples do que publicar um artigo científico no melhor periódico da sua área de pesquisa. Além disso, a chance da “grande virada”, tanto profissional como pessoal, é algo que permeia o pensamento de muitas pessoas, que sonham em ter o seu próprio negócio, mas não sabem como isso pode se concretizar. Foi pensando nisso tudo que este capítulo foi estruturado, por meio de tópicos que irão demonstrar o raciocínio lógico que todo empreendedor deverá percorrer no caso de, por exemplo, tentar transformar o resultado da sua pesquisa em uma empresa real, entregando produtos e soluções inovadoras. Esperamos que esta leitura seja, acima de tudo, uma fonte de motivação para os caros leitores, uma vez que acreditamos na capacidade técnica e na força de vontade de todos que, por uma fração de segundo, já pensaram em oferecer soluções a partir da sua *expertise*.

# 1 | O QUE É UMA STARTUP?

De acordo com Gitahy (2016) – investidor-anjo brasileiro, conselheiro de empresas e fundador da Aceleradora (<http://aceleradora.net/>) – o termo *startup* se popularizou durante o período da primeira grande “bolha da Internet”, entre 1996 e 2001. Nos Estados Unidos esse termo já era utilizado há décadas como sinônimo de iniciar uma empresa e colocá-la em funcionamento. No entanto, somente quando empresas “.com” passaram a atuar no mercado eletrônico brasileiro é que o termo se popularizou em nosso país. Nessa época, *startups* eram vistas como um grupo de pessoas que trabalhavam com ideias inovadoras que, possivelmente, trariam grande retorno financeiro. Contudo, o termo foi redefinido por grandes referências da área, de diferentes maneiras.

Segundo Blank (2006), uma *startup* é considerada “uma organização temporária em busca de um modelo de negócio escalável e reproduzível”. De acordo com Ries (2012), “é feita para entregar produtos ou serviços sob condições de extrema incerteza”. Essa definição é amplamente aceita por especialistas e investidores e, apesar de simples, aborda conceitos e características que são comuns a *startups*, como: (i) o cenário de instabilidade, ou seja, a dificuldade em assegurar que a ideia ou projeto de empresa será sustentável e terá sucesso; (ii) a repetibilidade ou capacidade de disponibilizar várias vezes o mesmo produto e elevar as vendas sem que o custo acompanhe; (iii) a escalabilidade, fator-chave para sucesso de *startups*, pois significa a possibilidade de crescer cada vez mais em receita, sem que seus custos aumentem proporcionalmente, e, finalmente, (iv) o modelo de negócio, o qual descreve como a empresa cria, entrega e capta valor, ou seja, como a empresa ganha dinheiro (Blank, 2010).

Do ponto de vista de um investidor, Gitahy (2016) traz sua contribuição ao se referir a *startups* como organizações que buscam diminuir seus riscos e maximizar seu valor de negócio em tempo recorde. Nesse caso, investidores tendem a investir em negócios menos arriscados. Isso significa que as *startups* mais propensas ao sucesso são aquelas que combinam uma diminuição de seus riscos com potenciais aumentos de retorno financeiro e vantagens competitivas no mercado.

Muitos ainda pensam que *startups* são apenas empresas de Internet. Contudo, essa ideia não é verdadeira. *Startups* podem ser qualquer organização em fase inicial tentando resolver um problema cuja solução não é óbvia e o sucesso não é garantido. Elas são mais frequentes na Internet porque negócios na *web* são expandidos de forma muito mais barata, fácil e rápida (além de serem facilmente repetíveis) do que uma *startup* no setor do agronegócio ou biotecnologia, por exemplo. Contudo, é possível, sim, que um grupo de pesquisadores possa criar uma *startup* bem sucedida nessas áreas, afinal tudo começa com a identificação de uma oportunidade e uma boa ideia.

## 2 | IDENTIFICANDO A OPORTUNIDADE

Muitas vezes as pessoas acreditam que um negócio de sucesso surge a partir daquele momento “eureka”, de um *insight* genial, e que a caminhada rumo ao sucesso é mera questão de tempo. Ledo engano. Para que um empreendimento “aconteça”, seja ele uma *startup* ou uma empresa tradicional, é fundamental que seja identificada uma oportunidade. E o que seria essa tal oportunidade? Melhor: o que seria uma boa oportunidade? Normalmente as boas oportunidades estão alinhadas com aquilo que sabemos e/ou gostamos de fazer. Ou seja, a chance de que uma boa ideia seja identificada quando o foco está direcionado para algo que não estamos acostumados ou não gostamos, é muito pequena.

No caso da Regenera Moléculas do Mar, empresa de base tecnológica que oferece soluções em biotecnologia a partir do ambiente marinho brasileiro (Figura 1), tudo aconteceu a partir da soma de dois fatores: 1) anos de estudo e especialização e 2) vontade de fazer algo a partir desse conhecimento. Ou seja, empreender o que aprendemos. Na prática, foi durante o doutorado do Diretor-Presidente da empresa, Dr. Mário Luiz Conte da Frota Júnior, que a *startup* começou a ser idealizada.



**Figura 1.** Imagens representativas das atividades da Regenera Moléculas do Mar, empresa de base tecnológica que oferece soluções em biotecnologia a partir do ambiente marinho. Da coleta à bancada; da bancada à solução para o cliente.

A tese intitulada “A esponja marinha *Polymastia janeirensis* como fonte de novos fármacos contra o câncer”, defendida em 2008, investigou os efeitos de diferentes extratos de esponjas marinhas coletadas na costa de Santa Catarina, Brasil, na viabilidade de uma linhagem de glioma humano (U138MG). O trabalho também avaliou a seletividade dos extratos, caracterizou os mecanismos envolvidos no processo de morte celular e isolou as frações ativas responsáveis pelo efeito antiproliferativo encontrado. Em suma, os resultados obtidos sugeriram que a es-

ponja *P. janeirensis* poderia ser considerada como uma boa fonte para o desenvolvimento de novas drogas contra o câncer.

Contudo, não foram os resultados promissores do trabalho em si que despertaram uma inquietação no autor, Dr. Mário Frota Júnior, e sim o que a literatura da área relatava: se há algo novo para ser descoberto (em termos de moléculas mais potentes e inovadoras), esse algo está no mar! Assim, o questionamento natural foi: "existe alguma iniciativa bem estruturada a fim de proporcionar que esse conhecimento se transforme em novos medicamentos e soluções biotecnológicas, para diferentes setores da economia?".

Na época, um número muito pequeno de iniciativas foi identificado, sendo a maioria com viés mais acadêmico. O destaque observado foi a empresa PharmaMar S.A, situada na Espanha e focada na investigação em busca de moléculas com atividade antitumoral. Nesse caso, a empresa atua em toda a cadeia produtiva envolvida no desenvolvimento de um fármaco: da pesquisa e desenvolvimento até o quimioterápico comercial. Como bem referenciado em seus canais de comunicação, são líderes mundiais na descoberta de antitumorais de origem marinha. E por que tentar estruturar algo no Brasil, a partir da biodiversidade marinha brasileira? Ocorre que a literatura científica apontava (e continua apontando) a Amazônia Azul<sup>1</sup> como a área do globo com o maior potencial biotecnológico do mundo. Assim, estava identificada a oportunidade. O próximo passo? Transformar o resultado da bancada em um negócio rentável e sustentável, através de um plano de negócios detalhado e realista. Eis que surgem mais desafios: plano de quê?

### 3 | CAPACITAÇÃO EMPREENDEDORA

Conforme comentado anteriormente, o próximo passo, uma vez identificada uma boa oportunidade, é estruturar essa ideia em um plano de negócios. Contudo, unir dois mundos que deveriam andar de mãos dadas (academia e empreendedorismo) exige, além de persistência, conhecimento específico; em se tratando de Brasil, uma boa dose de coragem também se faz necessária.

Num movimento ainda recente, e por força da lei, as Instituições de Ensino Superior estão buscando se adequar a essa nova realidade dentro do ambiente acadêmico. Conforme determina a Lei de Inovação (10.973/2004), as Instituições Científicas e Tecnológicas (ICTs) devem

<sup>1</sup> Amazônia Azul: Com a finalidade de alertar a população sobre as riquezas naturais, biodiversidade e vulnerabilidade de nossa área oceânica, a Marinha do Brasil, em 2004, passou a denominá-la de "Amazônia Azul", fazendo um paralelo entre as riquezas existentes no nosso mar com aquelas presentes em nossa floresta. Assim, Amazônia Azul designa o conjunto dos recursos naturais, econômicos e estratégicos contidos na área de mar sob a jurisdição do País, correspondente à área oceânica da Zona Econômica Exclusiva Brasileira (ZEE), com aproximadamente 3,5 milhões de quilômetros quadrados, aos quais podem ser somados cerca de 900 mil quilômetros quadrados que são reivindicados pelo Brasil junto à Organização das Nações Unidas (ONU). Esta área corresponde a aproximadamente 50% de nosso território terrestre e representa um patrimônio de valor inestimável para o Brasil.

devem ter um Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT) com a finalidade de gerir sua política de inovação. Entre suas atribuições, essas estruturas devem cuidar das operações de licenciamento e de outras formas de transferência de tecnologia. Contudo, esse cenário gerou um grande desafio para os NITs, tanto por conta da necessidade de sustentabilidade financeira desses instrumentos de inovação, como pela falta de recursos humanos qualificados para gerir essa “nova” política de inovação. Além disso, um dos grandes problemas para quem almeja transformar um resultado de pesquisa numa tecnologia e/ou num modelo de negócio é justamente a cultura empreendedora (ou falta dela) dos brasileiros. Infelizmente, o professor/pesquisador brasileiro e o setor empresarial do país não estão alinhados em prol da inovação. Literalmente, falta capacitação empreendedora para os profissionais acadêmicos conseguirem vislumbrar as oportunidades, bem como comunicar ao setor produtivo a importância da sua pesquisa. Sendo assim, é fundamental a realização de ações de capacitação empreendedora, uma vez que as universidades não estão preparadas para dar o suporte adequado àqueles que almejam abrir um negócio inovador a partir dos resultados obtidos nos laboratórios de pesquisa.

Atualmente existem diversas iniciativas e programas de capacitação empreendedora, porém muitas delas fora do ambiente acadêmico. De toda forma, se a intenção for colocar uma boa ideia em prática, o futuro empreendedor deverá sair da sua zona de conforto e buscar auxílio com quem realmente entende o mundo dos negócios. Alguns dos programas de aceleração de *startups* mais populares no Brasil são os seguintes:

- **InovAtiva Brasil:** realizado pelo Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC) e pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (Sebrae), com execução da Fundação Centros de Referência em Tecnologias Inovadoras (Certi), é um programa de aceleração em larga escala gratuito, voltado para negócios brasileiros inovadores de todos os lugares e setores. Possui como mentores empreendedores experientes, executivos de empresas de médio e grande porte, investidores-anjos, executivos de fundos de investimentos e consultores de negócios ligados a áreas da tecnologia e escolhidos conforme área de atuação da empresa.
- **BioStartup Lab:** uma iniciativa da Biominas Brasil, instituição privada especializada em promover negócios de impacto em ciências da vida, e do Sebrae Minas, em parceria com a Secretaria de Estado de Desenvolvimento, Ciência e Tecnologia e Ensino Superior, de Minas Gerais. Tem como finalidade acelerar o surgimento de *startups* nas áreas de Saúde Humana, Digital Health, Agronegócio/Saúde Animal e Meio Ambiente, bem como potencializar o setor de ciências da vida em Minas Gerais. É um programa de pré-aceleração/aceleração que oferece captação de recursos e gestão de negócios, juntamente com a possibilidade de teste e validação dos produtos, modelos de comercialização, definição de mercado/usuários e aquisição de novas habilidades.
- **Braskem Labs:** o programa criado pela empresa do setor químico e petroquímico Braskem em parceria com a ACE (aceleradora de *startups* da América Latina) oferece capacitação para empreendedores que apresentem soluções usando química e/ou plástico e impacte

positivamente a sociedade nas mais diversas áreas, como agronegócio, saúde, transporte, alimentação, água e energia.

- **Startup Brasil:** o programa nacional de aceleração de *startups* é uma iniciativa do governo federal, criado pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), em parceria com aceleradoras, visando ao desenvolvimento de produtos ou serviços para o mercado. Disponibiliza suporte de mentores, investidores e profissionais de negócios e tecnologia.
- **Ahead Startup Farm / IBM Watson:** é o programa de aceleração da Startup Farm, aceleradora de empresas reconhecida em 2017 como a melhor aceleradora de empresas no *Startups Awards* (concedido pela Associação Brasileira de *Startups*), em parceria com a IBM, para *startups* de qualquer setor e estágio. Seu objetivo é incentivar e aprimorar projetos inteligentes e com possibilidade de gerar soluções reais.

Considerando o ambiente acadêmico, as iniciativas dos Núcleos de Inovação Tecnológica em forma de cursos, *workshops* e palestras são bastante esclarecedoras e de grande valia para o início de uma jornada empreendedora. Por experiência própria, o plano de negócio da Regenera Moléculas do Mar “surgiu” numa dessas iniciativas. Em específico, a Maratona de Empreendedorismo da UFRGS é um curso de extensão para diversas áreas do conhecimento e aberto ao público que tenha uma proposta de *startup* de impacto. Promovido anualmente pela Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico – Sedetec da UFRGS, através de seu Programa de Empreendedorismo, traz como objetivo principal capacitar e desenvolver o potencial de empreendedores, contribuindo para a criação de *startups* que atendam a demandas da sociedade.

É interessante destacar que os programas e iniciativas que promovem o empreendedorismo apresentam um ambiente pró-ativo e possuem uma importância no *networking* do empreendedor. O contato e parceria com pessoas no ramo de inovação e tecnologia com conhecimentos práticos de modelos de negócios e mercado podem contribuir como porta de entrada para grandes oportunidades, ou até mesmo ser portadores da própria oportunidade.

## 4 | MODELO DE NEGÓCIO

A estruturação da ideia para um negócio real passa primeiramente pelo desenho do modelo de negócio que precede a elaboração do plano de negócios. Segundo Osterwalder (2010), “um modelo de negócios descreve a lógica de criação, entrega e captura de valor por parte de uma organização”.

Uma forma muito popular de estruturar um plano de negócios é descrita no livro *Business model generation*, do suíço Alexandre Osterwalder. Trata-se do *Business Model Canvas*, uma forma de representar, desenvolvendo uma ferramenta com “linguagem comum para descrever, visualizar, avaliar e alterar modelos de negócios”. Esse modelo em forma de quadro (Figura 2) abrange os aspectos gerais da empresa que está sendo estruturada: a proposta de valor

(o que será feito); segmentos de clientes, relacionamentos com clientes e canais (qual será o público-alvo); principais parceiros, principais atividades e principais recursos (como será feito); estrutura de custo, fontes de receitas (qual será o custo) (SEBRAE, 2013). O propósito da montagem desse quadro é a organização das ideias e o entendimento da ligação dos aspectos avaliados, e deve ser ajustado conforme a necessidade até a validação do modelo de negócio e mesmo após a validação, pois é fundamental se adaptar à demanda do mercado.



**Figura 2.** Quadro de modelagem de negócios, também conhecido como *Business Canvas*, criado por Alexandre Osterwalder.

Após a elaboração e validação do modelo de negócio, inicia-se a criação do plano de negócio propriamente dito. O plano de negócio é um documento que representa a empresa e tem extrema importância no mundo das startups, pois é através dele que a maioria dos investidores avalia a capacidade da empresa e o potencial de retorno de seus investimentos. Serão descritos seis tópicos principais: i) Resumo executivo: síntese do conteúdo do plano; ii) Visão e missão: mostra as pretensões futuras para a empresa na visão do empreendedor; iii) Descrição geral: apresenta as competências de sócios e diretores, bem como os produtos ou serviços que serão comercializados; iv) Análise estratégica: baseada na pesquisa de mercado e com objetivos e metas estabelecidos; v) Plano de *marketing* e vendas: demonstra como será realizada a comercialização dos produtos ou serviços; vi) Plano financeiro: descreve a viabilidade do projeto, a quantidade de investimento necessária e o retorno financeiro presumido (SEBRAE, 2013).

Um dos tópicos mais importantes no modelo de negócio e principal ponto avaliado pelos investidores é a análise de mercado, na qual será possível identificar a real viabilidade da ideia.

#### 4.1 ANÁLISE DE MERCADO

Muitos negócios surgem a partir de uma oportunidade vislumbrada por um empreendedor que, quase sempre, é guiado por sua própria percepção de mercado e passa a acreditar que a sua ideia é “a melhor ideia do mundo”. Porém, para que um negócio tenha sucesso, não basta – apenas – confiar em sua ideia. É necessário saber, ao menos, o que os seus futuros

clientes querem e o que seus concorrentes oferecem. Esses questionamentos são a base para uma boa análise de mercado, cujas respostas definirão o direcionamento da *startup*. Veja, abaixo, passos importantes para uma análise de mercado da sua *startup*:

#### **4.1.1 FAÇA UMA BOA ANÁLISE DO SEU SETOR**

A análise do setor deve contemplar informações a respeito do tamanho, crescimento e estrutura do setor em que a sua *startup* está inserida em termos estatísticos e de práticas de *marketing*. Vivemos em um momento em que toda informação pode ser encontrada através de ferramentas de busca na Internet. Portanto, é importante utilizar ao máximo essas ferramentas a seu favor. As informações obtidas nessas buscas podem ser usadas no monitoramento de mudanças no setor, as quais podem representar novas oportunidades para seu negócio (Dornelas, 2014).

#### **4.1.2 IDENTIFIQUE SEUS CLIENTES**

Sabendo o setor em que a sua *startup* está inserida, avalie quais são seus potenciais clientes. O mercado encontra-se bem atendido? Tente identificar as características em comum de seus potenciais clientes para segmentar o mercado. Utilize redes sociais, fóruns de discussão, ou interaja pessoalmente para entender como seu produto ou serviço pode atender às necessidades e desejos dos seus clientes. Ao conhecer bem seu segmento de mercado, a *startup* pode satisfazer as necessidades de seus clientes de maneira mais eficaz.

#### **4.1.3 ESTUDE SEUS CONCORRENTES**

Busque o máximo de informações a respeito de seus concorrentes, para entender de que forma o seu produto ou serviço pode se diferenciar no mercado. Analise qual é a parcela de mercado (*marketshare*) de seus concorrentes, bem como os pontos fracos e fortes dessas companhias. Procure entender como é feita a precificação do seu concorrente e suas margens de lucro. Avalie onde o seu concorrente se encontra e se ele ainda possui espaço para crescimento no mercado. Para facilitar esse tipo de análise, diversos modelos foram desenvolvidos. Um deles, chamado “As cinco forças de Porter”, foi elaborado na década de 70 por Michael Porter, um dos mestres da administração moderna. O principal objetivo do modelo é deixar claro como cada elemento de um mercado pode influenciar, positiva ou negativamente, seu negócio. Hoje “As cinco forças de Porter” são consideradas um clássico e continuam sendo úteis, pois permitem obter uma visão mais ampla da sua concorrência, o que é indispensável para que uma empresa consiga se inserir no mercado e definir qual será seu posicionamento diante dos fornecedores, clientes e concorrentes. O modelo de Porter inclui a análise do poder de negociação dos fornecedores, poder de negociação dos clientes, ameaça de produtos substitutos, a ameaça da entrada de novos concorrentes e como todos esses fatores influenciam na rivalidade entre competidores. Analisar cada uma dessas forças não é tarefa fácil. No entanto, após esse estudo torna-se mais fácil identificar qual deve ser seu posicionamento para se diferenciar dos

concorrentes e alcançar o sucesso.

Vale ressaltar que não existe uma fórmula mágica para fazer uma análise de mercado. Cada *startup* possui sua cultura e segmento e, portanto, uma maneira distinta de procurar informações relevantes. Muitas *startups* são tão inovadoras que a resposta do mercado só virá após o lançamento de um protótipo ou um produto mínimo viável – do inglês, *minimum viable product*, ou apenas MVP. Nesses casos, torna-se necessário um conjunto de testes primários para validar a viabilidade do negócio. Essas experimentações utilizam uma versão ainda não finalizada de um produto, porém funcional, que é disponibilizada a um grupo seletivo de clientes. Se a resposta do público for positiva, conclui-se que o negócio é viável e a produção é acelerada. Caso contrário, aprende-se com os erros, já que esses testes permitem à *startup* entender as falhas e melhorias necessárias em seus produtos, conhecer o comportamento de seu público-alvo, e ajudam a perceber eventuais demandas de seus clientes antes de seus concorrentes. Para entender mais sobre o modelo do produto mínimo viável, recomenda-se a leitura de *Startup enxuta*, de Eric Ries.

## 5 | ALÔ, INVESTIDOR!

Uma vez calculado e identificado o potencial do modelo de negócio, e com a certeza ingênua de que a *startup* será um grande *case* de unicórnio<sup>2</sup> brasileiro, o empreendedor deverá buscar o melhor investimento para que o seu sonho vire realidade. Exatamente isso: um sonho que vai virar realidade. Mais importante do que tudo o que foi abordado até o presente momento, sem “brilho nos olhos” não existe investimento. Quando um investidor analisa propostas para investir seu dinheiro e *expertise* em uma *startup*, ele procura – além de um projeto muito bem estruturado – uma equipe qualificada e com muito brilho nos olhos. Sem alma, um bom plano de negócios não se transforma em uma excelente empresa.

Existem diversas modalidades de investimento, e isso vai depender do estágio da ideia ou empresa quando constituída, veja na tabela da página seguinte.

## 6 | INCUBE A SUA IDEIA

Um bom plano de negócios (e dinheiro, se possível) não significa que aquela ideia inicial, agora bem estruturada e com os riscos devidamente mapeados e calculados, vá deslanchar e se transformar na melhor *startup* do mundo. As incubadoras de empresas e os parques tecnológicos são os locais mais apropriados para absorver essa demanda cheia de boas intenções e soluções. Até mesmo um belo modelo de negócio necessita de instrumentos e ferramentas

<sup>2</sup> O termo unicórnio foi popularizado em 2013 pelo investidor Aileen Lee. Inspirado na “raridade” do ser mitológico, designa *startups* que passam por um crescimento exponencial, alcançando a avaliação de US\$1 bilhão por uma agência de capital de risco (Investopedia).

TIPO DE INVESTIMENTO	DEFINIÇÃO	ESTÁGIO DA IDEIA/EMPRESA	CONTRAPARTIDA* DE MANEIRA GERAL
<i>Bootstrap</i>	Utilização de recursos próprios.	Normalmente inicial, mas pode constar em todas as etapas.	—
Aceleradoras	Oferecem o aprimoramento do modelo de negócio e podem fazer pequenos aportes financeiros.	Inicial	Podem solicitar 5-15% da empresa.
Anjos	São profissionais experientes do mercado e das finanças, contribuindo financeiramente e no âmbito técnico/conceitual da empresa.	Inicial	Participação minoritária da empresa.
Capital semente	Fundo oficial ou privado (geralmente oferecem aportes maiores disponibilizados por investidores-anjos).	Inicial	Participação na empresa.
<i>Equity crowdfunding</i> "Financiamento coletivo"	O empreendedor formaliza o negócio na categoria de micro-empresa e disponibiliza o projeto em uma plataforma virtual de investimento (como um <i>site</i> ).	Inicial	Todas as pessoas que investirem receberão títulos que futuramente poderão ser convertidos em ações, a partir de operações regulamentadas na Bolsa de Valores.
Sócio capitalista	Indivíduo que investe o próprio dinheiro em uma empresa para retorno a longo prazo.	—	Participação na empresa e saída a longo prazo.
<i>Venture capital</i> "capital de risco"	É uma modalidade de investimento mais robusta, com aportes altos.	Empresa consolidada	Participação acionária.
<i>Growth capital</i> "capital de crescimento"	Aporte para o crescimento da empresa, para expansão ou reestruturação.	Empresa consolidada	—
<i>Private equity</i> "Ativo privado"	Modalidade de investimento similar ao <i>venture capital</i> , porém com aportes e operações maiores, realizado por fundos em empresas que não têm ações listadas em Bolsa de Valores.	Empresa consolidada	Parte das ações

específicas, normalmente "estranhas" aos novos empreendedores. Gestão, suporte jurídico e contábil, bem como estrutura apropriada, são fundamentais para qualquer *startup*.

O Brasil possui, atualmente, 369 incubadoras (ANPROTEC, 2016) e 94 parques tecnológicos, sendo implementados ou atuantes (CDT, UnB, 2014). Como vantagem, as incubadoras oferecem estrutura adequada para o desenvolvimento da ideia/protótipo de empresas que estão começando a caminhada, em um sistema sustentável, combinando competências acadêmicas e empresariais, estrutura física de fácil acesso financeiro, mentoria, e servindo como ponte para contatos com parceiros e até mesmo clientes.

Os parques tecnológicos, por sua vez, fornecem o suporte para empresas já consoli-

dadas, um ambiente ativo de inovação, aumentando o grau de competitividade das empresas frente ao mercado e concorrentes. Alguns parques, assim como incubadoras, disponibilizam instalações completas para determinadas necessidades, diminuindo a necessidade de aquisição de equipamentos pelas empresas. O principal aspecto é a disponibilização de área física para construção ou aluguel de baixo custo, comparado ao mercado em geral. Além disso, fornecem suporte de recursos humanos, ambientes compartilhados para reuniões e contatos importantes.

Importante ressaltar as mentorias que esses ambientes oferecem, pois no empreendedorismo há necessidade de aprendizado constante, atualização e renovação (do empreendedor e da empresa) frente ao mercado.

## 7 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Mesmo após o período de incubação (que varia muito de um local para outro), é necessário que a *startup* e os empreendedores estejam sempre conectados com o universo da inovação, buscando sempre mais capacitação, tendo em vista que a tecnologia e a inovação estão em constante mutação. O fato de a empresa já estar com um bom faturamento não significa que o negócio “deu certo”. Por isso, toda *startup*, em determinado momento, precisará se atualizar. Sem capacitação contínua e qualificada, seja através de um programa de aceleração, ou dos inúmeros cursos que fornecem suporte técnico aos empreendedores, a *startup* poderá enfrentar o pesadelo de todo empreendedor: o alto índice de mortalidade das empresas no Brasil.

A maior aceleradora da América Latina, Startup Farm, apontou que 74% das *startups* brasileiras encerram suas atividades em cinco anos de existência e cerca de 18% delas fecham antes de completar dois anos. Esse estudo, realizado de 2011 a 2016, traz uma alarmante realidade para quem sonha em empreender. Segundo Igor Mascarenhas, diretor de investimentos da Farm.VC, área da StartupFarm responsável pelo acompanhamento da evolução das *startups*, “As principais causas são conflitos entre os sócios e o desalinhamento entre a proposta de valor e o interesse do mercado” (SEBRAE, 2016).

Uma vez superados o período de incertezas e as novidades (que não serão mais novas), a *startup* poderá seguir diferentes caminhos. Muitas vezes, a empresa recebe um segundo ou terceiro aporte financeiro, aliado a um suporte de gestão, por parte de um eventual fundo investidor, por exemplo. Sem dúvida, esse é um bom caminho a ser seguido, desde que os objetivos estejam bem concatenados entre as partes. Outras possibilidades passam por aquisições e/ou remodelamento do negócio, visando a uma melhor adequação ao período pós-incubação. De toda forma, sem capacitação contínua e de qualidade, não há *startup* que sobreviva ao mundo dos negócios.

## REFERÊNCIAS

- Ahead Startup Farm. Disponível em: <<http://aceleracao.startupfarm.com.br/>>. Acesso em: 24 jun. 2017.
- Anprotec (2016) **Estudo do impacto econômico – Segmentos de incubadoras de empresas do Brasil**. Disponível em: <[http://www.anprotec.org.br/Relata/18072016%20Estudo\\_ANPROTEC\\_v6.pdf](http://www.anprotec.org.br/Relata/18072016%20Estudo_ANPROTEC_v6.pdf)>. Acesso em: 24 jun. 2017.
- Biostartup Lab. Disponível em: <<http://biostartuplab.org.br>>. Acesso em: 24 jun. 2017.
- Blank, S. (2012) **Do sonho à realização em 4 passos**. São Paulo: Évora.
- Blank, S. (2010) **What's a startup: first principles**. Disponível em: <<https://steveblank.com/2010/01/25/whats-a-startup-first-principles/>>. Acesso em: 29 maio 2017.
- Brasken Labs. Disponível em: <<http://www.braskemlabs.com/>>. Acesso em: 22 jun. 2017.
- CDT, UnB (2014) **Estudo de Projetos de Alta Complexidade: indicadores de parques tecnológicos / Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Disponível em: <[http://www.anprotec.org.br/Relata/PNI\\_FINAL\\_web.pdf](http://www.anprotec.org.br/Relata/PNI_FINAL_web.pdf)>. Acesso em: 22 jun. 2017.
- Dornelas, J. (2014) **Como fazer análise de mercado**. Disponível em: <<http://www.josedornelas.com.br/wp-content/uploads/2014/02/Artigos-de-PN-Como-Fazer-An%C3%A1lise-de-Mercado.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2017.
- Empreendedorismo UFRGS. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/empreendedorismo/>>. Acesso em: 25 jun. 2017.
- Gitahy, Y. (2016) **O que é uma startup?** Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/pme/o-que-e-uma-startup/>>. Acesso em: 30 jun. 2017.
- Gitahy, Y. (2016) **Redefining a startup: an investor's perspective**. Disponível em: <[https://www.linkedin.com/pulse/redefining-startup-investors-perspective-yuri-gitahy?lipi=urn%3Ali%3Apage%3Ad\\_flasghip3\\_profile\\_view\\_base%3BrlpJEpvSVy7botDcvJo6Q%3D%3D](https://www.linkedin.com/pulse/redefining-startup-investors-perspective-yuri-gitahy?lipi=urn%3Ali%3Apage%3Ad_flasghip3_profile_view_base%3BrlpJEpvSVy7botDcvJo6Q%3D%3D)>. Acesso em: 16 jun. 2017.
- Inovativa Brasil. Disponível em: <<http://www.inovativabrasil.com.br/>>. Acesso: 24 jun. 2017.
- Investopedia. **Unicorn definition**. Disponível em: <<http://www.investopedia.com/terms/u/unicorn.asp>>. Acesso em: 01 jun. 2017.
- Osterwalder, A.; YvesVES Pigneur. *Business model generation: a handbook for visionaries, game changers, and challengers*. New York: Wiley, 2010.
- Ries, E. (2011) **The lean startup**. New York: Crown Business.
- Ries, E. (2012) **A startup enxuta**. São Paulo: Leya.
- Sebrae (2013) **O quadro de modelos de negócios – um caminho para criar, recriar e inovar**. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/Cartilha%20o%20Quadro%20do%20Modelo%20de%20Negocios.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2017.
- Sebrae (2013) **Como elaborar um plano de negócios**. Disponível em: <[https://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/COMO%20ELABORAR%20UM%20PLANO\\_baixa.pdf](https://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/COMO%20ELABORAR%20UM%20PLANO_baixa.pdf)>. Acesso em: 26 jun. 2017.
- Sebrae (2016) **Sobrevivência das empresas no Brasil**. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/sobrevivencia-das-empresas-no-brasil-relatorio-2016.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2017.
- Startup Lab. Disponível em: <<http://startupbrasil.org.br/>>. Acesso em: 26 jun. 2017.









Criado no escopo do VI Plano Setorial para os Recursos do Mar – PSRM, o Comitê Executivo para a Formação de Recursos Humanos em Ciências do Mar – PPG-Mar tem por objetivo apoiar a formação de profissionais com sólido embasamento teórico e prático, capacitados para contribuir com a pesquisa, a conservação e a exploração ordenada dos recursos costeiros e marinhos.

A produção de material didático, uma das vertentes da ação do PPG-Mar, contexto em que se insere o presente livro de Biotecnologia Marinha, congrega integrantes da comunidade científica para que, a partir do conhecimento construído nas diversas instituições brasileiras, elaborem títulos essenciais à melhoria da qualidade do ensino de graduação e de pós-graduação em Ciências do Mar, área do saber que se dedica à produção e disseminação de conhecimentos sobre os componentes, processos e recursos do ambiente marinho e zonas de transição.

Os livros produzidos pelo PPG-Mar são custeados pelo Ministério da Educação – MEC e distribuídos gratuitamente aos estudantes, docentes e bibliotecas das instituições voltadas ao ensino e à pesquisa em Ciências do Mar, sendo também disponibilizados digitalmente no endereço <https://cienciasdomarbrasil.furg.br/>.



UFRJ



FURG  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE



PPG - Mar



SECIRM



Comissão Interministerial  
para os Recursos do Mar

MINISTÉRIO DA  
EDUCAÇÃO

MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA  
E INOVAÇÕES



PÁTRIA AMADA  
BRASIL  
GOVERNO FEDERAL