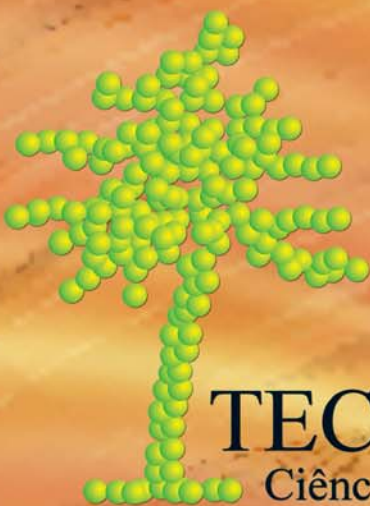




BIO[®] TECNOLOGIA

Ciência & Desenvolvimento



ano VI - número 30 - janeiro/junho 2003

Novas Aplicações para a Engenharia Genética - Entrevista
Predição do Potencial de Alergenicidade em OGMs
Resistência de Inimigos Naturais a Pesticidas
O Mapeamento Genético no Melhoramento de Plantas
Filmes Comestíveis de Quitosana
Bactérias Produtoras de Biossurfactantes
Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais
Biovidros
Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais
Degradação Seletiva de Proteínas e suas Implicações no Câncer
Archaea: Potencial Biotecnológico
Otimização da Propagação *In vitro* de Curauá
Cianobactéria Invasora
Marcadores Moleculares e Geminivírus
Glucanases Fúngicas
Biossegurança em Biotérios
A Biotecnologia e a Extinção de Espécies

www.bioteecnologia.com.br

KL3



Novas Aplicações para a Engenharia Genética

Entrevista concedida a
Maria Fernanda Diniz

Engenharia genética pode ajudar a prevenir e curar o câncer de mama



O câncer de mama é um dos males que mais aflige a população feminina em todo o mundo. A cada ano, 182 mil mulheres são diagnosticadas com câncer de mama e, dessas, 43 mil morrem. Apesar de ser uma enfermidade com grandes chances de cura, quando detectada no início, ainda é a pior ameaça para as mulheres brasileiras, pois é o tumor maligno feminino de maior incidência e mortalidade no país. Nos últimos 20 anos, segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), a mortalidade por câncer de mama cresceu cerca de 60%. A taxa de incidência desse câncer no Brasil foi estimada em 40,7 casos para cada 100 mil mulheres e a de mortalidade em 10,3 para o mesmo número de mulheres. As causas para o aumento da incidência dessa doença nas últimas décadas estão associadas aos estresses da vida moderna e à mudança de comportamento das mulheres, que hoje ocupam grande parte do mercado de trabalho e consomem em muito maior quantidade substâncias nocivas, como cigarros e bebidas alcoólicas.

A engenharia genética pode ser um caminho promissor para a prevenção e a cura de muitas enfermidades, inclusive do câncer de mama. Diante disso, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, através da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, uma de suas 40 unidades de pesquisa, localizada em Brasília, DF; a Universidade de Campinas (Unicamp); a Universidade de Brasília (UnB) e a Universidade de Montevidéu, no Uruguai, se uniram para desenvolver variedades de soja transgênica com anticorpos anticâncer contra o câncer de mama. Essas variedades serão utilizadas para produção de fármacos que atuarão na prevenção e diagnóstico da doença e terão também potencial terapêutico, mesmo com o câncer em estágio avançado. É importante ressaltar que elas não serão usadas na cadeia alimentar, mas apenas como medicamentos.

Os anticorpos monoclonais para uso clínico movimentam mais de US\$ 1 bilhão nos EUA. No Brasil, a utilização desses anticorpos na área médica ainda é pequena. O principal anticorpo monoclonal usado clinicamente é o anti-CD3, que atua na prevenção da rejeição decorrente de transplantes de órgãos. O Instituto Butantã, de São Paulo, produz e distribui esse medicamento no Brasil. Os métodos e estratégias para produção de novos anticorpos evoluíram, incorporando a manipulação genética, e a flexibilidade nessa manipulação fez desses anticorpos produtos de alto valor econômico e com grandes perspectivas de utilização, especialmente para a prevenção e tratamento de algumas enfermidades.

Para falar sobre essa pesquisa e outras questões relacionadas ao desenvolvimento de produtos transgênicos no Brasil, a revista **BIOTECNO-**



LOGIA, CIÊNCIA & DESENVOLVIMENTO entrevistou o pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Elíbio Rech. Durante a entrevista, ele ressaltou os benefícios que a tecnologia do DNA recombinante pode trazer para as áreas de saúde e de alimentação, através da expressão de proteínas de interesse em plantas e animais, que passarão a atuar como biofábricas, o que certamente barateará os custos de produção, além de possibilitar a produção em larga escala. Elíbio enfocou ainda questões polêmicas e atuais, como a rotulagem dos produtos transgênicos, entre outras. Vejam agora a entrevista:

BC&D – Em que ponto de desenvolvimento está a pesquisa para produção da soja transgênica com o anticorpo anticâncer de mama?

Elíbio Rech - A pesquisa está em estágio avançado. Já temos sementes de soja em nossos laboratórios produzindo 25 mg de anticorpos em uma semente, o que é um índice muito bom. A estimativa é produzir alguns quilos do anticorpo em apenas um hectare. O próximo passo é purificar as sementes (fazer um extrato a partir da semente, no qual só o anticorpo é isolado) e enviá-las ao Instituto Pasteur para avaliação sobre o potencial dessas sementes contra o câncer de mama. Eu acredito que essa etapa esteja pronta até o segundo semestre de 2004.

BC&D - Como foi feito o processo de transformação genética dessa soja?

Elíbio Rech - Os anticorpos inseridos nas plantas de soja foram isolados na Universidade de Montevideu a partir de camundongos. Depois, eles passaram por um processo conhecido como “humanização”, ou seja, fazer com que sejam aceitos por seres humanos [A utilização de fármacos à base de anticorpos recombinantes vem se tornando uma realidade em todo o mundo]. Os produtos humanizados também já ganham volume no mercado. Nos

EUA, vários anticorpos humanizados já foram liberados pelo FDA (“Food and Drug Administration”) e um grande número se encontra em fase de testes clínicos, o que indica que nos próximos dez anos, o mercado deverá estar repleto desses anticorpos de última geração. A pers-

“O objetivo é desenvolver plantas e animais que atuem como biofábricas, ou seja, que expressem características de interesse para os seres humanos e os animais.”

pectiva é de que a tecnologia de anticorpos recombinantes venha a fornecer insumos para diversas áreas da medicina, que incluem desde agentes imunomoduladores até vacinas recombinantes. Essa tecnologia tem sido utilizada no tratamento de doenças graves como o câncer e a AIDS, além da prevenção de doenças bacterianas. É importante ressaltar que o domínio de técnicas de manipulação genética foi fundamental para a seleção, redefinição e humanização desses anticorpos.

“... esses fragmentos, conhecidos como anticorpos modernos, conseguem penetrar os tumores sólidos e praticamente não causam efeitos colaterais.”

A inserção dos genes nas plantas de soja foi feita pela nossa equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que já domina as tecnologias de transgenia. Além de agregar valor à soja, uma das nossas maiores preocupações é baratear os custos de produção dos fármacos a base de anticorpos. A produção de anticorpos recombinantes em plantas apresenta um grande potencial biotecnológico devido ao baixo custo de produção e à facilidade de introdução do transgene.

BC&D – De que maneira a engenharia genética pode intensificar a utilização de anticorpos no Brasil, já que apresentam bom potencial para cura de muitas enfermidades?

Elíbio Rech - A utilização de anticorpos sempre mostrou bom potencial para o diagnóstico e tratamento de muitas doenças, mas antigamente eles tinham que ser utilizados em sua forma integral, o que onerava e dificultava o processo. A engenharia genética tornou possível a geração de anticorpos recombinantes, desenvolvidos em laboratório, que se constituem em pequenos fragmentos capazes de expressar suas características de interesse nas plantas. Além de diminuir os custos do processo, esses fragmentos, conhecidos como anticorpos modernos, conseguem penetrar os tumores sólidos e praticamente não causam efeitos colaterais. Por isso, eu acredito que esse é um dos caminhos mais promissores da medicina no futuro. A tecnologia de desenvolvimento dos anticorpos monoclonais recombinantes e sua eficiência já estão mais do que comprovados, mas é preciso desenvolver a sua produção em larga escala a custos menores. Os produtos à base de anticorpos existentes hoje no mercado brasileiro, como o Zenapax e a Herceptina têm custos muito altos e são inacessíveis para a maior parte da população.

BC&D – Existem outras pesquisas nessa linha sendo desenvolvidas no Brasil?

Elíbio Rech - A manipulação genética pode ser uma boa opção para reduzir os custos e otimizar a produção de medicamentos. E, por isso, o desenvolvimento das plantas de soja com os anticorpos anticâncer não são a única pesquisa da Embrapa nessa linha. Na verdade, a Empresa, através de três de suas unidades de pesquisa – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Instrumentação Agropecuária (São Carlos, SP), e Embrapa Soja (Londrina, PR) – a Unicamp, a Universidade de Brasília (UnB), a Universidade de São Paulo (USP), a Universidade de Montevideu e o Instituto Butantã formaram uma rede para produção de biomoléculas voltadas para a saúde humana e animal. O objetivo é desenvolver plantas e animais que atu-

em como biofábricas, ou seja, que expressem características de interesse para os seres humanos e os animais. Atualmente, além das plantas de soja com os anticorpos anticâncer, estão sendo desenvolvidas também plantas de soja com o hormônio do crescimento humano; dois outros anticorpos com a UnB; alface e tomate transgênicos com uma proteína anti-diarréica; além de animais transgênicos com características de interesse no leite. Dessas pesquisas, a que está em fase mais adiantada é a soja transgênica com os anticorpos contra o câncer de mama.

É muito importante ressaltar que nenhuma dessas plantas vai fazer parte da cadeia alimentar. Todas elas serão utilizadas para a produção de fármacos.

BC&D – Recentemente, a mídia divulgou amplamente uma pesquisa baseada na utilização de proteínas da teia de aranha e que pode beneficiar vários setores da indústria. Em que estágio se encontra essa pesquisa?

Elíbio Rech – Essa pesquisa é muito interessante e está sendo conduzida em parceria com o Instituto Butantã, Universidade de São Paulo (USP), Unicamp e com a Embrapa Instrumentação Agropecuária, em São Carlos, SP. Trata-se do estudo das proteínas que compõem as teias de aranhas e que pode ser a chave para incrementar diversos setores da indústria, além da área médica. A pesquisa na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia está sendo conduzida por mim e pelo pesquisador Francisco Aragão, além dos técnicos e estudantes que compõem a nossa equipe. A manipulação das proteínas encontradas nas teias de algumas aranhas brasileiras permitiu entender o funcionamento das folhas alfa e beta, que são as responsáveis pela rigidez e elasticidade dos fios. Esse estudo vai gerar benefícios para a indústria de vestuário, através da fabricação de novos tipos de tecidos, sem falar na área médica, que vai poder contar com fios mais finos e resistentes, muito úteis para a sutura. A pesquisa

ainda está em fase inicial. No momento, estamos empenhados na busca de genes que são expressos nas glândulas das aranhas brasileiras, com o objetivo de formar um banco genético na Unidade. Algu-

"O que eu acho que existe é uma certa inércia da indústria para a criação de novas fábricas, que hoje são muito necessárias em função da descoberta cada vez mais ágil de novas moléculas, oriundas da biodiversidade, e em alguns casos até a partir de fitoterápicos."

mas espécies potencialmente interessantes já foram coletadas e encontram-se no Butantã.

BC&D – O grande avanço da indústria farmacêutica, que se encontra em poder das multinacionais, tem feito com que as pessoas se esqueçam do grande potencial dos remédios fitoterápicos. Na sua avaliação, os produtos geneticamente modificados com propriedades medicinais podem

"... essa tecnologia de plantas transgênicas vai exatamente ao encontro de uma demanda da sociedade, que é a redução da utilização de defensivos químicos com a conseqüente redução de seus efeitos para o meio ambiente. Não existe nenhum antagonismo entre os transgênicos e o meio ambiente, muito pelo contrário."

vir a sofrer algum tipo de boicote por parte dessas grandes empresas que, potencialmente, perderiam mercados?

Elíbio Rech – Essa questão tem dois pontos importantes, que devem ser enfatizados. Um se refere aos medicamentos fitoterápicos, que têm sido utilizados principalmente por comunidades locais e indígenas com sucesso porque os povos dessas comunidades detêm o conhecimento tradicional e conhecem os efeitos e formas de utilização das plantas medicinais. Mas, do ponto

de vista da medicina, o ideal é que esses produtos passem por testes científicos para que se conheçam a fundo as suas propriedades medicinais. Muitos deles não apresentam nenhum efeito do ponto de vista da ciência e os seus resultados são puramente de caráter somático. Os fitoterápicos e seus efeitos precisam ser estudados. Daí a importância da ciência e da tecnologia, que disponibilizam as ferramentas necessárias para estudar e conhecer as aplicações de diferentes produtos oriundos de plantas.

O segundo ponto está relacionado à indústria farmacêutica. Eu, particularmente, não acredito em boicote. O que eu acho que existe é uma certa inércia da indústria para a criação de novas fábricas, que hoje são muito necessárias em função da descoberta cada vez mais ágil de novas moléculas, oriundas da biodiversidade, e em alguns casos até a partir de fitoterápicos. As empresas teriam que mudar toda a sua estrutura e até que ponto será que elas estão interessadas nessa vantagem comercial e vão estimular o estabelecimento de novas fábricas? Na verdade, o cenário mundial hoje se constitui de sistemas já estabelecidos para produção de proteínas recombinantes, como por exemplo, a vacina da hepatite B, a insulina e o hormônio do crescimento humano, entre outros. Essas proteínas são vendidas na farmácia, mediante prescrição médica. Elas já existem no mercado, são fabricadas por diversas empresas e estão à disposição dos consumidores.

A tecnologia do DNA recombinante permite a geração de novas moléculas oriundas da biodiversidade em ritmo cada vez mais acelerado. Por exemplo, nós estamos testando, em parceria com a USP, uma nova molécula chamada gomesina, um peptídeo isolado de uma aranha, e que tem potencial contra bactérias e, por isso, pode ser usado para a fabricação de antibióticos, e é eficiente também contra alguns fungos. O nosso objetivo é desenvolver um sistema para expressá-la porque até hoje ela nunca foi expressa em nada, a não ser

na aranha. Estamos buscando formas para expressá-la em plantas ou no leite de animais. Mas esse é apenas um exemplo de um mercado que está em expansão porque novas moléculas potencialmente interessantes estão sendo constantemente descobertas e precisam ser produzidas. Existem algumas fábricas de produção já estabelecidas, mas são muito caras e já estão atingindo o seu limite de produção. Então têm que ser criadas novas fábricas, o que pressupõe grande investimento, já que a montagem de cada uma delas envolve milhões de dólares. A possibilidade de produzi-las em biofábricas -plantas ou animais – reduz os custos de produção e, conseqüentemente, do produto final. Pelo que eu sei, já existe em nível internacional um reconhecimento por parte das indústrias de que muitas moléculas estão chegando e que as fábricas já estabelecidas não serão capazes de produzi-las. Os sistemas de expressão alternativos, como as biofábricas, também já são reconhecidos pela indústria como uma potencial solução para suprir a demanda a custos mais baixos, mas como eu disse anteriormente, ainda existe uma certa inércia em mudar toda a estrutura já existente.

BC&D – As vacinas transgênicas podem ajudar a controlar outras doenças que afligem a população mundial, como a gripe e a tuberculose?

Elíbio Rech – Sem dúvida. É importante lembrar que cada caso é um caso, mas existem duas aplicações básicas. A primeira é a produção de medicamentos em larga escala. A grande vantagem da produção em planta é que não há o perigo de contaminação, como aconteceu com a doença da vaca louca, por exemplo. Se o hormônio do crescimento humano for produzido em planta, depois de purificado, o ser humano pode ter segurança total de que não será contaminado por nenhum vírus. Mas quando é produzido em animais, o controle na purificação tem que ser muito mais rígido, já que

normalmente o processo é feito com mamíferos e nós também somos mamíferos, então há mais chance de que microrganismos passem para as moléculas. Logo, a produção dessas moléculas em plantas é uma segu-

“Hoje existe a noção errada de que tudo que é natural é bom. Nem sempre é assim. Enquanto a atenção da sociedade está desviada para os produtos transgênicos, que hoje são os vilões de plantão, os produtos orgânicos são aceitos sem restrições, quando deveriam ser muito mais questionados.”

rança adicional para o consumidor. Mas, se todas as regras de segurança forem seguidas à risca, o processo pode ser feito também com animais e bactérias sem riscos para os seres humanos. No caso de vacinas, a situação é um pouco diferente, já que são feitas na maior parte em plantas. Mas há um ponto que eu gostaria de enfatizar novamente: nenhum desses produtos vai entrar na cadeia alimentar. Serão utilizados

“... a rotulagem vai enfrentar algumas dificuldades, como controlar alimentos que são vendidos em lugares alternativos. Como saber, por exemplo, se a pamonha vendida na beira da estrada é feita a partir de milho transgênico?”

somente como fármacos. Eles vão integrar a cadeia de medicamentos, o que implica alguns cuidados especiais, como por exemplo, no transporte, que tem que ser feito em caminhão fechado para não correr o risco de que alguma planta de soja caia na estrada e possa ser plantada. Quanto às plantas-vacinas transgênicas, há ainda outra questão importante a ser ressaltada: elas nunca serão vendidas em feiras ou como fitoterápicos. Serão vendidas na farmácia, como medicamentos, sob prescrição médica. É claro que por exemplo o alface transgênico para combater a leishmaniose não será vendido em folha na farmácia. As folhas serão liofilizadas (processo

em laboratório pelo qual se transforma a folha em pó), quantificadas, padronizadas e colocadas dentro de cápsulas para serem vendidas.

BC&D – Enquanto se fala muito das plantas transgênicas, desvia-se a discussão dos males causados pelos agrotóxicos tanto para o meio ambiente quanto para a saúde da população. Você concorda?

Elíbio Rech – Sem dúvida, concordo, claro. A questão é a seguinte: essa tecnologia de plantas transgênicas vai exatamente ao encontro de uma demanda da sociedade, que é a redução da utilização de defensivos químicos com a conseqüente redução de seus efeitos para o meio ambiente. Não existe nenhum antagonismo entre os transgênicos e o meio ambiente, muito pelo contrário. Uma questão, entretanto, que deve ser amplamente debatida pela sociedade, e não tem sido, é com relação aos produtos orgânicos. Por que? A base desses produtos é o esterco. E o esterco, tanto de galinha, quanto de bovinos normalmente apresenta grande quantidade de antibióticos, principalmente no caso das aves, que ficam depositados no solo. Os produtos orgânicos, como qualquer outra tecnologia, têm que ser devidamente regulamentados, o que não tem acontecido no Brasil, onde são vendidos livremente em feiras, sem nenhum tipo de selo. Em alguns lugares, como supermercados e em grande parte das feiras de São Paulo, esses produtos já são regulamentados, mas na maior parte dos estados brasileiros, isso não acontece. Então, eu acho que a população se engana redondamente com relação aos alimentos orgânicos, por exemplo, que podem ser de alto risco se não forem fiscalizados. Hoje existe a noção errada de que tudo que é natural é bom. Nem sempre é assim. Enquanto a atenção da sociedade está desviada para os produtos transgênicos, que hoje são os vilões de plantão, os produtos orgânicos são aceitos sem restrições, quando deveriam ser muito mais questionados.

BC&D – Na sua avaliação, quais as vantagens práticas e potenciais que as plantas transgênicas têm em relação às convencionais?

Elíbio Rech – Depende, a situação deve ser avaliada caso a caso. Mas no contexto atual podem ser ressaltadas as seguintes características: tolerância a herbicidas, resistência a insetos e vírus, e modificação da qualidade protéica. A qualidade nutricional beneficia diretamente o consumidor. As outras não, beneficiam o produtor através da redução de custos de produção; melhor competitividade no mercado externo e a redução no uso de defensivos agrícolas. Sem falar nos benefícios para o meio ambiente. O agronegócio é que tem impulsionado esse país. Então, é fundamental integrar tecnologia ao sistema de produção de alimentos.

BC&D – As sementes devem ser consideradas patrimônio da humanidade. No seu ponto de vista, esses mesmos princípios podem ser empregados também no caso das sementes transgênicas?

Elíbio Rech – Veja bem, só para fazer uma comparação. A nossa Lei de Proteção de Cultivares dá prerrogativa ao produtor – especialmente para o pequeno, que só usa aquela semente para o seu sustento – de comprar a semente, plantar, colher e utilizá-la no ano seguinte novamente. Então, ele não precisa comprar. Nos EUA, a legislação não oferece essa prerrogativa e, por isso, as sementes têm que ser compradas todos os anos. É claro que as situações dos dois países são completamente diferentes. Nos EUA, a agricultura é extremamente subsidiada, além de outras vantagens. Mas o ideal seria que o agricultor brasileiro também pudesse comprar as sementes todos os anos porque a qualidade da semente se torna bem melhor. Então, respondendo a pergunta, é claro que qualquer tipo de semente representa uma agregação de valor e soberania para os países. Não sei como essa situação vai ficar no futu-

ro, mas hoje, com a Lei de Proteção de Cultivares, é possível fazer um mapeamento da planta, de forma que se alguém utilizá-la no futuro, a pessoa que a desenvolveu tem como localizá-la e cobrar o que é devido.

“Os transgênicos no Brasil foram colocados no banco do réus, sem nenhuma acusação concreta. Ou seja, estão seguindo o caminho inverso ao aceitável: são culpados até que se prove sua inocência. Como é que uma sociedade pode evoluir nesse sentido?”

Então, eu acho que sim, tanto faz se a semente for transgênica ou não.

BC&D – A SBPC (Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência), em texto publicado a respeito de OGM's diz que: “a introdução de OGM's na cadeia de produção de alimentos para uso humano requer a divulgação através da rotulagem de cada produto, dando informações detalhadas e compreensíveis. Como você analisa essa questão?”

Elíbio Rech – A rotulagem é um direito do consumidor. E é uma questão que o país deve decidir. Se o Brasil decidir rotular, tudo bem. Mas para mim essa não é a questão principal. O fato de o produto ser rotulado não diz se ele é seguro. E é isso o que o consumidor deve saber de fato: se os produtos que chegam às prateleiras dos supermercados são seguros. Além disso, é importante que as pessoas saibam que a rotulagem vai enfrentar algumas dificuldades, como controlar alimentos que são vendidos em lugares alternativos. Como saber, por exemplo, se a pamonha vendida na beira da estrada é feita a partir de milho transgênico? Nos EUA, onde a população confia nos órgãos de fiscalização e regulamentação, os produtos não são rotulados. A sociedade não exigiu isso. Então, o que eu acho é que a sociedade tem que confiar em duas instâncias: primeiro, nos cientistas. Segundo, nas instituições de regu-

lamentação e fiscalização federais e estaduais. A sociedade deve exigir segurança. Eu participei recentemente de um seminário internacional em São Paulo, no qual foi levantada uma questão muito interessante: nos EUA, todo produto é seguro até que se prove o contrário; na França, é o contrário. Já no Brasil, a situação é inédita, pois aqui os produtos transgênicos são seguros e inseguros, ao mesmo tempo. Isso porque a polarização – a favor e contra esses produtos – faz com que sejam taxados de seguros por um grupo e de inseguros por outro. E o consumidor fica perdido no meio, sem saber o que fazer. Os transgênicos no Brasil foram colocados no banco do réus, sem nenhuma acusação concreta. Ou seja, estão seguindo o caminho inverso ao aceitável: são culpados até que se prove sua inocência. Como é que uma sociedade pode evoluir nesse sentido? A sociedade brasileira tem que confiar mais nas suas instituições. Se não existe essa confiança, então o problema é mais sério e transcende os produtos transgênicos. Nesse caso tem que haver cobrança, pressão para que as autoridades melhorem o sistema, como por exemplo, com a contratação de mais fiscais. Por outro lado, eu acho que essa discussão sobre os produtos transgênicos é muito importante para a nossa sociedade porque é um exercício de avaliação crítica. Esses produtos abriram o caminho para que qualquer nova tecnologia que venha a “bater à nossa porta” daqui pra frente seja questionada. Eu torço para que a sociedade direcione brevemente esse questionamento para os produtos orgânicos, como eu já disse no início dessa entrevista. Será que são tão naturais assim? O aprimoramento do senso crítico em uma sociedade só traz benefícios. A discussão social é sempre muito saudável, mas a população deve ficar atenta porque o que não é nada saudável é excluir o Brasil da tecnologia de desenvolvimento de produtos transgênicos, que é fundamental para o seu desenvolvimento e competitividade internacional. 

Agora o site da **Biotecnologia** virou um **Mega Portal** de conteúdo. www.biotecnologia.com.br



Visite e tenha informações sobre a Revista, **notícias** online, **chat** com pesquisadores, **fórum** de discussão e legislação, **Congresso Nacional** e todas as **edições** da Revista Biotecnologia, inclusive com serviço de busca e muito mais.



BIOTECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento
KL3 Publicações

Fundador

Dr. Henrique da Silva Castro

Direção Geral e Edição

Ana Lúcia de Almeida

E-mail

biotecnologia@biotecnologia.com.br

Home-Page

www.biotecnologia.com.br

Projeto Gráfico

KL3 Publicações LTDA

SHIN CA 05 Conjunto "J"

Bloco "B" Sala 105

Lago Norte - Brasília - DF

Tel.: (061) 468-6099

Fax: (061) 468-3214

**Os artigos assinados são de
inteira responsabilidade
de seus autores.**

ISSN 1414-4522

Carta ao Leitor

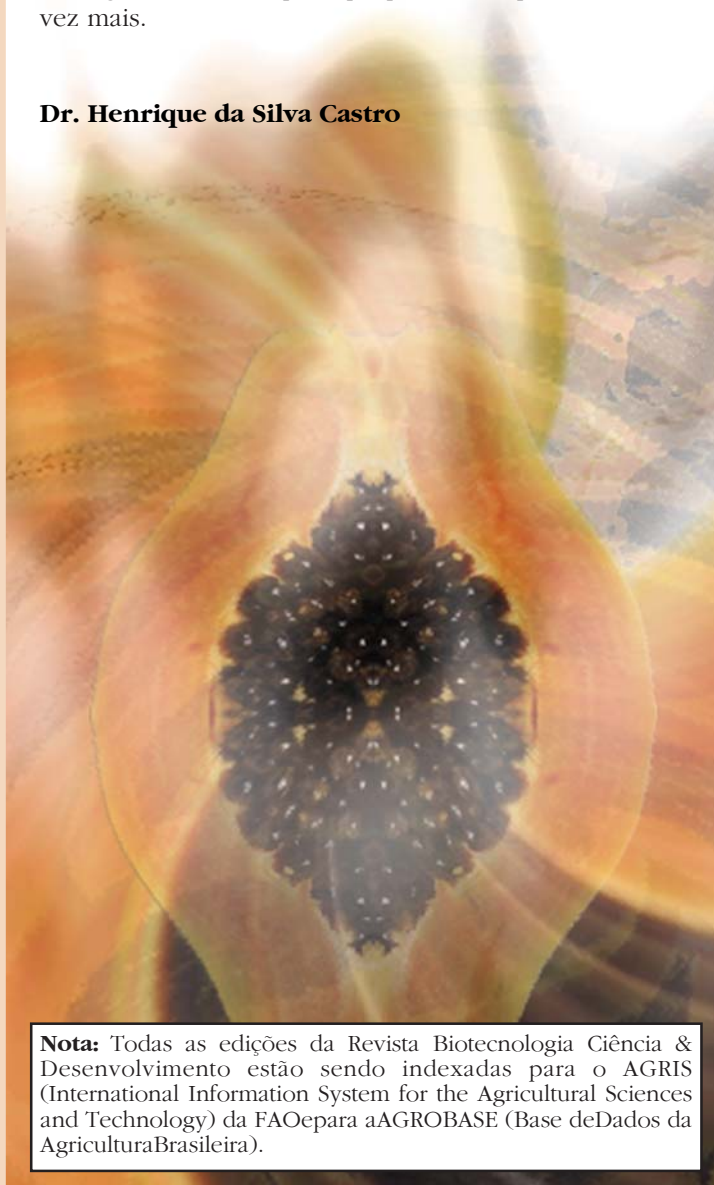
Prezados Leitores,

Como já informamos, a revista Biotecnologia foi reestruturada desde a edição anterior e está sendo editada apenas em sua versão on line, disponível no site www.biotecnologia.com.br, à toda comunidade científica, com duas edições anuais, tanto em formato html como também em pdf, e obedecendo os mesmos critérios e objetivos que nortearam nosso trabalho desde sua fundação, em 1997, como a indexação e a divulgação da pesquisa no país.

Nesta edição, contamos com a prestigiosa colaboração do Dr. Elíbio Rech, pesquisador da Embrapa Cenargen, que em nossas páginas verdes nos conta a respeito não apenas sobre novas aplicações dentro das múltiplas possibilidades da engenharia genética, como dá sua opinião sobre temas tão polêmicos, como a rotulagem dos produtos transgênicos, e até mesmo sobre os alimentos orgânicos, tão em moda em nossos dias.

Esperamos que nossos leitores continuem também interagindo conosco, para que possamos aperfeiçoar cada vez mais.

Dr. Henrique da Silva Castro



Nota: Todas as edições da Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento estão sendo indexadas para o AGRIS (International Information System for the Agricultural Sciences and Technology) da FAO para a AGROBASE (Base de Dados da Agricultura Brasileira).

Conselho Científico

Dr. Aluizio Borém - Genética e Melhoramento Vegetal
Dr. Henrique da Silva Castro - Saúde;
Dr. Ivan Rud de Moraes - Saúde - Toxicologia;
Dr. João de Deus Medeiros - Embriologia Vegetal;
Dr. Naftale Katz - Saúde;
Dr. Pedro Jurberg - Ciências;
Dr. Sérgio Costa Oliveira - Imunologia e Vacinas;
Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Genética de Microorganismos;
Dr. William Gerson Matias - Toxicologia Ambiental.

Conselho Brasileiro de Fitossanidade - Cobrafi

Dr. Luís Carlos Bhering Nasser - Fitopatologia

Fundação Dalmo Catauli Giacometti

Dr. Eugen Silvano Gander - Engenharia Genética;
Dr. José Manuel Cabral de Sousa Dias - Controle Biológico;
Dra. Marisa de Goes - Recursos Genéticos

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

Dr. José Roberto Rogero

Sociedade Brasileira de Biotecnologia - SBBiotec

Dr. Luiz Antonio Barreto de Castro - EMBRAPA
Dr. Diógenes Santiago Santos - UFRGS
Dr. José Luiz Lima Filho - UFPE
Dra. Elba P. S. Bon - UFRJ

Colaboraram nesta edição:

Alexander Machado Cardoso, Anderson Brito da Silva ,
André Vitor Chaves de Andrade, Aneli de Melo Barbosa,
Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, Ariane Maria Leoni,
Carlos de Oliveira Paiva Santos, Celso Omoto, Christiane
Philippini Ferreira Borges, Cláudio Lúcio, Fernandes
Amaral, Cosme Damião Cruz, Danielle Patrice Alexandre
Lima, Elias da Costa, Elíbio Rech, Ellen Cristine Giese,
Elza Fernandes de Araújo, Ester Ribeiro Gouveia, Fábio
André dos Santos, Gláucia Manoella de Souza Lima, Hui
I Tsai, Humberto Miguel Garay, Iracema M^a Castro Coimbra
Cordeiro, Iulla Naiff Rabelo de Souza Reis, Janete Magali
de Araújo, João de Deus Medeiros, João Marcelo Ochiucci,
Joel Majerowicz, Jorge Fernando Pereira, José Caetano
Zurita da Silva, José Ernesto Belizário, Juliano Alves, Lara
Tschopoko Pedrosa Pereira, Lexandra Novaki, Loiva Maria
Karnopp, M^a Fernanda Diniz, Manoel Teixeira Souza
Júnior, Marcelo Poletti, Maria de Lourdes Corradi da Silva,
Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, Maria do Socorro
Duarte, Marisa Vieira de Queiroz, Mariza Boscacci Marques,
Natália Florêncio Martins, Naysa B. Mandetta Clementino,
Odílio B. G. Assis, Orlando Bonifácio Martins, Osmar Alves
Lameira, Renato Molica, Ricardo Pilz Vieira, Rodrigo Barros
Rocha, Rodrigo Volcan Almeida, Sylvia M. Campbell
Alqueres, Welington Inácio de Almeida

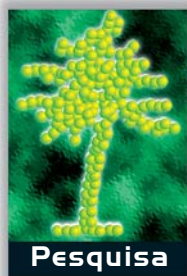
Entrevista

Novas Aplicações para a Engenharia Genética

2

Pesquisa

Predição do Potencial de Alergenicidade em OGMs - estudo de caso	10
Resistência de Inimigos Naturais a Pesticidas	16
O Mapeamento Genético no Melhoramento de Plantas	27
Filmes Comestíveis de Quitosana	33
Bactérias Produtoras de Biossurfactantes	39
Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais	46
Biovidros	51
Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais	55
Degradação Seletiva de Proteínas e suas Implicações no Câncer	60
Archaea: Potencial Biotecnológico	71
Otimização da Propagação <i>In vitro</i> de Curauá (<i>Ananas erectifolius</i> L. B. SMITH)	78
Cianobactéria Invasora	82
Marcadores Moleculares e Geminivírus	91
Glucanases Fúngicas	97
Biossegurança em Biotérios	105
A Biotecnologia e a Extinção de Espécies	109



Predição do Potencial de Alergenicidade em OGMs - estudo de caso

Gene da capa protéica de *Papaya ringspot virus* em mamoeiro transgênico

Manoel Teixeira Souza Júnior, Ph.D.
Pesquisador em Biotecnologia/Genômica da
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
msouza@cenargen.embrapa.br

Natália Florêncio Martins, Ph.D.
Pesquisadora em Bioinformática da Embrapa
Recursos Genéticos e Biotecnologia
natalia@cenargen.embrapa.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Alergia, biossegurança de OGMs e uso de Bioinformática na predição de proteínas alergênicas

Um dos pontos principais para a garantia de biossegurança de alimentos geneticamente modificados (OGMs), também conhecidos como transgênicos, é a avaliação do potencial de alergenidade das proteínas codificadas pelos genes inseridos. Modificações genéticas podem afetar a alergenidade dos OGMs de duas formas principais: pela introdução de alérgenos ou pela modificação do nível ou da natureza de alérgenos intrínsecos. Os alérgenos podem ser introduzidos pela expressão de proteínas transgênicas, uma vez que as proteínas têm sido apontadas como agentes causadores de diversas alergias (alimentar, esporos, pólen, etc.) (Kleter et al., 2002).

O potencial de alergenidade de uma proteína não é um parâmetro facilmente previsível, sendo dependente da diversidade genética e da variabilidade da resposta de IgEs¹ específicas. Dada a falta de previsibilidade da alergenidade, faz-se necessário obter evidências que minimizem as dúvidas quanto ao potencial alergênico da proteína em questão, o que é feito mediante um processo de acessar riscos compostos de diversos passos (European Commission, 2003).

¹ A principal barreira imunológica a proteínas estranhas é a secreção de moléculas IgA, no interior do intestino, a qual se complexa com as proteínas estranhas e bloqueia a sua absorção. As proteínas estranhas que conseguem chegar à circulação são recebidas por anticorpos da classe IgA e IgG, os quais são eliminados do organismo pelo sistema retículo endotelial. Pessoas normais geram anticorpos da classe IgA, IgM e IgG em minúsculas quantidades em reação a antígenos alimentares. Reações mediadas por IgE liberam histamina, prostaglandinas e leucotrienos, produzindo uma reação alérgica típica imediata, com sintomas que aparecem em minutos.

Reações não mediadas por IgE produzem os sintomas em horas ou dias. Reações não mediadas por IgE e de mecanismo desconhecido causam um aumento da reatividade a um determinado alimento sem o envolvimento do sistema imune, as quais chamamos de intolerância alimentar. (Theron G. Randolph: *An Alternative Approach to Allergies - The New Field of Clinical Unravels the Environmental Causes of Mental and Physical Ills*. Harper & Row, Publishers, New York, 1989).

Em 2001, a FAO e a OMS definiram como árvore de decisão para alergenidade (Ver anexo) uma série de condições que definem o potencial alergênico de uma nova proteína introduzida em alimentos geneticamente modificados. Esse enfoque utiliza estratégias que investigam a fonte do gene, a homologia da sequência com alérgenos conhecidos, as reações de associação com IgEs de fonte sorológica de indivíduos alérgicos e investiga algumas propriedades físico-químicas da proteína codificada pelo gene introduzido.

A análise bioinformática das sequências é fundamental para detectar e prever propriedades estruturais, reações adversas e o potencial de alergenidade dessas proteínas. A FAO e a OMS recomendam uma padronização nas metodologias utilizadas para a árvore de decisão.

A comparação das sequências de interesse com bancos de dados de alérgenos como o Structural Database of Allergenic Proteins - SDAP (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>), e outros servidores disponíveis na internet, usando algoritmos de buscas comparativas como o FASTA e BLAST, é o método internacionalmente reconhecido para tal detecção. O método atual permite encontrar medidas de similaridade e/ou identidade com proteínas conhecidas como alergênicas.

PRSV BR	SKNIDDDYQSDCSSNTHVFHCSKNEAVDAGLNEKKECEKC	40
PRSV HA5-1	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCSKNEAVDAGLNEKKEKENC	40
PRSV BR	BEKE.EKQKKEKDDASYGNDVSTSTRTGERDLVNVGTS	79
PRSV HA5-1	KEKEKEKQKEKEDCASDGNVSTSTRTGERDLVNVGTS	80
PRSV BR	GTFTVPRDKSFTDKMLERIKGKTVINLNHLIQYNPCQID	119
PRSV HA5-1	GTFTVPRDKSFTDKMLERIKGKTVINLNHLIQYNPCQID	120
PRSV BR	ISNTRATCSQFEKWYEGVRNDYGLNENEMQIVLNGLMVWC	159
PRSV HA5-1	ISNTRATHSQFEKWYEGVRNDYGLNENEMQIVLNGLMVWC	160
PRSV BR	IENGTSEDISGVWVMMDGETQVLYPIKPLIEHATPSFRQI	199
PRSV HA5-1	IENGTSEDISGVWVMMDGETQVLYPIKPLIEHATPSFRQI	200
PRSV BR	MAHFSNAAEAYITIKRNATERYMERYGIKRNLTDISLARYA	239
PRSV HA5-1	MAHFSNAAEAYIAKRNATERYMERYGIKRNLTDISLARYA	240
PRSV BR	FDFYEVNSKTPCRAREAHMCMKAAALRNTNRMEFGMGSSV	279
PRSV HA5-1	FDFYEVNSKTPCRAREAHMCMKAAALRNTSRKMEFGMGSSV	280
PRSV BR	SNKEENTERHTVEDVNRIMHSLIGMRN	306
PRSV HA5-1	SNKEENTERHTVEDVNRIMHSLIGMRN	307

Figura 1. Alinhamento de seqüências de aminoácidos das proteínas capsídicas dos isolados brasileiro (BR) e havaiano (HA5-1) de *Papaya ringspot vírus* (PRSV) utilizados como doadores de gene *cp* para a produção dos mamoeiros transgênicos do Brasil e dos EUA, respectivamente. Tarja vermelha mostra localização do epítipo EKQKEK na proteína capsídica do isolado havaiano.

Similaridades em seqüências primárias podem sugerir reações alérgicas decorrentes do aparecimento de regiões específicas de apresentação às imunoglobulinas epitópos².

Quanto à análise de homologia em seqüências de proteínas introduzidas, recomenda-se o uso de bancos de dados internacionalmente conhecidos como o SwissProt, TrEMBL, que contêm seqüências de aminoácidos da grande maioria dos alérgenos dos quais se conhecem as reações alérgicas.

A avaliação das seqüências através das ferramentas da bioinformática auxiliam na predição de reações cruzadas e de eventuais reconhecimentos pelas imunoglobulinas do tipo IgE. O *CODEX alimentarius* considera como potencialmente alergênica a proteína que possuir 35% de identidade com uma extensão (janela) de 80 aminoácidos ao longo de toda a seqüência protéica; contudo, esse parâmetro ainda está sendo discutido pela comunidade internacional (Hileman et al., 2002). Já organizações internacionais como a FAO e a OMS sugerem oito

aminoácidos contíguos como o número ideal, enquanto que o ILSI/IFBC determina seis aminoácidos contíguos. O segmento idêntico deve ser considerado com base na similaridade química dos aminoácidos, cientificamente justificada de modo que evite resultados falsos positivos (European Commission, 2003).

Recentemente, Hileman e colaboradores, que buscavam identidades em segmentos contíguos de 6, 7 e 8 aminoácidos idênticos, compararam, usando o algoritmo FASTA, seqüências de seis endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (inseticidas), três seqüências de proteínas alimentares não alergênicas e 50 proteínas de milho selecionadas aleatoriamente. Os autores concluíram que o algoritmo usado é o mais eficiente e o que melhor prediz para reações cruzadas entre proteínas alergênicas, e sugere que o segmento de oito aminoácidos estabeleça uma margem maior de segurança para a predição de alergenicidade. Além disso, os autores apontaram que o segmento de seis aminoácidos idênticos foi o que produziu um maior número de falsos positivos.

Epítipo potencialmente alergênico na capa protéica do *Papaya ringspot vírus* (PRSV)

Recentemente, Kleter e Peijnenburg publicaram um trabalho na revista BMC Structural Biology (Kleter et al., 2002). Nessa publicação os autores propõem uma metodologia

Tabela 1 Populações de mamoeiros transgênicos transferidos para a Embrapa Mandioca e Fruticultura.

População	Geração	Descrição
Embrapa PTP01	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM1a
Embrapa PTP02	R1	População originária de cruzamento controlado entre linhas Ro UM7d e Ro UM1a
Embrapa PTP03	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM1g
Embrapa PTP04	R1	População originária de cruzamento controlado entre linhas Ro UM7d e Ro UM11d
Embrapa PTP05	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM11d
Embrapa PTP06	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM15b
Embrapa PTP07	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM18e
Embrapa PTP08	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TS1j
Embrapa PTP09	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TS7f
Embrapa PTP10	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TS8b
Embrapa PTP17	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TL6b
Embrapa PTP18	R2	População obtida por autofecundação controlada de planta R1 resultante de cruzamento entre linhas Ro UM7c e UM1g
Embrapa PTP28	R1	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM6h

² **Epitopos** – O epítipo é constituído por um grupo de átomos, que formam configurações específicas tridimensionais, estereoespecíficas de tamanho limitado (em média na ordem de um tri a um hexassacarídeo, ou de um tri a um decapeptídeo), na superfície da molécula imunogênica. São as estruturas que induzem a imunogenicidade de uma molécula (regiões ditas imunopotentes) e seus determinantes específicos antigênicos (epitopos ou locais conformacionais ou seqüenciais) relacionam-se mais com zonas distintas da moléculas. Atualmente, somente algumas moléculas de plantas são conhecidas como epitópos - que têm afinidade por IgEs. Uma coleção dessas moléculas foi organizada na forma de uma base de dados disponível no endereço: <http://www.csl.gov.uk/allergen/Index.htm>.

de avaliação de casos potencialmente alergênicos e estendem as buscas comparativas a bancos de dados, incluído o *pipeline* a predição de alergenidade pelo método de Hoop & Woods (1981) e testes sorológicos para proteínas cuja identidade com alergênicos fosse de seis ou sete aminoácidos.

Naquele artigo, a metodologia proposta foi aplicada em 33 proteínas transgênicas e suas predições de alergenidade foram discutidas. O procedimento foi dividido em duas partes: primeiramente, foi extraída da literatura internacional uma busca de epitopos lineares, em particular, de proteínas alergênicas; em seguida, a lista de proteínas alergênicas foi comparada com o conjunto de proteínas transgênicas.

O segundo passo da análise foi a predição de alergenidade através do algoritmo computacional descrito em Hoops & Woods (1981). Subseqüentemente, foi verificado se a região predita como antigênica da proteína coincidia com a seqüência de proteína alergênica. Esse passo foi particularmente útil para os casos onde os dados da literatura eram escassos.

Como resultado da metodologia aplicada, 22 proteínas apresentaram resultados positivos com segmentos de seis ou sete aminoácidos. Três dessas foram identificadas como potencialmente alergênicas [PRSV CP - proteína capsídica do *Papaya ringspot vírus* (PRSV) (gi593497), acetolactato sintase GH50 e glicofosfato oxidoreductase. Os demais casos foram claramente negativos, como a Cry1Ac.

A análise da capa protéica (CP) do vírus causador da doença denominada “Mancha Anelar” ou “Mosaico”, o PRSV, em especial o isolado do papaya havaiano HA 5-1, doador do gene de resistência nas variedades transgênicas Rainbow e SunUp, cultivadas no Havaí desde 1998, apresentou o segmento **EKQKEK** idêntico a uma proteína alergênica de nematóide, sendo assim classificado como **potencialmente alergênico pelo método de predição**. Para a seqüência **EKQKEK**, não foram encontrados dados na literatura que descrevam a potencial associação a IgEs. Portanto, os autores sugeriram que o potencial alergênico da proteína transgênica presente nos mamoeiros havaianos fosse confirmado por testes clínicos e/ou sorológicos.

Anexo I

Árvore de Decisão FAO

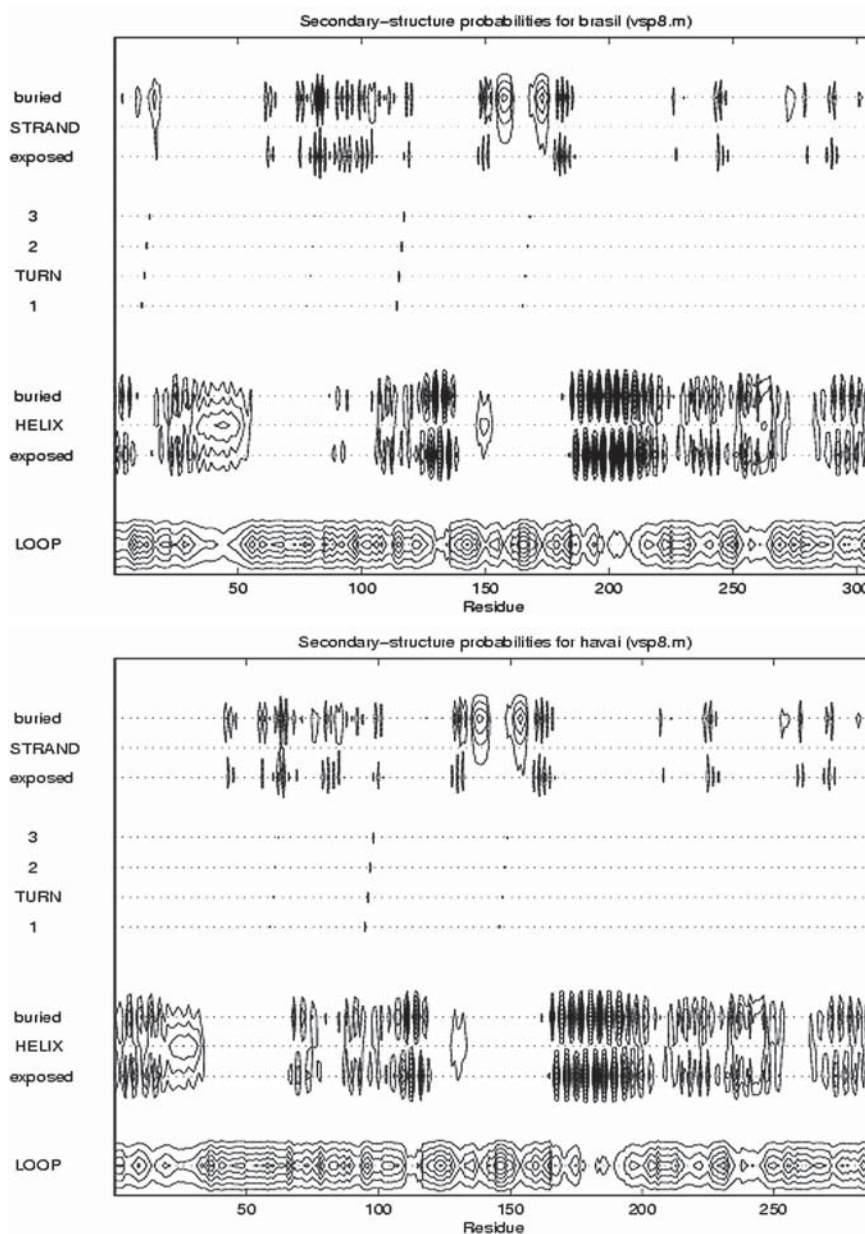
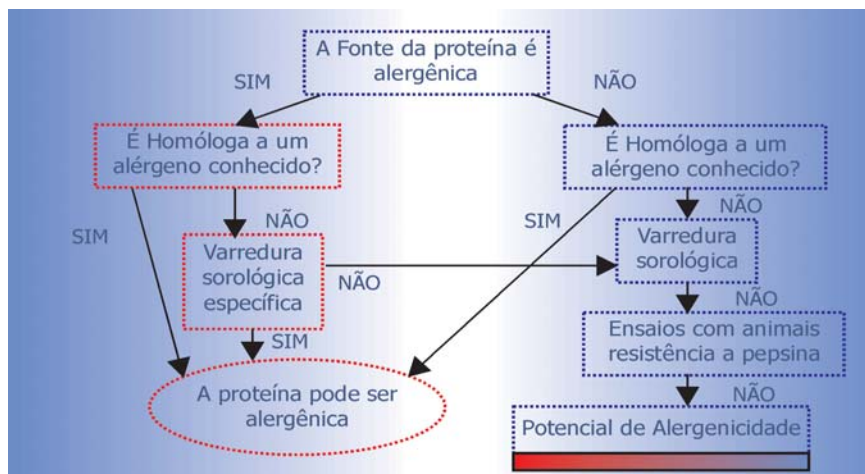


Figura 2. Estrutura secundária das proteínas capsídicas dos isolados brasileiro (BR) e havaiano (HA5-1) de *Papaya ringspot vírus* (PRSV) utilizados como doadores de gene *cp* para a produção dos mamoeiros transgênicos do Brasil e dos EUA, respectivamente.

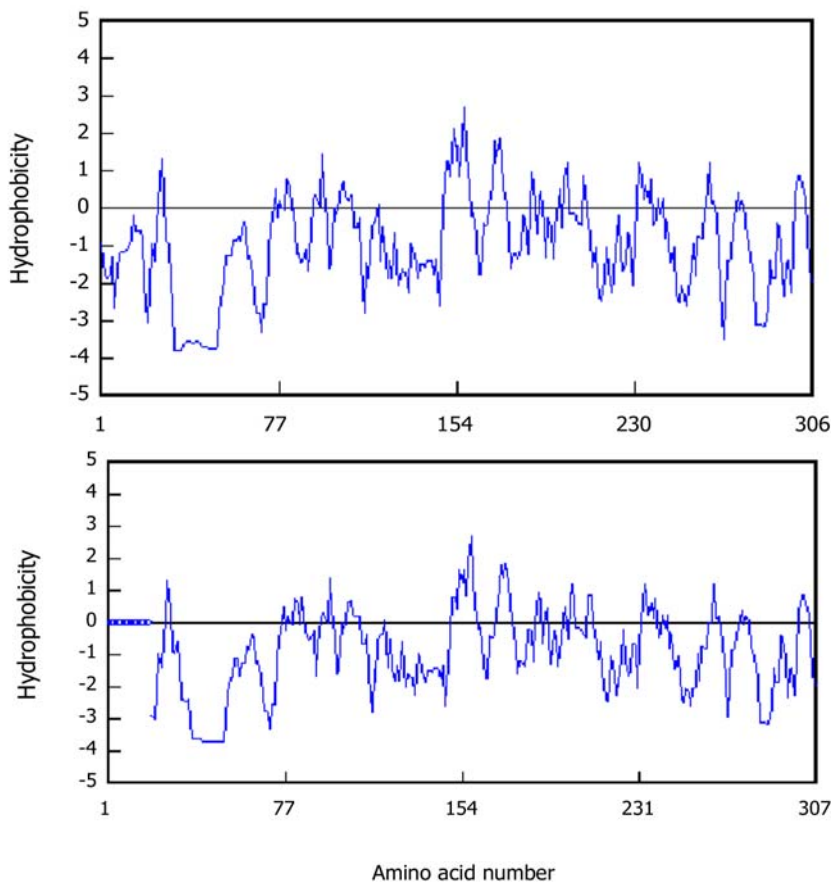


Figura 3. Hidrofobicidade das proteínas capsídicas codificadas pelos genes *cp* de *Papaya ringspot virus* presente nos mamoeiros transgênicos brasileiros e havaianos. O quadro superior mostra a hidrofobicidade da proteína do isolado PRSV BR (Souza Jr., 1999), e o quadro inferior mostra a hidrofobicidade da proteína do isolado PRSV HA 5-1 (Acesso gi593497 no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

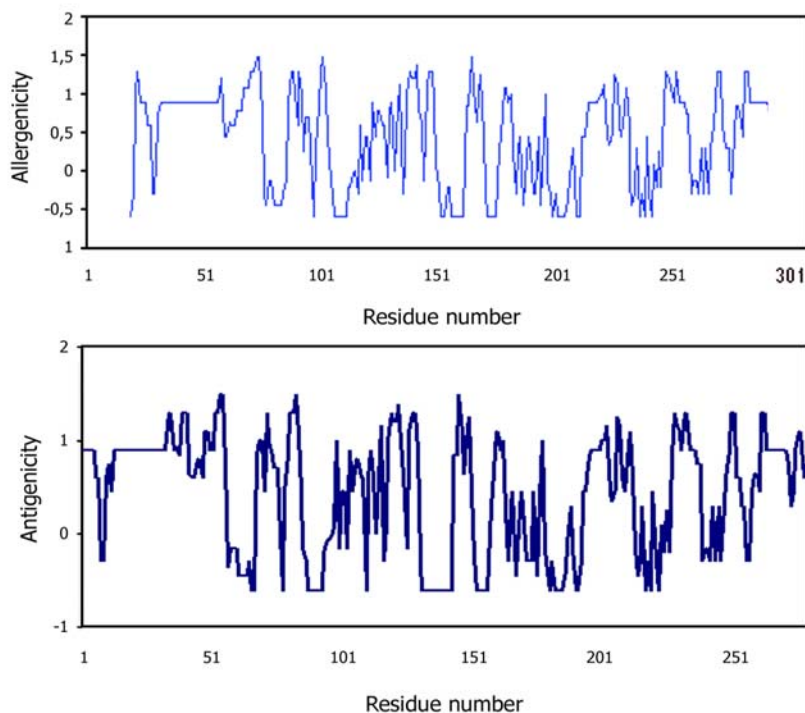


Figura 4. Gráfico de antigenicidade gerado pelo método Hopp e Woods (1981) da sequência das proteínas capsídicas codificadas pelos genes *cp* de *Papaya ringspot virus* presente nos mamoeiros transgênicos brasileiros e havaianos. O quadro superior mostra a antigenicidade da proteína do isolado PRSV BR (Souza Jr., 1999), e o quadro inferior mostra a antigenicidade da proteína do isolado PRSV HA 5-1 (Acesso gi593497 no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Avaliando a presença do epítipo EKQKEK na capa protéica dos isolados brasileiros de PRSV, e nos mamoeiros transgênicos produzidos pela Embrapa

Há pouco mais de dez anos, a Embrapa, por intermédio de suas unidades de Cruz das Almas (Embrapa Mandioca e Fruticultura) e Brasília (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), realiza um trabalho de cooperação técnica com a New York State Agriculture Experiment Station, Cornell University, na cidade de Geneva, no estado de New York, nos EUA, com vistas a desenvolver mamoeiros (*C. papaya*) transgênicos resistentes à Mancha Anelar, que é um dos principais fatores limitantes dessa cultura no Brasil.

Em abril de 2001, foram incorporadas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, no programa de melhoramento genético de mamoeiro, desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura, treze populações de mamoeiros transgênicos (Tabela 1). Os trabalhos de pesquisa da última fase de desenvolvimento de mamoeiro transgênico resistente à PRSV feitos pela Embrapa compõem um dos projetos que fazem parte [“Avaliação de segurança alimentar e ambiental de mamoeiro geneticamente modificado para resistência ao vírus da mancha anelar (PRSV)”] da rede de Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados, aprovada em 2002, no Macroprograma 1 da Embrapa.

O gene *cp* utilizado nas construções gênicas aplicadas na transformação genética de mamoeiros das variedades ‘Sunrise’ e ‘Sunset’ Solo, que visam à resistência a isolados brasileiros de PRSV, foi obtido a partir de um isolado de PRSV coletado na região de Nova Viçosa, no Estado da Bahia. As populações transferidas para a Embrapa Mandioca e Fruticultura foram originadas de plantas que continham uma das três versões do gene *cp*, e são elas: UM (untranslatable medium), TS (translatable short) e TL (translatable large) (Souza Jr., 1999). “Untranslatable” significa não-traduzido, isto é, o gene é transcrito, mas o mRNA produzido a partir dele não gera proteína devido à presença de códon terminador inserido a alguns

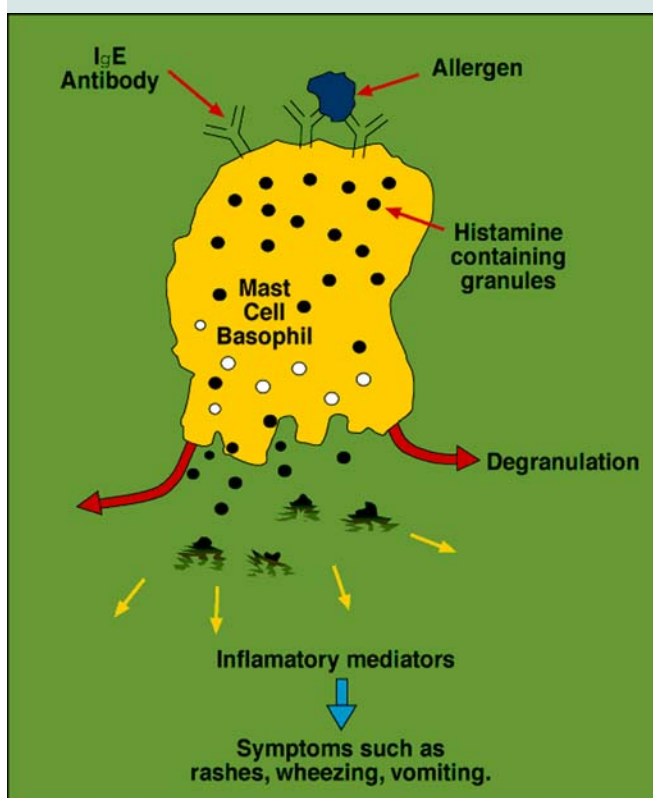
Anexo II

O que é alergia alimentar?

Nosso corpo se protege de infecções através do sistema imunológico. Nós produzimos moléculas, chamadas anticorpos, que reconhecem o agente causador da infecção. Existem diferentes tipos de anticorpos: aqueles que estão envolvidos em reações alérgicas chamam-se **IgE**. Nós sabemos que as moléculas de IgE são normalmente produzidas em resposta a infecções causadas por parasitas, como o agente causador da malária, por exemplo. Ainda não conhecemos a causa, mas algumas pessoas produzem IgE para outros agentes não parasitas, como o pólen e alguns alimentos. Nessas reações de reconhecimento são deflagrados os sintomas de alergia, como febre, tontura, dores de cabeça e outros.

As moléculas de IgE agem como etiquetas que se aderem às moléculas advindas do alimento ou do pólen, chamadas alérgenos. Quando alguém tem uma alergia alimentar e ingere o alérgeno, as IgEs atacam as moléculas « invasoras » e disparam as reações em cascata as quais caracterizam o processo alérgico. Um dos efeitos comuns das IgEs associadas às células basófilas é a liberação de grânulos de histamina, que, por sua vez, causam as reações inflamatórias que são percebidas pelos sintomas alérgicos.

Alergia ou Intolerância?



A tolerância imunológica é definida como a incapacidade específica adquirida, total ou parcial, por um indivíduo que desenvolve uma resposta imune humoral normal ou a mediação celular a um antígeno ou a diversos epitopos de um certo antígeno contra o qual ele normalmente não desenvolveria. Um indivíduo dito tolerante possui a capacidade de responder a outros antígenos administrados ao mesmo tempo que o primeiro, que pode ou não bloquear seu potencial de resposta imune. Em outras palavras, a tolerância imunológica é também específica a um antígeno.

Uma outra coleção de sintomas são relatados em pessoas que são sensibilizadas por alimentos, como dores de cabeça, dores musculares e nas juntas e fadiga. Esse conjunto é comumente conhecido como intolerância alimentar. Ainda assim, conhece-se muito pouco das reações que causam a intolerância e que podem se agravar para o diagnóstico de alergia.

Existem exceções : conhece-se bem a doença Celíaca (<http://www.concordia.psi.br/~celiaco/doenca.htm>) e a intolerância à lactose. Na doença Celíaca, as reações alérgicas são deflagradas pela ingestão de glúten (derivado de trigo, aveia e outros cereais). A intolerância à lactose não se caracteriza como alergia, mas causa alguns sintomas como a alergia ao leite com dores abdominais e diarreia. (<http://www.celiac.org>).

códons após o códon iniciador. “Translatable” significa que há a tradução completa desse gene.

A versão do gene *cp* do isolado PRSV HA 5-1 utilizado para a produção do mamoeiro transgênico havaiano (Fitch et al., 1992) é uma versão curta do gene *cp* (Ling et al., 1991) e não apresenta a sequência de nucleotídeos necessária para traduzir a sua extremidade N. Essa é a razão para a falta dos dezenove primeiros aminoácidos que estão presentes na proteína capsídica do isolado Brasil. Bahia - ou PRSV BR (Figura 1).

Sob a ótica do método de predição descrito por Kleter et al. (2002), analisamos a presença do epitopo **EKQKEK** e do potencial alergênico deste na proteína expressa pelo gene da capa protéica (*cp*) encontrado nos mamoeiros transgênicos desenvolvidos por Souza Jr. (1999) e liberados para o programa de melhoramento genético de *C. papaya* desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Quanto à presença do epitopo, observamos que o alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas do capsídeo dos isolados BR e HA 5-1 mostra que o epitopo **EKQKEK**

não está presente no isolado brasileiro (Figura 1). No lugar dele, é encontrado o epitopo **EKQKKK**. O gráfico do alinhamento mostra que as regiões variáveis da proteína são pontuais e distribuídas ao longo da sequência. Algumas mutações observadas entre os resíduos 33, 38, 44 e 54 são mais significativas para a estrutura da proteína.

A predição da estrutura secundária das proteínas do isolado do Havaí indica que os resíduos do epitopo exibem uma tendência a construir uma estrutura em forma de alça (loop). Enquanto a análise da proteína do isolado

Brasil	SKNIDDYQSDCSSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKECEKCEEK.EEKQKKKEKEDASYGN
DF P	SRSIDDYQPVCGSNHVFHCSKNEAVDAGLNEKRKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDASDGN
DF W	SRSTDDYQLVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGSNEKIKEREKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDASDGN
CE P	SRSTYDYQLVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLSEKIKEREKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDASDGN
CE W	SRSTDDYQLVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKIKEREKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDASDGN
BA-CA	SFNVDYQSVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDASYGS
BA-IT1	SRSIDDYQSAARSSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDGVSDGN
BA-IT2	SRSIDDYQSAARSSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDGVSDGN
ES	SRSIDDYQSVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDASDGN
PB	SRSTDDYQFVCRSNTHVHFHCSKNEAVDAGLSEKIKEREKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDASDGN
PE	SSNTDDYQFVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKIKEREKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDVAGDGN
SP	SRSIDDYQPDCCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDNASDGN
PR	SFNIDDYQSVCSNTHVHFHCSKNEAVDAGLNEKRKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEDASYGS

Figura 5. Alinhamento de seqüências de aminoácidos – 60 primeiros aminoácidos do terminal N - das proteínas capsídicas de 13 isolados brasileiros de *Papaya ringspot virus* (PRSV). O isolado Brasil é o doador do gene *cp* utilizado para produzir os mamoeiros transgênicos brasileiros. Denominação dos isolados: DF P (Brasília, biótipo P), DF W (Brasília, biótipo W), CE P (Guaiúba, Ceará, biótipo P), CE W (Aracoiaba, Ceará, biótipo W), BA-CA (Cruz das Almas, Bahia), BA-IT1 (Itabela, Bahia – isolado 1), BA-IT2 (Itabela, Bahia – isolado 2), ES (Linhares, Espírito Santo), PB (Alhandra, Paraíba), PE (Camaragibe, Pernambuco), SP (Piracicaba, São Paulo), PR (Paranavaí, Paraná). A tarja vermelha mostra a posição do primeiro epítipo, enquanto a tarja azul mostra a posição do segundo epítipo.

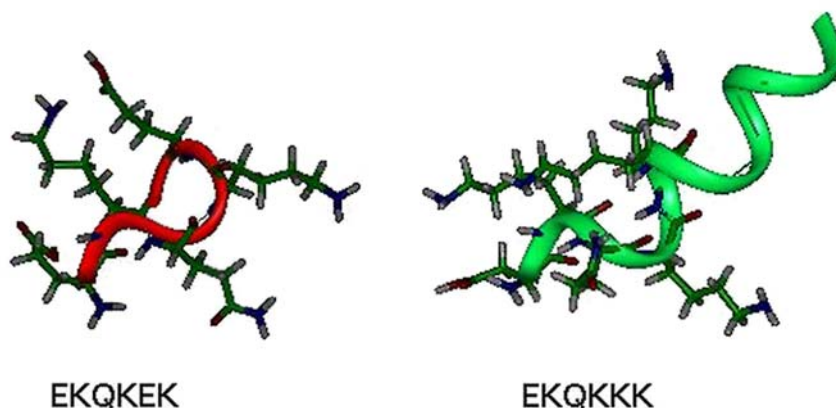


Figura 6. Estrutura tridimensional prevista pelo método de modelagem molecular por homologia dos peptídeos das proteínas capsídicas codificadas pelos genes *cp* de *Papaya ringspot virus* presente nos mamoeiros transgênicos brasileiros e havaianos.

do Brasil, doador do gene *cp* presente nas plantas transgênicas, mostra uma tendência a formar uma estrutura em forma de hélice (Figura 2).

A predição de hidrofobicidade e antigenicidade para a proteína do capsídeo do isolado brasileiro e do isolado havaiano (gi 593497) de PRSV foi realizada usando o algoritmo de Hoop & Woods (1981) e o resultado do cálculo é apresentado nas figuras de 3 a 5.

Uma análise da presença desse epítipo² **EKQKEK** na proteína do capsídeo de 13 isolados brasileiros de PRSV, cuja seqüência é conhecida e se encontra disponível na literatura (Souza Jr., 1999; Lima et al., 2002) ou na internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), revelou que esses isolados podem ser agrupados em três classes: os que não apresentam o epítipo (Brasil.Bahia, BA-CA e PR), os que apresentam uma cópia do

epítipo (PE, ES e CE-P), e os que apresentam duas cópias deste (DF-P, DF-W, CE-W, BA-IT1, BA-IT2, PB e SP) (Figura 5).

A predição da estrutura tridimensional do segmento em questão corroborou a predição da estrutura secundária, onde ocorre uma alça na seqüência **EKQKEK** e forma uma estrutura secundária estável em forma de alfa-hélice para a seqüência do mamão brasileiro (Figura 6).

Referências Bibliográficas

FTTCH, M. M., MANSHARDT, R. M., GONSALVES, D., SLIGHTOM, J. L & SANFORD, J. C. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Bio / Technology**, v.10, p.1466-1472, 1992.

SOUZA JR., M. T. Analysis of the

resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV.Brazil.Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. (Ph.D. Dissertation). Ithaca. Cornell University. 1999.

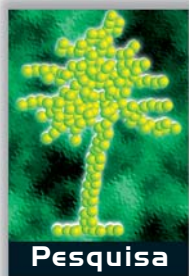
LIMA, R. C. A.; SOUZA JR., M. T., PIO-RIBEIRO, G. & LIMA, A. A. 2002. Sequences of the coat protein gene from Brazilian isolates of *Papaya ringspot virus*. **Brazilian Phytopathology**, 27(2): 174-180.

LING, K. S., NAMBA, S., GONSALVES, C., SLIGHTOM, J. L., & GONSALVES, D. 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. **Bio/Technology** 9:752-758.

HOOP T.P. and WOODS K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc.Natl.Acad.Sci USA**, 78: 3824-3828.

HILEMAN R.E., SILVANOVICH A., GOODMAN R.E., RICE E.A., HOLLESCHAK G., ASTWOOD J.D., HEFLE S.L. 2002 Bioinformatic Methods for Allergenicity Assessment Using a Comprehensive Allergen Database. **Int Arch Allergy Immunol**, 128:280-291.

GENDEL, S. M. 2002. "Sequence analysis for assessing potential allergenicity." **Ann N Y Acad Sci**, 964: 87-98.



Resistência de Inimigos Naturais a Pesticidas

Exploração de Inimigos Naturais Resistentes a Pesticidas em Programas de Manejo Integrado de Pragas

Marcelo Poletti

Doutorando em Entomologia, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ - USP).

mpoletti@esalq.usp.br

Celso Omoto

Professor Doutor, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ - USP).

celomoto@esalq.usp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Introdução

A utilização de pesticidas como estratégia de controle de pragas na agricultura moderna tem se contraposto à teoria preconizada pelo Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Kogan, 1998) devido à maneira e intensidade sob as quais tem sido empregada. O freqüente uso de produtos de largo espectro de ação, além de afetar o desenvolvimento da dinâmica populacional de inimigos naturais em campo, interferindo sobre o equilíbrio dos mais variados organismos, no agroecossistema, também está associado a outros problemas entre os quais a evolução da resistência de insetos e ácaros a pesticidas.

A resistência, por definição, é o desenvolvimento de uma habilidade em uma determinada linhagem de um organismo em tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria da população suscetível da mesma espécie. Trata-se de uma característica hereditária sendo um termo que se aplica intraespecificamente. O processo determinante no desenvolvimento da resistência é a pressão de seleção, dada pelo uso freqüente de um mesmo pesticida ou de pesticidas pertencentes a um mesmo grupo químico. De acordo com Roush & McKenzie (1987), no início da evolução da resistência, estima-se que a freqüência dos alelos que conferem essa característica a uma população é bastante baixa (10^{-2} a 10^{-13}). No entanto, devido ao uso contínuo de um mesmo pesticida, a freqüência de resistência poderá aumentar em níveis em que a eficácia do produto é afetada devido a esse fato (freqüência crítica de resistência).

Até o final da década de 80, o número de casos de resistência documentados era de 504 espécies de insetos e ácaros, sendo considerado muito baixa a porcentagem de detecções associadas aos inimigos naturais (Georghiou & Lagunes-Tejeda, 1991) (Figura 1). Dados mais recentes mostraram que os casos de resistência têm aumentado para 540 (Whalon et al., 2003). As hipóteses da pré-adaptação diferencial e da limitação do alimento têm sido apresentadas com o intuito de justificar essa baixa taxa de detecção da resistência para os agentes do controle biológico (Croft & Morse, 1979).

A hipótese da pré-adaptação diferencial baseia-se no fato de que as pragas estão melhor pré-adaptadas a sobreviver à aplicação de produtos químicos do que seus inimigos naturais, sendo que este fato está associado à capacidade intrínseca das mesmas em lidar com estresses bioquímicos associados a suas fontes de alimento. Uma possível explicação é que essa habilidade tenha sido desenvolvida durante o processo de co-evolução planta-hospedeira inseto-praga, podendo ocorrer diferenças nos processos de destoxificações hidrolítica e oxidativa entre o grupo das pragas e dos inimigos naturais (Plapp & Bull, 1978).

Quanto à hipótese da limitação do alimento, sustenta-se no fato de que os inimigos naturais que sobreviveram à aplicação de um determinado produto poderiam sofrer falta de alimento devido à baixa disponibilidade da presa. Dessa forma, os indivíduos sobreviventes não se reproduziriam com eficiência, ou, então, poderiam emigrar para áreas não tratadas ocorrendo conseqüentemente diluição da resistência

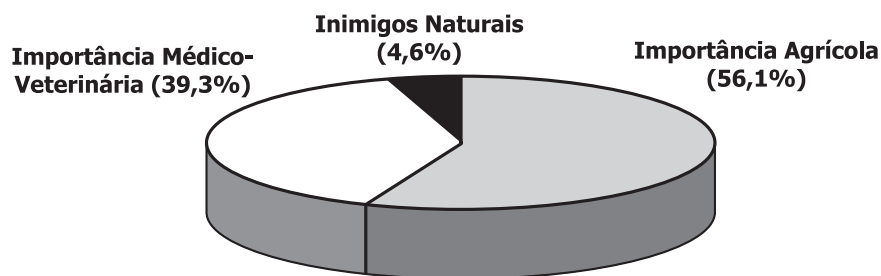


Figura 1. Porcentagem relativa dos casos detectados de resistência de artrópodes a pesticidas de acordo com a importância econômica (Georghiou & Lagunes-Tejeda, 1991).

devido à introgressão com populações suscetíveis. Nesse caso, o princípio dessa hipótese é que a evolução da resistência nas espécies fitófagas deve preceder a evolução nos inimigos naturais (Baker & Arbogast, 1995).

A resistência entre os artrópodes fitófagos e seus inimigos naturais apresenta efeitos contrastantes, sendo que para os fitófagos a resistência intensifica sua condição de praga reduzindo as possibilidades de manejo. Por outro lado, a evolução da resistência em populações de inimigos naturais pode contribuir de maneira significativa com o MIP pela conservação desses organismos mesmo após aplicações de produtos considerados nocivos a eles (Croft, 1990). Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo relacionar alguns casos de detecção da resistência a pesticidas em artrópodes inimigos naturais, e sua utilização no MIP, bem como enfatizar a possibilidade do emprego da biotecnologia para a obtenção de linhagens resistentes.

Resistência de Ácaros Fitoseídeos a Pesticidas

Os ácaros fitoseídeos (Acari: Phytoseiidae) têm constituído o grupo de inimigos naturais mais explorado em estudos dirigidos à resistência. Esses predadores apresentam parâmetros intrínsecos que favorecem a evolução dessa característica, destacando-se o alto potencial reprodutivo e o rápido ciclo de vida, além do fato de algumas espécies reproduzirem-se por parahaploidia ou pseudo-arrenotoquia. Neste tipo de reprodução, machos e fêmeas são originados de ovos diplóides (2n) fecundados. No entanto, durante o processo embrionário, ocorre a perda de um conjunto de cromossomos de origem paterna nos ovos que darão origem aos machos haplóides (n) (Hoy,

1985a). Análises genéticas realizadas com *Galendromus* (= *Metaseiulus*) *occidentalis*, espécie que se reproduz por parahaploidia, demonstraram que os machos herdaram de suas mães a resistência a inseticidas carbamatos (Roush & Hoy, 1981a; Roush & Plapp, 1982). Um outro fator que se relaciona com o aumento na frequência de ácaros fitoseídeos resistentes a pesticidas é a ocorrência de espécies generalistas quanto ao hábito alimentar. Neste caso, essas espécies são capazes de sobreviver e reproduzir-se com eficiência, alimentando-se de pólen e exudatos de plantas, além de fungos e pequenos insetos (McMurtry, 1997). Esse fato neutraliza a possibilidade da limitação do alimento após a aplicação de um pesticida, ocorrendo dessa forma a preservação da população resistente em campo.

O primeiro relato de sobrevivência em populações de ácaros fitoseídeos após pulverizações com inseticidas de largo espectro de ação em campo foi efetuado no início dos anos 50 para *G. occidentalis* (Huffaker & Kennett, 1953). No entanto, esse fato foi associado à resistência somente no final da década de 60, quando trabalhos realizados em laboratório confirmaram a ocorrência da variabilidade intraespecífica na suscetibilidade de populações de *G. occidentalis* e *Neoseiulus* (= *Amblyseius*) *fallacis* a inseticidas organofosforados (Motoyama et al., 1970; Croft & Jeppson, 1970). Posteriormente, resistência a paration foi detectada em populações de *Amblyseius hibisci* coletadas em pomares de citros na Califórnia/EUA (Kennett, 1970). A partir disso, inúmeros trabalhos de detecção e seleção para a resistência a pesticidas em populações de ácaros fitoseídeos foram efetuados em todo mundo (Quadro 1). Quanto aos pesticidas, ênfase tem sido dada aos inseticidas carbamatos, orga-

nofosforados e piretróides, pelo fato de apresentarem elevada toxicidade para a maioria das espécies de ácaros predadores em campo.

Durante a década de 70 foram realizadas várias detecções de resistência aos inseticidas organofosforados: azinfosmetil, diazinon, fosmet, paration, TEPP e fosalone em diferentes populações de *G. occidentalis* coletadas nas regiões produtoras de frutas nos Estados Unidos (Croft, 1990). Em laboratório, após processo de pressão de seleção com carbaril (carbamato), Roush & Hoy (1980) obtiveram linhagens de *G. occidentalis* resistentes a esse produto. Posteriormente, realizando estudos em condições de laboratório, casa de vegetação e campo esses autores verificaram que essa linhagem apresentou um aumento na razão sexual (maior número de fêmeas) quando comparado com a linhagem suscetível de referência. No entanto, esse fato não afetou o desempenho da mesma no controle biológico de ácaros fitófagos nas condições avaliadas (Roush & Hoy, 1981b).

O monitoramento da resistência de *G. occidentalis* a metomil e dimetoato também foi efetuado pelos mesmos autores (Roush & Hoy, 1981b). Neste caso foram avaliadas as respostas de várias populações coletadas em pomares de maçã, pêra, amora e uva, sendo que todas apresentaram baixa razão de resistência a esses dois produtos. De acordo com Roush & Plapp (1982) a linhagem de *G. occidentalis* resistente a carbaril também apresentou elevada resistência a propoxur. Hoy & Knop (1981) também selecionaram para resistência a permetrina populações de *G. occidentalis* coletadas em pomares de maçã situados em Washington/EUA.

Resistência múltipla a organofosforados, carbamatos, piretróides, enxofre e ao acaricida abamectin foi detectada em diversas populações dessa espécie em campo. Esse fato tem sido intensivamente explorado dentro do manejo integrado em várias culturas nos Estados Unidos (Croft, 1990). Em outros países, tal como a Rússia, linhagens resistentes de *G. occidentalis* a inseticidas como os organofosforados e piretróides também têm sido exploradas em estudos visando o manejo de ácaros-praga (Petrushov, 1991).

Assim como *G. occidentalis*, o ácaro *N. fallacis* é um dos fitoseídeos mais explorados em estudos de resistência a pesticidas, sendo uma espécie muito empregada para o controle biológico de ácaros tetraniquídeos, especialmente *T. urticae* (Croft, 1990). Resistência múltipla ou cruzada a várias classes de produtos como DDT e alguns de seus derivados, carbamatos, organofosforados e piretróides, também foi detectada em muitas populações desse ácaro (Croft, 1983). Devido à ocorrência generalizada de populações resistentes dessa espécie a vários pesticidas em campo, alguns pesquisadores têm encontrado alguma dificuldade no estabelecimento de populações suscetíveis de referência para estudos de laboratório (Croft et al., 1976a).

Quanto à resistência aos inseticidas piretróides, Fitzgerald & Solomon (1992) realizando bioensaios para determinar a resposta de populações de *N. fallacis* a deltametrina, relataram a ocorrência de uma linhagem, cuja razão de resistência obtida foi de aproximadamente quatro vezes. De acordo com Thistlewood et al. (1992), esse fato pode ser atribuído à intensa pressão de

seleção com inseticidas piretróides nas áreas onde foi realizada a coleta dessa população. Ainda, para essa mesma espécie, Thistlewood et al. (1995) verificaram que após 55 pressões de seleção com permetrina sobre uma determinada população, pôde-se evidenciar um aumento de 964 vezes na resistência da mesma a esse produto em condições de laboratório.

Uma outra espécie de ácaro fitoseídeo que se destaca no número de trabalhos relacionados à resistência é *Phytoseiulus persimilis*, sendo comumente utilizado para o controle de *T. urticae* em cultivos protegidos de ornamentais em países da Europa. A resistência de *P. persimilis* a inseticidas organofosforados foi relatada por Schulten et al. (1976). Esses autores observaram que populações liberadas em cultivos protegidos na Holanda apresentaram elevada resistência a paration. Quanto à resistência múltipla, tem sido detectada com frequência em populações coletadas em campo em alguns países da Europa (Croft, 1990). A introdução de uma linhagem de *P. persimilis* resistente a organofosforados foi realizada no Egito para o controle de *T. urticae* na

cultura do pepino, evidenciando-se uma elevada efetividade desse predador quando foram realizadas liberações de dez indivíduos por planta (Rasmy & Ellaithy, 1988).

Casos de resistência a pesticidas também têm sido relacionado com frequência à *Typhlodromus pyri*, sendo essa espécie considerada de grande importância para o controle de *Panonychus ulmi* e *T. urticae* em macieira na Europa (Vidal & Kreiter, 1995). A primeira detecção de populações resistentes a organofosforados foi realizada na Nova Zelândia, verificando-se que inicialmente a intensidade de resistência detectada foi baixa (Hoyt, 1972). No entanto, observou-se que após sucessivas pressões de seleção com azinfosmetil, em um mesmo pomar, houve um incremento progressivo na frequência de resistência *in loco*. Desde então, essas populações resistentes a pesticidas têm sido frequentemente empregadas em programas de manejo de *P. ulmi* em pomares de maçã na Nova Zelândia (Collyer, 1980). No Canadá, estudos dirigidos a linhagens de *T. pyri*, que apresentavam resistência múltipla a organofosforados e piretróides, mos-

Quadro 1 - Alguns exemplos de casos de ácaros fitoseídeos (Acari: Phytoseiidae) resistentes a pesticidas no mundo.

Espécie	Pesticida			Local	Referência
	I. A. ¹	Classe ²	Grupo Químico ³		
<i>Amblyseius finlandicus</i>	azinfosmetil	I	O	Finlândia	Kostainen & Hoy (1994)
<i>A. hibisci</i>	paration	I	O	EUA	Kennett (1970)
<i>A. longispinosus</i>	carbaril	I	C	Taiwan	Lo et al. (1984)
<i>A. pseudolongispinosus</i>	fervalerate	I	P	China	Zhu et al. (1996)
<i>A. nicholsi</i>	deltametrina	I	P	China	Ding et al. (1983)
<i>A. potentiallae</i> (= <i>andersoni</i>)	pentoato	I	O	Itália	Caccia et al. (1985)
<i>A. (=Neoseiulus)</i> <i>womersleyi</i>	permetrina	I	P	Japão	Mochizuki (1994)
<i>Euseius concordis</i>	deltametrina	I	P	Brasil	Poletti (2002)
<i>E. tularensis</i>	carbaril	I	C	EUA	Grafton-Cardwell & Ouyang (1993)
<i>Galendromus</i> (= <i>Metaseiulus</i>) <i>occidentalis</i>	carbaril	I	C	EUA	Roush & Hoy (1981 a,b)
<i>Ipbiseiodes zuluagai</i>	deltametrina	I	P	Brasil	Poletti (2002)
<i>Kampimodromus aberrans</i>	mancozebe	F	A	França	Auger et al. (2001)
<i>Neoseiulus californicus</i> (= <i>Amblyseius chilensis</i>)	fosmet	I	O	Uruguai	Croft et al. (1976)
<i>Neoseiulus fallacis</i>	permetrina	I	P	EUA	Navajas et al (2001)
<i>Phytoseiulus persimilis</i>	deltametrina	I	P	França	Fournier et al. (1987)
<i>T. arvoreus</i>	azinfosmetil	I	O	EUA	Croft & AliNiazee (1983)
<i>T. pyri</i>	cipermetrina	I	P	Canadá	Marshall et al. (2001)

¹ I. A. = ingrediente ativo, ² A = acaricida, F = fungicida, I = inseticida; ³ C= carbamatos, P= piretróides, O= organofosforados, A= alquilfenóis (ditiocarbamato).



Figura 2 - *Neoseiulus californicus*
foto: Heraldo Negri



Figura 3 - *Euseius concordis*
foto: Heraldo Negri



Figura 4 - *Iphiseiodes zuluagai*
foto: Heraldo Negri

traram uma possibilidade viável no emprego do manejo integrado de *P. ulmi* em maçã (Hardman et al., 2000).

Kostiainen & Hoy (1994a) detectaram variabilidade intraespecífica a inseticidas organofosforados em *Amblyseius finlandicus* (Oudemans), importante predador de *P. ulmi* e ácaros eriofídeos em maçã na Finlândia. Os autores evidenciaram que os valores estimados para CL₅₀ (concentração que mata 50% dos indivíduos em uma determinada população) na maioria das populações coletadas em pomares comerciais apresentaram-se cinco vezes superior ao valor obtido para linhagem suscetível de referência. Também verificaram que a resistência detectada em algumas populações avaliadas permaneceu estável mesmo na ausência de pressão de seleção (Kostiainen & Hoy, 1994b).

No Japão, Mochizuki (1994) avaliando a ocorrência da variabilidade intraespecífica a cipermetrina, permetrina, fenvalerate e fluralinate

em populações de *Amblyseius womersleyi* (importante predador de *Tetranychus kanzawai* na cultura do chá nesse país) coletadas em diferentes áreas, concluiu que a resistência observada em uma dessas populações relacionou-se diretamente com o número de aplicações desses produtos realizadas em campo. Sato et al. (2000) realizando quatro pressões de seleção em laboratório com metidation obtiveram um aumento de aproximadamente 21 vezes na razão de resistência de uma população de *A. womersleyi* a esse produto.

No Brasil, Sato et al. (2002) realizaram coleta de uma população de *Neoseiulus californicus* (Figura 2) em cultivo de morango na região de Atibaia/SP e observaram que ela apresentou elevada tolerância a diversos pesticidas como o acaricida propargite e o inseticida dimetoato. Neste caso, os autores sugerem que tal fato pode estar associado às pressões de seleção exercidas pelas aplicações desses produtos em campo, o que pode ter contribuído para a evolução da resistência na população avaliada. Poletti et al. (2003) avaliaram a suscetibilidade à deltametrina nessa mesma população de *N. californicus*, coletada em morango (Atibaia/SP) e mantida na Estação Experimental do Instituto Biológico (Campinas/SP) desde 1999, e em uma população dessa mesma espécie, oriunda de um pomar comercial de maçã em Fraiburgo/SC. Evidenciou-se que a população proveniente de Atibaia/SP (morango) foi aproximadamente 24 vezes mais tolerante à deltametrina do que a população coletada em maçã. De acordo com Monteiro (2001), o inseticida deltametrina foi extremamente tóxico para uma população de *N. californicus* coletada em pomar de maçã situado em Vacaria/RS. Dessa forma, pode-se sugerir que a exploração de linhagens resistentes de *N. californicus* a deltametrina ou outros inseticidas nocivos pode ser uma ferramenta importante dentro do manejo integrado em maçã na região sul do Brasil.

Em citros, Poletti (2002) detectou resistência a deltametrina em populações de *Euseius concordis* (Figura 3) e *Iphiseioides zuluagai* (Figura 4) coletadas em diferentes pomares situados no Estado de São Paulo, fato que

também esteve associado ao histórico de pulverizações com deltametrina em cada local onde foram efetuadas as coletas. De acordo com Moraes & Sá (1995) os ácaros fitoseídeos são os principais inimigos naturais do ácaro da leprose dos citros, *Brevipalpus phoenicis*, praga-chave nesta cultura. Sendo assim a preservação desses predadores por ocasião da realização de pulverizações com produtos nocivos é extremamente conveniente. Também foi possível detectar variabilidade interespecífica na suscetibilidade a deltametrina entre essas duas espécies, verificando-se que *E. concordis* apresentou-se 50 vezes mais tolerante a esse produto do que *I. zuluagai* (Poletti, 2002). Variabilidade interespecífica na suscetibilidade de ácaros fitoseídeos a inseticidas piretróides também foi relatada por Marwick (1986), o qual verificou que *P. persimilis* apresentou-se menos tolerante a cipermetrina, deltametrina e fenvalerate do que *T. pyri*. Com relação à deltametrina, a razão de tolerância observada para essas duas espécies atingiu valores de aproximadamente 314 vezes.

Liberação e Estabelecimento de Linhagens de Fitoseídeos Resistentes a Inseticidas

Em 1972, uma linhagem de *G. occidentalis* resistente a organofosforados foi enviada da América do Norte para a Austrália. Segundo Readshaw (1975) citado por Gerson et al. (2003) este foi o primeiro relato de transferência intercontinental de inimigos naturais resistentes no mundo. Linhagem de *G. occidentalis* resistente a organofosforados, também foi introduzida na antiga União Soviética (URSS) no início dos anos 80 para o controle biológico de *Tetranychus pruni* obtendo-se um grande sucesso no estabelecimento da mesma (Petrushov, 1987). Hoy et al. (1983) também obtiveram sucesso na liberação e estabelecimento de linhagens resistentes de *G. occidentalis* a organofosforados e piretróides em pomares de maçã e pêra nos Estados Unidos, sugerindo uma relação entre a densidade populacional da praga em campo e o estabelecimento das populações de fitoseídeos liberadas.

Strickler & Croft (1981, 1982) estudando a variabilidade intraespecífica de doze populações de *N. fallacis* observaram que duas dessas apresentaram resistência a elevadas concentrações de permetrina, e que após 12 pressões de seleção com esse produto em casa de vegetação, a razão de resistência atingiu valores de 64 vezes. Quando essas populações resistentes à permetrina foram liberadas em pomares comerciais de maçã, pôde-se evidenciar o sucesso no estabelecimento delas. Whalon et al. (1982) após selecionarem duas populações de *N. fallacis* para resistência a inseticidas piretróides em condições de casa de vegetação, verificaram que essas sobreviveram a aplicações de permetrina quando liberadas em um pomar comercial de maçã, porém só uma delas resistiu à aplicação de fenvalerate.

Falhas no estabelecimento de uma população de *N. fallacis* resistente à permetrina em campo foi relatado por Croft & Whalon (1983). Segundo esses autores, tal fato pode ter ocorrido devido a um grande fluxo de indivíduos suscetíveis para dentro das áreas onde foram realizadas essas liberações. Assim, devido a esse fato, poderia ter ocorrido hibridação, o que fatalmente ocasionou redução na frequência de resistência. Por outro lado, esses autores observaram que em laboratório a resistência permaneceu estável até a 25ª geração nessa população, mesmo na ausência de pressão de seleção.

Com relação a *T. pyri* linhagens resistentes a organofosforados foram introduzidas com sucesso na Inglaterra no final da década de 70 (Kapetanakis & Cranham, 1983). Em experimentos realizados em pomares comerciais de maçã com diferentes regimes de pulverizações no Canadá, Hardman et al. (1997, 2000) também puderam evidenciar sucesso na liberação de uma linhagem de *T. pyri* resistente a piretróides e organofosforados introduzida da Nova Zelândia. Dessa forma, os autores concluíram que esses organismos apresentaram potencial para serem utilizados em programas de manejo de ácaros nessa cultura. Em muitos países da Europa, o manejo do ácaro vermelho europeu, *Panonychus ulmi*, e do eriofídeo *Aculus schelechtendali* em pomares de maçã e uva, têm-se base-

ado em liberações constantes de linhagens resistentes a inseticidas organofosforados e carbamatos, sendo essa uma condição primordial para o controle desses ácaros-praga (Blommers, 1994). Na Holanda, por exemplo, brotos de plantas de maçã contendo *T. pyri* são transportados de um pomar a outro por ocasião da poda realizada no verão (Blommers, 1994). De forma sintética, a introdução de linhagens de ácaros predadores fitoseídeos resistentes a pesticidas, têm sido muitas vezes efetiva, sendo essa tática uma forma análoga ao controle biológico clássico, utilizando-se, porém, um biótipo diferenciado de inimigo natural (Dunley et al., 1991).

Em termos práticos, Hoy (1985b) propôs um programa de manejo de ácaros na cultura da amêndoa (Califórnia/EUA) baseando-se na liberação de linhagens de *G. occidentalis* resistentes a inseticidas, associados à utilização de acaricidas seletivos. Uma economia de aproximadamente 60-110 dólares/ha/ano foi estimada para cada produtor de amêndoa, que aderiu ao programa de liberações de linhagens resistentes, observando-se que a maior economia foi devido à redução nos gastos com acaricidas (Headley & Hoy, 1987). A estimativa mais recente feita por Hoy (2000) associou os resultados deste projeto a um benefício, desde o início do programa, de aproximadamente 20 milhões de dólares.

Avaliação do Estabelecimento de Linhagens Resistentes de Fitoseídeos Introduzidas em Campo

O monitoramento da frequência de resistência é considerado uma importante ferramenta para avaliar o estabelecimento de linhagens de fitoseídeos selecionadas em laboratório e introduzidas em condições em campo. Para isso, a técnica mais empregada tem-se baseado na realização de bioensaios toxicológicos para as estimativas da CL_{50} e intensidade de resistência (CL_{50} da população em estudo / CL_{50} da linhagem suscetível de referência). No entanto, para a realização destes bioensaios algumas etapas como a coleta de um grande

número de indivíduos em campo, para preservar a variabilidade genética dentro da população em estudo, e a necessidade do estabelecimento da mesma em laboratório (através de criações) pode afetar o dinamismo deste trabalho. Um fator que é importante e deve estar associado ao monitoramento após a liberação de inimigos naturais em campo é a possibilidade de ocorrer diluição da resistência na linhagem selecionada devido ao fluxo gênico com populações nativas, suscetíveis, presentes em campo por ocasião da liberação.

A utilização de análise de eletroforese de isoenzimas, apesar de ser um método menos acurado do que outros testes moleculares, em alguns estudos têm mostrado certa viabilidade para avaliação da liberação de linhagens resistentes de fitoseídeos em campo. Whalon et al. (1982) foram os primeiros pesquisadores a testarem essa ferramenta como método de monitoramento de liberações de linhagens de *N. fallacis* resistentes a pesticidas em campo. A utilização dessa técnica permite que sejam examinadas amostras coletadas diretamente em campo, eliminando os problemas relacionados à manutenção de criações em laboratório. Outra vantagem relacionada à eletroforese de isoenzimas tem sido a possibilidade de explorar a análise da estrutura genética das populações presentes em campo antes da liberação da linhagem resistente e, após esse processo, podendo-se inferir a respeito de parâmetros importantes com relação à estabilidade da resistência em campo.

Recentemente, Navajas et al. (2001) realizaram trabalho de monitoramento do estabelecimento de linhagens de *N. fallacis* resistentes a piretróides em pomares de maçã no Canadá, empregando bioensaios toxicológicos e eletroforese de isoenzimas. Através dos resultados obtidos nesse estudo foi comprovado que esta técnica molecular é bastante adequada. Ressalta-se que tentativas da utilização de outras técnicas moleculares para o monitoramento em fitoseídeos, tal como marcadores de RAPD e análise de sequências de microsátélites, não têm alcançado êxito (Perrot-Minnot & Navajas, 1995; Navajas et al., 1998).

Resistência de Insetos Parasitóides e Predadores a Pesticidas

Apesar do número de casos de resistência a pesticidas em insetos parasitóides e predadores não ser tão expressivo quanto para os ácaros fitoseídeos, alguns trabalhos têm mostrado que há possibilidade de populações desses organismos responderem à pressão de seleção com alguns produtos tanto em laboratório como em campo (Quadros 2 e 3).

Strawn (1978) citado por Hoy (1990) realizou estudos com intuito de avaliar a variabilidade na suscetibilidade a inseticidas organofosforados

em diferentes populações do parasitóide *Aphytis melinus*, inimigo natural da cochonilha vermelha, *Aonidiella aurantii*, importante praga em pomares de citros nos Estados Unidos. Apesar das populações avaliadas terem se apresentado distintas com relação às respostas aos inseticidas testados, nenhuma delas mostrou-se resistente às concentrações utilizadas em campo. Rosenhein & Hoy (1986) realizaram monitoramento da resistência a carbaril, clorpirifós, dimetoato, malation e metidation, em 13 populações de *A. melinus* coletadas em pomares de citros na Califórnia. Os resultados obtidos indicaram a ocorrência de diferentes níveis de resistência

entre as populações avaliadas, sendo que os dados corroboraram com o regime de pulverizações (pressão de seleção) adotado em cada propriedade onde efetuaram as coletas. Posteriormente foi realizada a seleção de uma linhagem de *A. melinus* resistente a carbaril (Rosenheinberg & Hoy, 1988). Neste caso foi proposta a liberação desta linhagem inserindo essa tática dentro de um programa integrado, o qual foi amplamente adotado por vários citricultores na Califórnia (Hoy, 1990).

No início da década de 80, Grafton-Cardwell & Hoy (1985) realizaram monitoramento da suscetibilidade de diferentes populações de *Chrysoperla*

Quadro 2 - Alguns exemplos de casos de insetos inimigos naturais (parasitóides) resistentes a pesticidas no mundo.

Espécie	Pesticida			Local	Referência
	I. A. ¹	Classe ²	Grupo Químico ³		
<i>Anisopteromalus calandrae</i>	malation	I	O	EUA	Baker & Throne (1995)
<i>Aphytis africanus</i>	metidation	I	O	África do Sul	Schoones & Gilione (1982)
<i>A. cobeni</i>	azinfosmetil	I	O	Israel	Havron & Rosen (1988)
<i>A. boloxanthus</i>	azinfosmetil	I	O	Israel	Havron et al. (1991a)
<i>A. lingnanensis</i>	azinfosmetil	I	C	Israel	Havron et al. (1991b)
<i>A. melinus</i>	carbaril	I	C	EUA	Spollen & Hoy (1993)
<i>Bracon mellitor</i>	carbaril	I	C	EUA	Adams & Cross (1967)
<i>Comperiella bifasciata</i>	metidation	I	O	África do Sul	Schoones & Gilione (1982)
<i>Diglyphus begini</i>	fenvalerate	I	P	Hawái	Spollen et al. (1995)
<i>Encarsia formosa</i>	permetrina	I	P	Reino Unido	Walker & Thuding (1984)
<i>Habrobracon hebetor</i>	malation	I	O	EUA	Perez-Mendonza et al. (2000)
<i>Macrocentrus ancylivorus</i>	DDT	I	OC	Canadá	Robertson (1957)
<i>Pholetesor ornigis</i>	metomil	I	O	Canadá	Trimble et al. (1990)
<i>Trioxys pallidus</i>	azinfosmetil	I	O	EUA	Hoy & Cave (1988)

¹ I. A. = ingrediente ativo, ²I = inseticida; ³C= carbamatos, P= piretróides, O= organofosforados, C= organoclorado

Quadro 3 - Alguns exemplos de casos de insetos inimigos naturais (predadores) resistentes a pesticidas no mundo.

Espécie	Pesticida			Local	Referência
	I. A. ¹	Classe ²	Grupo Químico ³		
<i>Aphidoletes aphidimyza</i>	azinfosmetil	I	O	EUA	Wamer & Croft (1982)
<i>Geocoris pallens</i>	triclorfon	I	O	EUA	Johansen & Eves (1973)
<i>Chrysoperla carnea</i>	fosmet	I	O	Canadá	Pree et al. (1989)
<i>Coleomegilla maculata</i>	parationmetil	I	O	EUA	Chambers (1973)
<i>Stethorus punctum</i>	azinfosmetil	I	O	EUA	Hull & Staner (1983)
<i>Labidura riparia</i>	DDT	I	OC	Austrália	Bishop & Blood (1980)
<i>Nabis sp.</i>	triclorfon	I	O	EUA	Johansen & Eves (1973)
<i>Xylocoris flavipes</i>	malation	I	O	EUA	Baker & Arbocast (1995)

¹ I. A. = ingrediente ativo, ²I = inseticida; ³O= organofosforados, OC= organoclorado

carnea, crisopídeo, coletadas em diferentes áreas produtoras de alfafa situadas na Califórnia, a seis inseticidas comumente utilizados nesta cultura (carbaril, metomil, permetrina, fenvalerate, diazinon e fosmet). As populações avaliadas responderam de modo distinto a todos produtos testados, sendo que esta variabilidade foi considerada suficientemente promissora para seleção artificial de populações de *C. carnea* para resistência a alguns produtos, fato que incentivou a continuidade deste projeto. No entanto, liberações efetivas de linhagens resistentes de *C. carnea* em campo não têm sido relatadas, apesar da realização de seleção de linhagens resistentes a alguns produtos como carbaril (Grafton-Cardwell & Hoy, 1986).

Desvantagem Adaptativa Associada à Resistência

A desvantagem ou custo adaptativo é uma característica que pode estar associada à resistência em populações de artrópodes pragas ou inimigos naturais (ácaros ou insetos). Devido à possibilidade do menor valor adaptativo dos indivíduos resistentes estar associado a uma menor viabilidade total, menor fecundidade, menor tempo para desenvolvimento, menor competitividade para o acasalamento, entre outros parâmetros biológicos importantes, no caso das pragas essa é uma condição favorável à adoção de estratégias de manejo.

No entanto, com relação aos inimigos naturais, o fato da linhagem selecionada apresentar alterações em alguns de seus parâmetros biológicos pode afetar diretamente o desempenho dela como agente de controle biológico. Duso et al. (1992) observaram uma redução na fecundidade em linhagens dos fitoseídeos *T. pyri* e *Amblyseius andersoni* resistentes a inseticidas organofosforados. No entanto, Fitzgerald & Solomon (2000) evidenciaram que uma população de *T. pyri* resistente a organofosforados, coletada em um pomar na Inglaterra, apresentou uma maior fecundidade do que a população tomada como suscetível de referência. Fournier et al. (1988) comparando parâmetros relacionados à tabela de

vida e a capacidade de predação, dentre outros, entre linhagens do ácaro predador *P. persimilis* resistente e suscetível ao inseticida metidation, não observaram custo adaptativo associado à linhagem selecionada. Grafton-Cardwell & Hoy (1986) também não observaram ocorrência de custo adaptativo associado a linhagens de *C. carnea* resistentes a carbaril. Apesar de vários relatos estarem associados à ausência de custo adaptativo em inimigos naturais resistentes a pesticidas, a realização de estudos prévios relacionados aos parâmetros biológicos, bem como a capacidade de predação ou de parasitismo na linhagem selecionada é de primordial importância, pois este fato pode comprometer diretamente a implementação de programas baseados na introdução desses organismos (Hoy, 1990).

Mecanismos de Resistência em Inimigos Naturais

Os principais mecanismos pelos quais os artrópodes podem expressar resistência são a redução na penetração cuticular do produto, aumento na destoxificação metabólica e redução na sensibilidade do sítio de ação.

Os indivíduos resistentes devido à redução na penetração cuticular recebem uma menor quantidade de tóxico no sítio de ação do produto. Já a resistência conferida devido ao aumento na destoxificação metabólica ocorre quando os indivíduos são capazes de degradar a molécula química em compostos inertes com maior eficácia do que os indivíduos suscetíveis. Vários grupos enzimáticos (monooxigenases dependentes do citocromo P-450, esterases, GST-transferase, etc.) estão envolvidos no metabolismo de pesticidas e têm sido identificados como mecanismo de resistência em várias espécies de artrópodes. Com relação aos indivíduos resistentes devido à redução na sensibilidade do sítio de ação, eles apresentam uma alteração deste, mostrando uma menor sensibilidade ao produto químico.

De acordo com Motoyama et al. (1971) o mecanismo de resistência de *N. fallacis* a azinfosmetil foi relacionado à enzima glutathione S-transferase. No

caso de *A. womersleyi* a degradação oxidativa foi o mecanismo primário da resistência a metidation, detectadas em populações desse ácaro (Sato et al., 2001). Uma ampla discussão dos mecanismos de resistência associados aos ácaros fitoseídeos pode ser evidenciada em Croft (1990). De um modo geral, deve-se enfatizar que os mecanismos relacionados à resistência de inimigos naturais a pesticidas são os mesmos que têm sido estudados para os artrópodes-praga, destacando-se o aumento na destoxificação metabólica.

Biotecnologia na Obtenção de Linhagens de Inimigos Naturais Resistentes a Pesticidas

A seleção artificial de linhagens de inimigos naturais resistentes a pesticidas nem sempre tem sido efetivada com sucesso. De acordo com Hoy (1990) algumas técnicas como a indução artificial de mutagenese ou a técnica do DNA recombinante poderiam ser ferramentas exploradas no melhoramento de inimigos naturais resistentes a pesticidas.

Com relação à indução de mutagenese visando à resistência, pode ser realizada utilizando-se substâncias químicas ou irradiação-X (Hoy, 1990). Sabendo-se que as mutações ocorrem ao acaso, e podem resultar na produção de linhagens com genes deletérios, com relação à indução de inimigos naturais mutantes, esse fato pode ser indesejável, principalmente quando o intuito da seleção dessa linhagem é a produção massal desses organismos para a introdução em campo.

A utilização da técnica do DNA recombinante tem sido considerada a mais viável para a implementação da resistência em inimigos naturais. Várias etapas envolvem esse processo, sendo necessário inicialmente realizar a identificação dos genes que governam a resistência, posteriormente devem ser clonados e inseridos no organismo (inimigo natural) geralmente através de microinjeção. Após a incorporação no genoma esse gene deve estabilizar, se expressar apropriadamente e ser transmitido às prole. *G. occidentalis* foi o primeiro inimigo natural melhorado através

desta técnica (Presnail & Hoy, 1994). Uma série de critérios foram listados por Hoy (1992) visando minimizar os riscos de introdução de inimigos naturais geneticamente modificados em campo. Um dos fatores que visou à segurança da introdução desse organismo transgênico em campo foi a realização de estudo em áreas úmidas da Flórida/EUA, local onde essa espécie não sobrevive devido à sua especialização a climas secos. Hoy (2000) enfatiza que os riscos devido à liberação da linhagem transgênica de *G. occidentalis* em campo, para fins experimentais, foram ínfimos. Todo o processo para a liberação deste estudo foi monitorado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Rigorosas precauções devem ser tomadas com relação à criação de manutenção de inimigos naturais transgênicos, incluindo a utilização de instalações adequadas e pessoal treinado (Hoy, 2000).

Perspectivas para Exploração de Inimigos Naturais Resistentes em MIP no Brasil

Apesar do elevado número de casos de implementação de programas de manejo de pragas baseados na liberação de linhagens resistentes de inimigos naturais (destacando-se os ácaros fitoseídeos) em vários países, no Brasil esse assunto ainda é incipiente. No entanto, as possibilidades de exploração desta ferramenta, que agrega harmoniosamente o controle químico ao biológico, parecem promissoras. No caso do emprego de *N. californicus* para o controle de *P. ulmi* em pomares de maçã no Rio Grande do Sul (Monteiro, 2002), a utilização de linhagens resistentes desse predador poderia contribuir para a preservação contínua dessa espécie nos pomares, inclusive durante as pulverizações para o controle de insetos comumente associados a essa cultura como *Grapholita molesta*.

A implementação de programas de manejo de ácaros-praga em cultivo protegido também emerge como uma possibilidade para a exploração de linhagens resistentes de inimigos naturais no Brasil, podendo reduzir o nú-

mero de pulverização com acaricidas, e conseqüentemente os custos de produção e quantidade de resíduos no produto final, acompanhando desse modo as exigências de um mercado que vem se tornando a cada dia mais exigente. Em citros, estudos revelaram que a evolução para a resistência ao inseticida deltametrina em algumas populações de ácaros fitoseídeos pode estar sendo responsável pela permanência deles em algumas áreas, contribuindo dessa forma para o controle biológico efetivo de ácaros-praga como *B. phoenicis* (Poletti, 2002).

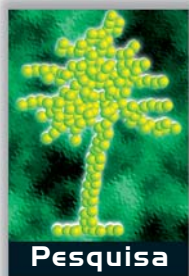
Referências Bibliográficas

- ADAMS, C. H.; CROSS, W. H. Insecticide resistance in *Bracon mellitor*, a parasite of the boll weevil. **J. Econ. Entomol.**, v.60, p.1016-1020, 1967.
- AUGER, P.; GUICHOU, S.; KREITER, S.; MATTIODA, H. Mancozeb-resistant populations of *Kampimodromus aberrans*. **Phytom.**, n.537, p. 22-24, 2001.
- BAKER, J. E.; ARBOGAST, R. T. Malathion resistance in field strain of warehouse pirate bug (Heteroptera: Anthocoridae) and a prey species *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Econ. Entomol.**, v.88, p.1570-1579, 1995.
- BAKER, J. E.; THRONE, J. E. Evaluation of a resistant parasitoid for biological control of weevils in insecticide-treated wheat. **J. Econ. Entomol.**, v.88, p.241-45, 1995.
- BISHOP, A. L.; BLOOD, P. R. B. Arthropod ground strata composition of the cotton ecosystem in south-eastern Queensland, and the effect of some control strategies. **Aust. J. Zool.**, v.28, p.693-697, 1980.
- BLOMMERS, L. H. M. Integrated pest management in European apple orchards. **Ann. Rev. Entomol.**, v.39, p.213-241, 1994.
- CACCIA, R.; BAILLOD, M.; GUIGNARD, E.; KREITER, S. Introduction d'une souche de *Amblyseius andersoni* Chant (Acarina: Phytoseiidae) résistante à l'azinphos dans la lutte contre les acariens phytophages en viticulture. **Rev. Suisse Vitic., Arboric. Hortic.**, v.17, p.285-290, 1985.
- CHAMBERS, H. W. Comparative tolerance of selected beneficial insects to methyl parathion. **Ann. Mtg. Entomol. Soc. Am.**, v.28, p.68, 1973.
- COLLYER, E. Integrated control of apple pests in New Zealand. 16. Progress integrated control of european red mite. **N. Z. J. Zool.**, v.7, 271-279, 1980.
- CROFT, B. A. **Arthropod biological control agents and pesticides**. New York: Wiley Interscience, 1990. 723p.
- CROFT, B. A.; JEPPSON, L. R. Comparative studies on four strains of *Typhlodromus occidentalis*. II. Laboratory toxicity of ten compounds common to apple pest control. **J. Econ. Entomol.**, v.63, p.1528-1531, 1970.
- CROFT, B. A.; MORSE, J. G. Research advances on pesticides resistance in natural enemies. **Entomoph.**, v.24, p.3-11, 1979.
- CROFT, B. A.; WHALON, M. E. Inheritance and persistence of permethrin resistance in the predatory mite *Amblyseius fallacis* (Acarina: Phytoseiidae). **Environ. Entomol.**, v.12, p.215-218, 1983.
- CROFT, B. A.; ALINIAZEE, M. T. Differential resistance to insecticides in *Typhlodromus arboreus* Chant associate Phytoseiid mite of apple in the Willamette Valley, Oregon. **J. Econ. Entomol.**, v.12, p.1420-1422, 1983.
- CROFT, B. A.; BRIOZZO, J.; CARBONELL, J. B. Resistance to organophosphorous insecticides in a predaceous mite, *Amblyseius chilensis*. **J. Econ. Entomol.**, v.69, p.563-565, 1976.
- DING, Y.; XIONG, J. J.; HUANG, M. D. Resistance of *Amblyseius nicholsi* Ehara et Lee (Acarina: Phytoseiidae) to some pyrethroids. **Nat. Enem. Ins.**, v.5, p.124-128, 1983.
- DUNLEY, J. E.; MESSING, R. H.; CROFT, B. A. Levels and genetics of organophosphate resistance in Italian and Oregon biotypes of *Amblyseius andersoni* (Acarina: Phytoseiidae). **J. Econ. Entomol.**, v.84, p.750-755, 1991.
- DUSO, C.; CAMPORESE, P.; van der GEEST, L. P. S. Toxicity of a number of pesticide to strains of

- Typhlodromus pyri* and *Amblyseius andersoni* (Acari: Phytoseiidae). **Entomoph.**, v.37, p.363-372, 1992.
- FITZGERALD, J. D.; SOLOMON, M. G. Field selection of predatory mite *Typhlodromus pyri* for resistance to pyrethroids. **Crop Protec.**, v.11, p.1199-1204, 1992.
- FITZGERALD, J. D.; SOLOMON, M. G. Differences in biological characteristics in organophosphorous-resistant strains of phytoseiid mite *Typhlodromus pyri*. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 24, p.735-746, 2000.
- FOURNIER, D.; PRALAVORIO, M.; COULON, J.; BERGE, J. B. Fitness comparison in *Phytoseiulus persimilis* strains resistant and susceptible to methidathion. **Exp. Appl. Acarol.**, v.5, p.55-64, 1988.
- FOURNIER, D.; PRALAVORIO, M.; TROTIN-CAUDAL, Y.; COULON, J.; MALEZIEUX, S.; BERGE, J. B. Selection artificielle pour la resistance au methidathion chez *Phytoseiulus persimilis* A. H. **Entomoph.**, v.32, p.209-219, 1987.
- GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES-TEJEDA, A. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods**. Rome: FAO, 1991. 318p.
- GERSON, U.; SMILEY, R. L.; OCHOA, R. **mites (acari) for pest control**. Oxford: Blackwell Science, 2003. 539p.
- GRAFTON-CARDEWELL, E. E.; HOY, M. A. Intraspecific variability in response to pesticides in the common green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). **Hilg.**, v.53, p.1-32, 1985.
- GRAFTON-CARDEWELL, E. E.; HOY, M. A. Genetic improvement of common green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae): selection for carbaryl resistance. **Environ. Entomol.**, v.15, p.1130-1136, 1986.
- GRAFTON-CARDEWELL, E. E.; OUYANG, Y. Toxicity of four insecticides to various populations of the predacious mite, *Euseius tularensis* Congdon (Acarina: Phytoseiidae) from San Joaquin Valley California citrus. **J. Agric. Entomol.**, v.10, p.21-29, 1993.
- HARDMAN, J. M.; ROGERS, M. L.; GAUL, S. O.; BENT, E. D. Insectary rearing and initial testing in Canada of an organofosphate/pyrethroid-resistant strain of predator mite *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) from New Zealand. **Environ. Entomol.**, v.26, p.1424-1436, 1997.
- HARDMAN, J. M.; MOREAU, D. L.; SNYDER, M.; GAUL, S. O.; BENT, E. D. Performance of a pyrethroid-resistant strain of the predator mite *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) under different insecticide regimes. **J. Econ. Entomol.**, v.93, p.590-604, 2000.
- HAVRON, A.; ROSEN, D. Selection for pesticide resistance in two *Aphytis* species. In: **Proc. Intern Congr. Entomol.**, 18, Vancouver, Canada, 1988, p.315d.
- HAVRON, A.; KENAN, G.; ROSEN, D. Selection for pesticide resistance in *Aphytis* I. *A. holoxanthus*, a parasite of the Florida red scale. **Entomol. Exp. Appl.**, v.61, p.221-228, 1991a.
- HAVRON, A.; KENAN, G.; ROSEN, D. Selection for pesticide resistance in *Aphytis* II. *A. lingnanensis*, a parasite of the California red scale. **Entomol. Exp. Appl.**, v.61, p.229-235, 1991b.
- HEADLEY, J. C.; HOY, M. A. Benefit/cost analysis of an integrated mite management program for almonds. **J. Econ. Entomol.**, v.80, p.555-559, 1987.
- HOY, M. A. Recent advances in genetics and genetic improvement of the Phytoseiidae. **Ann. Rev. Entomol.**, v.30, p.347-370, 1985a.
- HOY, M. A. Integrated mite management for California almond orchards. In: HELLE, W.; SABELIS, M. W. (Ed.) **Spider mites: their biology, natural enemies and control**, Amsterdam: Elsevier, 1985b, v.1B, p.299-310.
- HOY, M. A. Pesticide resistance in arthropod natural enemies: variability and selection response. In: ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. (Ed.) **Pesticide resistance in arthropods**, New York: Chapman and Hall, 1990, 203-236.
- HOY, M. A. Criteria for release of genetically-improved phytoseiids: an examination of the risks associated with release of biological control agents. **Exp. Appl. Acarol.**, 14, p.393-416, 1992.
- HOY, M. A. Transgenic arthropods for pest control: risks and realities. **Exp. Appl. Acarol.**, v.24, p.463-495, 2000.
- HOY, M. A.; CAVE, F. E. Guthion-resistant strain of walnut aphid parasite. **Calif. Agric.**, v.42, p.4-5, 1988.
- HOY, M. A.; KNOP, N. F. Selection for and genetic analysis of permethrin resistance in *Metaseiulus occidentalis*: genetic improvement of biological control agent. **Entomol. Exp. Appl.**, v.30, p.10-18, 1981.
- HOY, M. A.; WESTIGARD, P. H.; HOYT, S. C. Release and evaluation of laboratory-selected pyrethroid-resistant strain of predaceous mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) in two southern Oregon pear orchards and Washington apple orchard. **J. Econ. Entomol.**, v.76, p.383-388, 1983.
- HOYT, S. C. Resistance to azinphosmetil of *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) from New Zealand. **N. Z. J. Sci.**, v.15, 16-21, 1972.
- HUFFAKER, C. B.; KENNETT, C. E. Differential tolerance to parathion in two *Typhlodromus* predatory on cyclamen mite. **J. Econ. Entomol.**, v.46, p.707-708, 1953.
- HULL, L. A.; SATNER, V. R. Impact of four synthetic pyrethroids on major natural enemies and pests of apple in Pennsylvania. **J. Econ. Entomol.**, v.76, p.122-130, 1983.
- JOHANSEN, C. A.; EVES, J. D. Development of a pest management program of alfalfa grow for seed. **Environ. Entomol.**, v.2, p.515-517, 1973.
- KAPETANAKIS, E. G.; CRANHAM, J. E. Laboratory evaluation resistance to pesticides in the phytoseiid predator *Typhlodromus pyri* from English apple orchards. **Ann. Appl. Biol.**, v.103, p.389-400, 1983.

- KENNETT, C. E. Resistance to parathion in phytoseiid mite *Amblyseius hibisci*. **J. Econ. Entomol.**, v.63, p.1999-2000, 1970.
- KOGAN, M. Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. **Ann. Rev. Entomol.**, v.43, p.243-270, 1998.
- KOSTIAINEN, T.; HOY, M. A. Variability in resistance to organophosphorous insecticides in field-collected colonies of *Amblyseius finlandicus* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae). **J. Appl. Entomol.**, v.117, p.370-379, 1994a.
- KOSTIAINEN, T.; HOY, M. A. Genetic improvement of *Amblyseius finlandicus* (Acari: Phytoseiidae): laboratory selection for resistance to azinphosmetil and dimethoate. **Exp. Appl. Acarol.**, v.18, p.469-484, 1994b.
- LO, P. K. C.; WU, T. K.; TSENG, S. K. Studies on pesticide resistance in the phytoseiid mite, *Amblyseius longispinosus* (Evens). In: **Proc. Intern Congr. Entomol.**, 17, Hamburg, Germany, 1984, p.816.
- MARKWICK, N. P. Detecting variability and selecting for pesticide resistance into two species of Phytoseiidae mites. **Entomophaga**, v.31, p.225-236, 1986.
- MARSHALL, D. B.; THISTLEWOOD, H. M. A.; LESTER, P. J. Release, establishment, and movement of the predator *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) on apple. **The Canad. Entomol.**, v.133, p.279-292, 2001.
- McMUTRY, J. A. Life-styles of Phytoseiidae mites and their roles in biological control. **Ann. Rev. Entomol.**, v.42, p.291-321, 1997.
- MOCHIZUKI, M. Variations in insecticide susceptibility of predatory mite, *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acarina: Phytoseiidae) in tea fields of Japan. **Appl. Entomol. Zool.**, v.29, p.203-209, 1994.
- MONTEIRO, L. B. Seletividade de inseticidas a *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae) em macieira no, Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Frut.**, v.23, p.589-592, 2001.
- MONTEIRO, L. B. Manejo integrado de pragas em macieira no Rio Grande do Sul II. Uso de *Neoseiulus californicus* para o controle de *Panonychus ulmi*. **Rev. Bras. Frut.**, v.24, p.395-405, 2002.
- MORAES, G. J. de; SÁ, L. A. N. de. Perspectivas do controle do ácaro da leprose em citros. In: OLIVEIRA, C. A. L. de; DONADIO, L. C. (Ed.). **Leprose dos citros**, Jaboticabal: FUNEP, 1995. p.117-128.
- MOTOYAMA, N.; ROCK, G. C.; DAUTERMAN, W. C. Organophosphorous resistance in an apple orchard population *Typhlodromus (Amblyseius) fallacis*. **J. Econ. Entomol.**, v.63, p.1439-1442, 1970.
- MOTOYAMA, N.; ROCK, G. C.; DAUTERMAN, W. C. Studies on the mechanism of azinphosmethyl resistance on the predaceous mite, *Neoseiulus fallacis* (T.) (family: Phytoseiidae). **Pest. Bioch. Physiol.**, v.1, p.205-215, 1971.
- NAVAJAS, M.; THISTLEWOOD, H.; LAGNEL, HUGHES, C. Microsatellite sequences are under-represented in two mites genomes. **Insect Mol. Biol.**, v.7, p.249-256, 1998.
- NAVAJAS, M.; THISTLEWOOD, H.; LAGNEL, J. MARSHALL, D.; TSAGKARAKOU, A.; PASTEUR, N. Field releases of predatory mite *Neoseiulus fallacis* (Acari: Phytoseiidae) in Canada, monitored by pyrethroid resistance and allozyme markers. **Biol. Control**, v.20, p.191-198, 2001.
- PEREZ-MENDONZA, J.; FABRICK, J. A.; ZHU, K. Y.; BAKER, J. E. Alterations in esterases are associated with malathion resistance in *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **J. Econ. Entomol.**, v.93, p.31-37, 2000.
- PERROT-MINNOT, M. J.; NAVAJAS, M. Pseudo-arrhenotoky involves biparental inheritance of RAPD markers in males of haplo-diploid mite *Typhlodromus pyri*. **Genome**, v.38, p.838-844, 1995.
- PETRUSHOV, A. Z. Results of introduction into the USSR of a population of predaceous mite, *Metaseiulus occidentalis* (Acarina, Phytoseiidae), resistant to pesticides. **Zool. Zhur.**, v.66, p.674-680, 1987.
- PETRUSHOV, A. Z. Selection and mechanisms of Ambush resistance in *Metaseiulus occidentalis* (Acarina: Phytoseiidae). In: DUSBÁBEK, F.; BUKVA, V. (Ed.) **Modern Acarology**, Prague: Academia, 1991, v.2, p.741-748.
- PLAPP, F. W. Jr.; BULL, D. L. Toxicity and selectivity of some insecticides to *Chrysopa carnea*, a predator of the tobacco budworm. **Environ. Entomol.**, v.7, p.431-434, 1978.
- POLETTI, M. Variabilidade inter e intraespecífica na variabilidade na suscetibilidade de ácaros fitoseídeos (Acari: Phytoseiidae) a dicofol e deltametrina em citros. Piracicaba, 2002. 78p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-28102002-162036/> Acesso em 28 out. 2003.
- POLETTI, M.; GIBELI, L. F.; OMOTO, C. Possibilidade de exploração de linhagens de *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) resistentes à deltametrina em programas de manejo de ácaros. In: **Simp. Control. Biol.**, 7. Poços de Caldas, 2003. Resumos. São Pedro: SEB, 2003. p.180.
- PREE, D. J.; ARCHIBALD, D. E.; MORRISON, R. K. Resistance to insecticides to the common lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) in southern Ontario. **J. Econ. Entomol.**, v.82, p.29-34, 1989.
- PRESNAIL, J. K.; HOY, M. A. Transmission of injected DNA sequences to multiple eggs of *Metaseiulus occidentalis* and *Amblyseius finlandicus* (Acari: Phytoseiidae) following maternal microinjection. **Exp. Appl. Acarol.**, v.18, p.319-330, 1994.
- RASMY, A. H.; ELLAITHY, Y. M. Introduction of *Phytoseiulus persimilis* for twospotted spider mite control in greenhouses in Egypt (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). **Entomoph.**

- v.33, p.435-438, 1988.
- ROBERTSON, J. G. Changes in resistance to DDT in *Macrcentrus ancylivorus* Rohw. (Hymenoptera: Braconidae). **Can. J. Zool.**, v.35, p. 629-633, 1957.
- ROSENHEIM, J. A.; HOY, M. A. Intraespecific variation in levels of pesticide resistance in field population of a parasitoid. *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae): the hole of past selection pressures. **J. Econ. Entomol.**, v.79, p.1161-1173, 1986.
- ROSENHEIM, J. A.; HOY, M. A. Genetic improvement of a parasitoid biological control agent: Artificial selection for insecticide resistance in *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae). **J. Econ. Entomol.**, v.81, p.1539-1550, 1988.
- ROUSH, R. T.; HOY, M. A. Selection improves sevin resistance in spider mite predator. **Calif. Agric.**, v.34, p.11-14, 1980.
- ROUSH, R. T.; HOY, M. A. Genetic Improvement of *Metaseiulus occidentalis*: selection with methomyl, dimethoate, and carbaryl and genetic analysis of carbaryl resistance. **J. Econ. Entomol.**, v.74, p.138-41, 1981a.
- ROUSH, R. T.; HOY, M. A. Laboratory, glasshouse, and field studies of artificially selected carbaryl resistance in *Metaseiulus occidentalis*. **J. Econ. Entomol.**, v.74, p.142-47, 1981b.
- ROUSH, R. T.; PLAPP, F. W. Biochemical genetics of resistance to carbaryl carbamates insecticides in the predaceous mite, *Metaseiulus occidentalis*. **J. Econ. Entomol.**, v.75, p.304-7, 1982.
- ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Ann. Rev. Entomol.**, v.32, p.361-380, 1987.
- SATO, M. E.; MIYATA, T.; KAWAI, A.; NAKANO, O. Selection for resistance and susceptibility to methidathion and cross resistance in *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). **Appl. Entomol. Zool.**, v.35, p.393-399, 2000.
- SATO, M. E.; MIYATA, T.; KAWAI, A.; NAKANO, O. Methidathion resistance mechanisms in *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). **Pest. Bioch. Physiol.**, v.69, p. 1-12, 2001.
- SATO, M. E.; SILVA, M.; GONÇALVES, L. R.; SOUZA FILHO, M. F.; RAGA, A. Toxicidade diferencial de agroquímicos a *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) e *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) em morangueiro. **Neotr. Entomol.**, v.31, p.449-456, 2002.
- SCHOONES, J.; GILIOME, J. H. The toxicity of methidathion to parasitoids of red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.) (Hemiptera: Diaspididae). **J. Entomol. Soc. S. Africa**, v.45, p.261-273, 1982.
- SCHULTEN, G. G. M.; van de KLASHORST, G. RUSSELL, V. M. Resistance of *Phytoseiulus persimilis* A. H. (Acari: Phytoseiidae) to some insecticides. **Z. Angew. Entomol.**, v. 80, p. 337-341, 1976.
- SPOLEN, K.; HOY, M. A. Residual toxicity of five citrus pesticides to a carbaryl-resistant and wild strain of the California red scale parasite *Aphytis melinus* DeBach (Hymenoptera: Aphelinidae). **J. Econ. Entomol.**, v.86, p.195-204, 1993.
- SPOLEN, K.; JOHNSON, M. W.; TABASHNIK, B. E. Stability of fenvalerate resistance in the leafminer parasitoid *Diglyphus beginti* (Hymenoptera: Eulophidae). **J. Econ. Entomol.**, v.88, p.192-197, 1995.
- STRICKLER, K.; CROFT, B. A. Variations in permethrin and azinphosmethyl resistance in populations of *Amblyseius fallacis* (Acarina: Phytoseiidae). **Environ. Entomol.**, v.10, p.233-236, 1981.
- STRICKLER, K.; CROFT, B. A. Selection for permethrin resistance in the predatory mite, *Amblyseius fallacis*. **Entomol. Exp. Appl.**, v.31, p.339-345, 1982.
- THISTLEWOOD, H. M. A.; PREE, D. J.; CRAWFORD, L. A. Comparison of slide dip and petri dish assays for measuring resistance to permethrin in *Amblyseius fallacis* (Acari: Phytoseiidae). **J. Econ. Entomol.**, v.85, p.2051-2057, 1992.
- THISTLEWOOD, H. M. A.; PREE, D. J.; CRAWFORD, L. A. Selection and genetic analyses of permethrin resistance in *Amblyseius fallacis* (Garman) (Acari: Phytoseiidae) from Ontario apple orchards. **Exp. Appl. Acarol.**, v.19, p.707-721, 1995.
- TRIMBLE, R. M.; PREE, D. J.; VICKERS, P. M. Survey for insecticide resistance in some Ontario populations of the apple leafminer parasite, *Pholetes orornigis* (Weed) (Hymenoptera: Braconidae). **Can. Entomol.**, v.122, p.969-973, 1990.
- VIDAL, C.; KREITER, S. Resistance to a range of insecticides in the predaceous mite *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae): inheritance and physiological mechanisms. **J. Econ. Entomol.**, v.88, p.1097-1105, 1995.
- WALKER, P. W.; THURLING, D. J. Insecticide resistance in *Encarsia Formosa*. In: **Brit. Crop. Protec. Conf. Pests and Diseases**, Brighton, England, 1984, v. 2, p.541-546.
- WARNER, L. A.; CROFT, B. A. Selective toxicities of azinphosmethyl and selected orchard pesticides to the aphid predator, *Aphidoletes aphidimyza*. **J. Econ. Entomol.**, v.75, p.410-415, 1982.
- WHALON, M. E.; CROFT, B. A.; MOWRY, T. M. Introduction and survival of susceptible and pyrethroid-resistant strains of *Amblyseius fallacis* (Acari: Phytoseiidae) in a Michigan apple orchard. **Environ. Entomol.**, v.11, p.1096-1099, 1982.
- WHALON, M. E.; MOTA-SANCHES, D.; BILLS, P. The database of arthropods resistant to pesticides. Michigan State University – Center for Integrated Plant Systems. Disponível em: <http://www.cips.msu.edu/resistance/mdb/index.htm>. Acesso em 25 out. 2003.
- ZHU, K. Y.; KE, L. S.; XIN, J. L. Selection and genetic analysis of fenvalerate resistance in *Amblyseius pseudolongispinosus* (Acari: Phytoseiidae). **Syst. Appl. Acarol.**, v.1, p. 5-10, 1996. 🌿



O Mapeamento Genético no Melhoramento de Plantas

Teoria e aplicações inseridas em um programa de melhoramento de plantas

Rodrigo Barros Rocha

Biólogo, Mestrando em Genética e Melhoramento, UFV.
rbrgenetica@yahoo.com.br

Jorge Fernando Pereira

Biólogo, MS em Microbiologia Agrícola;
Doutorando em Microbiologia Agrícola, UFV.
dgfernando@yahoo.com

Cosme Damião Cruz

Engenheiro Agrônomo, DS em Genética e
Melhoramento na ESALQ - USP; Professor Titular do
Departamento de Biologia Geral da UFV.
cdcruz@ufv.br

Marisa Vieira de Queiroz

Bióloga, DS em Genética e Melhoramento ESALQ -
USP; Professora Adjunta do Departamento de
Microbiologia da UFV.
mvqueiro@ufv.br

Elza Fernandes de Araújo

Bióloga, DS em Genética, UFRGS; Professora Titular
do Departamento de Microbiologia da UFV.
ezfa@ufv.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Resumo

Os mapas genéticos idealizados há quase um século, tiveram sua importância aumentada para programas de melhoramento de plantas com a utilização dos marcadores moleculares, que, entre outras inovações, podem ser obtidos em número praticamente ilimitado. Inúmeros mapas de ligação que foram construídos com a utilização de diferentes populações e estratégias estão disponíveis na literatura para todas as grandes culturas vegetais. Detectar loci que afetem a expressão de características quantitativas tem sido considerado por vários autores como uma das aplicações de maior retorno da utilização de mapas genéticos no melhoramento de plantas.

1 - Histórico

Práticas que visam o melhoramento de plantas não são recentes e têm sido realizadas desde os primórdios da civilização (BORÉM, 1999). O avanço genético resultado dessas práticas depende de duas características populacionais principais; primeiro: da existência de variabilidade genética na população; e segunda: da herdabilidade das características desejadas (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

Historicamente, foram pouco utilizados os mapas de ligação no auxílio à seleção em programas de melhoramento, até mesmo em espécies bem estudadas como milho, *Zea Mays*, e

tomate, *Lycopersicum spp.* (ROCHA et al., 2003a, LEE, 1995). O tipo de marcador utilizado para o mapeamento (alterações citológicas estruturais) e a falta de mapas integrados que relacionem vários tipos de marcas são, segundo MOREAU et al. (2000), LANDER & BOTSTEIN, (1989), as principais dificuldades para a utilização de mapas genéticos no auxílio à seleção.

O desenvolvimento da metodologia de construção de mapas genéticos remonta do início do século passado. Após a redescoberta do trabalho de Mendel (MENDEL, 1866) em 1900, trinta e quatro anos depois de sua publicação, várias pesquisas foram realizadas com vistas a ampliar e validar suas conclusões a respeito do mecanismo de herança de características qualitativas. BATESON e PUNNET (1905), citados por STUTERVANT (1965), trabalhando com as características cor da flor e formato do grão de pólen, em ervilha, publicaram um dos primeiros relatos de ligação gênica ("linkage"). No entanto, o primeiro trabalho a sugerir que a distribuição gênica não independente é devida à localização dos genes nos cromossomos e a eventos de trocas de segmentos entre essas moléculas foi publicado por MORGAN (1910). Ao analisar o padrão de herança de um gene mutante ligado ao sexo, para a cor dos olhos em *Drosophila melanogaster*, MORGAN fornece a primeira evidência de que os genes estão localizados em posições definidas nos cromossomos e que podem ser manipulados e avaliados experimentalmente.

O mapeamento genético baseado na análise da frequência dos fenótipos recombinantes foi idealizado e desenvolvido por STUTERVANT (1913), que publicou o primeiro mapa genético. Alfred H. Stutervant trabalhou com seis genes ligados ao sexo em *Drosophila melanogaster* e ele não apenas produziu o primeiro mapa genético com todos os genes na sua posição correta, como também propôs o princípio básico do mapeamento genético, da utilização da frequência de recombinantes para estimar a distância entre dois genes e, em homenagem a seu orientador THOMAS H. MORGAN, denominou a unidade de mapa de CENTI-MORGAN. Embora a teoria cromossômica da herança tenha sido confirmada por BRIDGES (1914), somente no ano seguinte, STUTERVANT observou que deveriam ocorrer eventos de permutas duplas entre dois genes e que a ocorrência de permuta em uma região do cromossomo deve afetar a ocorrência de permuta em uma região adjacente, fenômeno este chamado de interferência.

O mapa de ligação de uma espécie pode ser definido com um arranjo linear de um grupo de genes ou marcadores adjacentes. Dois genes marcadores são ditos “ligados” sempre que menos de 50% dos gametas produzidos apresentarem genótipos recombinantes para esses dois genes (STUTERVANT, 1913). O uso de marcadores na genética e no melhoramento de plantas remonta ao início do século, quando BATESON e PUNNET (1905), citados por STUTERVANT (1965), perceberam que a herança da cor da flor e do formato do grão de pólen em ervilha não são independentes. Até a década de 80, a seleção em programas de melhoramento genético dependeu unicamente da avaliação de características fenotípicas para identificação dos indivíduos superiores (GRATAPAGLIA & SEDEROFF, 1994).

2 - Etapas da construção de um mapa genético.

Em geral, o primeiro passo na construção de um mapa de ligação

está relacionado com a escolha dos genitores a serem cruzados, de forma que maximize o polimorfismo genético (GRATAPAGLIA & SEDEROFF, 1994, VERHAEGEN et al., 1997). Uma vez selecionados os genitores, é necessário o desenvolvimento de uma progênie segregante, composta de pouco mais do que uma centena de indivíduos.

A escolha dos genitores e da população de mapeamento é uma das etapas mais importantes do processo. O número de marcadores polimórficos depende do polimorfismo genético entre os genitores e a precisão das estimativas de recombinação e aspectos práticos do processo, como número de indivíduos a serem analisados, estratégias de recombinação e cuidados em campo, entre outras, dependem da escolha da população.

Nesse contexto, a diversidade dos sistemas reprodutivos das espécies vegetais permite o desenvolvimento de vários tipos de populações de mapeamento (BOREM, 1999). Cada progênie apresenta características próprias, que devem ser consideradas pelo pesquisador no momento da escolha de sua população. Geralmente, as populações segregantes analisadas na construção de mapas de ligação são as populações F2 derivadas de F1 por autofecundação; as populações de R.I.L. (“Recombinant Inbreed Lines”); as obtidas por retrocruzamento; e as populações duplos haplóides, resultado da duplicação artificial do genoma haplóide (ROCHA et al., 2003b). Estratégias que envolvam a necessidade de poucas gerações resultam em significativos ganhos de tempo para espécies de ciclo de vida longo, como, por exemplo, as espécies florestais. GRATAPAGLIA & SEDEROFF (1994) sugerem a utilização de populações F1 derivadas do cruzamento entre genitores geneticamente contrastantes.

Após a escolha dos genitores e o desenvolvimento da população segregante, a etapa seguinte envolve a obtenção de marcas contrastantes entre os genitores que apre-

sentem segregação mendeliana na população de mapeamento. A estratégia de busca pelas marcas polimórficas depende, principalmente, do tipo de marcadores utilizados e da diversidade genética da espécie estudada.

Dentre os tipos de marcadores disponíveis se destacam aqueles baseadas na reação de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). A reação de PCR permite a replicação “in vitro” de fragmentos de DNA, o que resulta em grandes quantidades desses fragmentos a partir de poucas moléculas iniciais de DNA. A técnica de PCR, conforme idealizada e desenvolvida por Kary Mullis, envolve a amplificação de uma região específica do DNA, de sequência conhecida, que utiliza oligonucleotídeos complementares que flanqueiam a região alvo (MULLIS & FALOONA, 1987). O PCR ocorre em três ciclos de temperatura, onde oligonucleotídeos de sequência específica são utilizados como iniciadores para a síntese de uma fita de DNA complementar da região alvo. O conhecimento prévio da região a ser amplificada é uma das principais limitações da técnica, pois impossibilita o estudo simultâneo de muitos loci.

Por sua praticidade e capacidade de discriminação simultânea de vários loci, os marcadores RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), baseados na reação de PCR (WILLIAMS et al., 1990), estão entre os mais utilizados para o mapeamento genético vegetal. Esses são marcadores dominantes (não permitem a discriminação do genótipo heterozigoto), de sequência desconhecida, amplificados aleatoriamente no genoma. A Figura 1 mostra o padrão de amplificação de genitores *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* e seis indivíduos de uma progênie de 110 indivíduos. A amplificação conjunta do DNA total dos dois genitores e de seis indivíduos da população F1 faz com que a probabilidade de detecção da segregação de um marcador polimórfico seja superior a 98%.

Após a escolha dos marcadores polimórficos é necessária à análise do padrão de amplificação dos indivíduos do restante da população de mapeamento e a obtenção das estimativas de recombinação. Para construir um mapa genético, todos os marcadores devem ser analisados dois a dois, verificando a independência ou a existência de ligação entre eles (LIU, 1998). Com base no princípio de que os genótipos recombinantes alterados por permuta simples ou por permuta dupla são gerados em frequências diferentes, utiliza-se o teste de aderência χ^2 (qui-quadrado) para confirmar a ligação entre os marcadores. O teste de χ^2 é qualitativo, pois apenas comprova a existência ou não de ligação gênica. Esse teste permite calcular o desvio entre os resultados esperados, sem a ocorrência de permutas, com os resultados observados, sendo sensível à magnitude do desvio e ao número de genótipos amostrados (FALCONER, 1987). A Figura 2 mostra o padrão de segregação de alguns marcadores úteis para o mapeamento em 28 indivíduos da progênie F1.

Uma vez confirmada a existência da ligação entre duas marcas, é indispensável adotar métodos quantitativos para estudar o grau de associação entre essas marcas. A metodologia de Máxima Verossimilhança é utilizada no mapeamento genético para a obtenção de várias estimativas, inclusive as da frequência de recombinação (LIU, 1998). O método da Máxima Verossimilhança permite a obtenção de estimadores consistentes, de distribuição normal, eficiência assintótica e variância mínima. A confiabilidade do posicionamento das marcas ao longo do grupo de ligação pode ser avaliada considerando as variâncias associadas às estimativas de recombinação (LIU, 1998).

Como proposto por STUTERVANT, a frequência de recombinação (r) pode ser utilizada para estimar a distância entre pontos do cromossomo; no entanto, a ocorrência de permutas duplas faz com que essa unidade não seja aditiva. As permutas duplas ten-

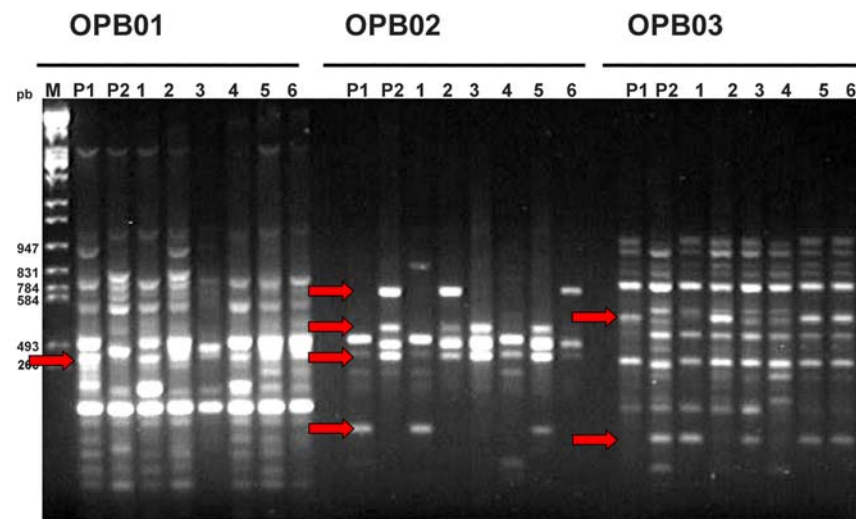


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de amplificação utilizando os oligonucleotídeos OPB01, OPB02, OPB03. P1 e P2 indicam os genitores *E. grandis* e *E. urophylla* e os números de 1 a 6, indivíduos da F1 escolhidos aleatoriamente. O marcador utilizado é o DNA do fago λ clivado com as enzimas *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*. As setas em vermelho indicam alguns marcadores polimórficos entre os genitores e em segregação 1:1 na progênie.

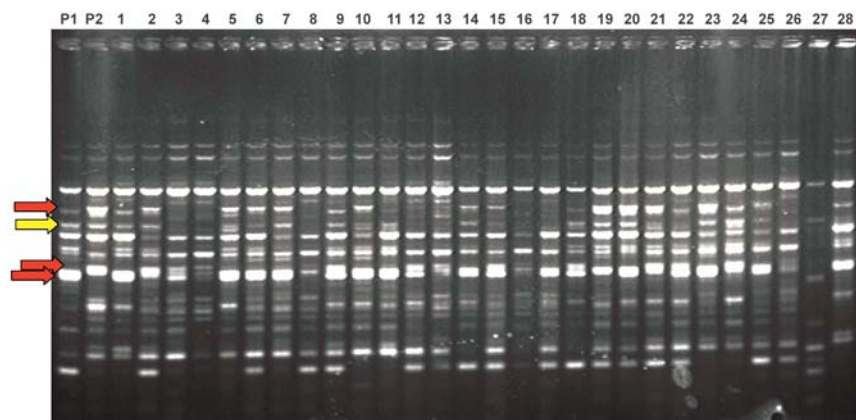


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de amplificação utilizando o oligonucleotídeo OPAB-05. P1 e P2 indicam os genitores *E. grandis* e *E. urophylla*, respectivamente, e os números de 1 a 28, indivíduos da progênie F1. As setas vermelhas indicam marcas polimórficas entre os genitores de segregação 1:1, e a seta amarela indica marcas não polimórficas entre os genitores de segregação 3:1. O teste de aderência do χ^2 deve ser utilizado para confirmar a segregação mendeliana das marcas.

dem a recompor a fase de ligação presente no genótipo parental; nesse contexto, somente alguns tipos de permutas geram gametas recombinantes, resultando em uma tendência de subestimar a frequência de recombinação quando são considerados maiores valores de distância (GARDNER & SNUSTAD, 1996). O problema da não aditividade da unidade “ r ” é contornado com a utilização de funções de mapeamento, que, semelhante a uma transformação de dados, resulta em uma alteração de escala. Existem diferentes funções de mapeamento, sendo que as mais utilizadas são aque-

las propostas por Haldane e por Kosambi. A função de Kosambi é considerada mais completa porque leva em consideração o fenômeno da interferência entre os eventos de permuta adjacentes (LIU, 1998).

Finalmente, para compor um grupo de ligação, conhecendo-se as frequências de recombinação entre diversos loci, é possível estimar, com um certo grau de precisão, a ordem desses loci no grupo de ligação. Por exemplo, em seu trabalho, STUTERVANT (1913) estimou a frequência de recombinação entre seis genes determinantes de

características qualitativas ligadas ao sexo. A frequência de recombinação (r) entre os loci B (“Black factor”, gene que define a cor do corpo), C (gene que define a pigmentação dos olhos) e P (olhos vermilion) foram respectivamente ($r_{BC} = 1$ u.m.; $r_{CP} = 30.7$ u.m.; $r_{BP} = 31.7$ u.m.). Tais índices permitem determinar um único ordenamento para os três loci: B-C-P. A estimação de três pontos, como é conhecida, é de fácil aplicação, porém é limitada quando muitos loci são considerados simultaneamente. Normalmente, o ordenamento dos loci é feito determinando-se a ordem de maior verossimilhança ou utilizando-se a metodologia de delineação rápida de cadeia. A ordem de máxima verossimilhança é o critério preferido, pois é o que gera a ordem de máxima probabilidade de ocorrência para o conjunto de dados analisados, porém é uma metodologia computacional demorada, uma vez que o crescimento no número de ordens possíveis é exponencial em função do aumento no número de loci (BEARZOTI, 2000).

Uma alternativa para esses dois métodos é a metodologia de delineação rápida em cadeia. Esse procedimento é bastante simples e consiste na obtenção de uma ordem preliminar a partir de uma matriz que contenha os valores de recombinação entre os pares de marcas, seguido de tentativas de inversões múltiplas entre conjuntos de três marcas. Para ilustrar o que foi dito, vamos considerar a matriz que contém valores de r entre os marcadores A, B, C, D (TABELA 01). A primeira etapa consiste em identificar o menor valor de r .

$$B \xrightarrow{0,09} D$$

A seguir, toma-se um locus à esquerda de B ou à direita de D, escolhendo aquele com o menor valor de frequência de recombinação “ r ”. Nesse caso, o menor valor de r entre as marcas está entre B e C.

$$C \xrightarrow{0,15} B \xrightarrow{0,09} D$$

TABELA 01- Tabela contendo valores de recombinação entre as marcas A, B, C e D.

	A	B	C	D
A	0	0,34	0,49	0,25
B		0	0,15	0,09
C			0	0,24
D				0

Posicionando a única marca que falta:

$$C \xrightarrow{0,15} B \xrightarrow{0,09} D \xrightarrow{0,25} A \quad \sum_{i=1}^n r_i = 0,49$$

O próximo passo consiste em fazer permutações de marcas adjacentes. Se o somatório dos valores de “ r ” diminuir, deverá ser feita uma troca entre as ordens.

$$B \xrightarrow{0,15} C \xrightarrow{0,24} D \xrightarrow{0,25} A \quad \sum_{i=1}^n r_i = 0,64$$

$$C \xrightarrow{0,24} D \xrightarrow{0,09} B \xrightarrow{0,34} A \quad \sum_{i=1}^n r_i = 0,67$$

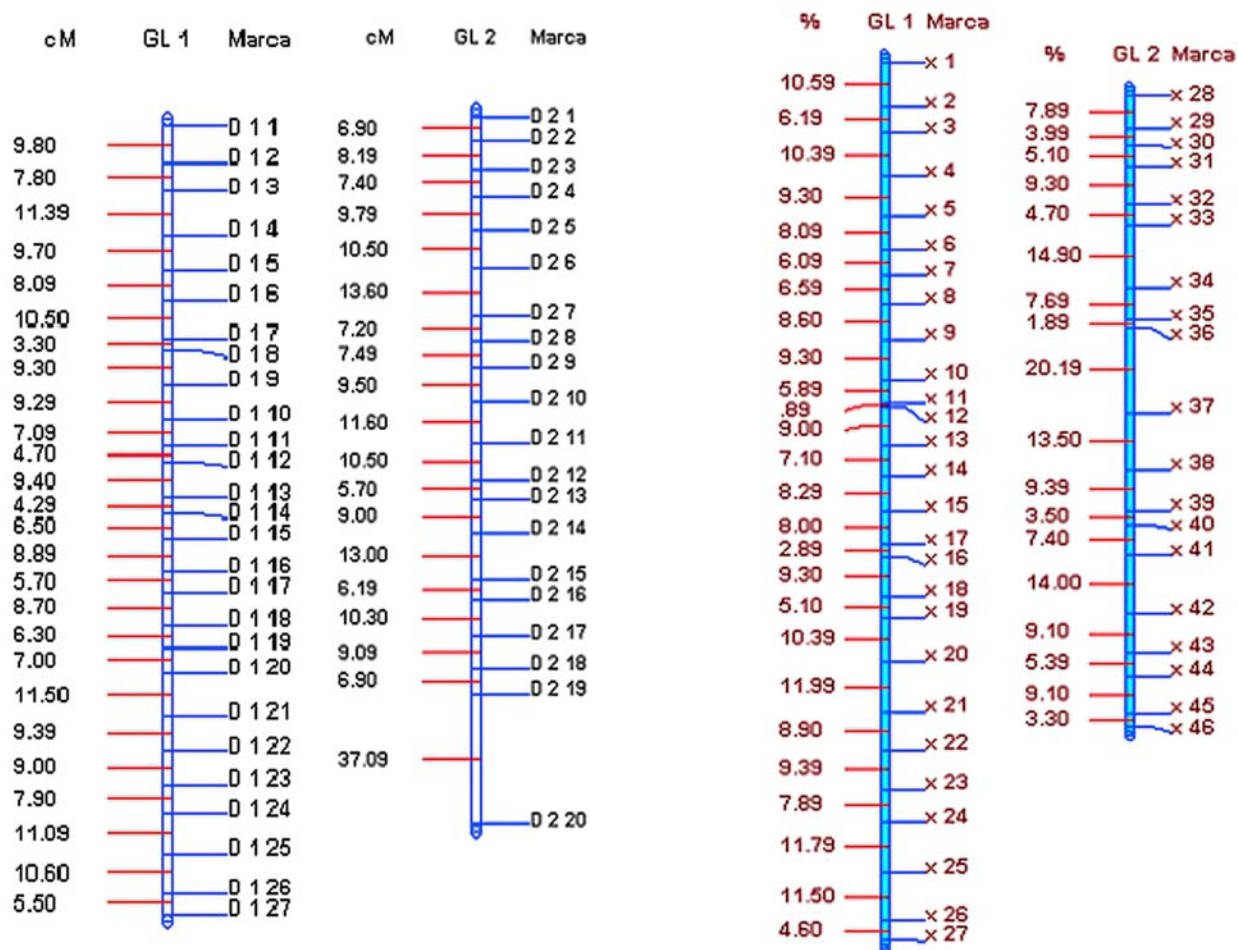
$$C \xrightarrow{0,15} B \xrightarrow{0,34} A \xrightarrow{0,25} D \quad \sum_{i=1}^n r_i = 0,74$$

Para ilustrar a precisão associada às metodologias de construção de mapas genéticos, foi simulado um pequeno genoma, utilizando-se o programa GQMOL, em desenvolvimento na Universidade Federal de Viçosa (disponível em <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>). Genoma esse constituído por apenas dois grupos de ligação, cada um com 200 unidades de mapa de tamanho; e 27 e 20 marcas dominantes, respectivamente, em cada grupo de ligação. A partir desse genoma artificial, foram gerados dois genitores contrastantes e uma progênie F2, constituída de 100 indivíduos. A Figura 3 mostra o genoma simulado ao lado das estimativas de recombinação e das ordens dos marcadores estimadas; utilizando a metodologia de Máxima Verossimilhança para a obtenção das estimativas de recombinação e a metodologia da delineação rápida em cadeia para obter a ordem das marcas. Boas aproximações em relação aos valores paramétricos foram obtidas para esse tipo de população, considerando as metodologias utilizadas e o número de indivíduos analisados, com destaque para a ordem estimada dos marcadores ao longo do grupo de ligação idêntica à ordem simulada.

3 - Aplicações dos mapas genéticos inseridos em programas de melhoramento vegetal.

Mapas de ligação integrados, construídos com marcas morfológicas, bioquímicas e moleculares já estão disponíveis na literatura para várias espécies vegetais, com destaque para as espécies tipicamente agrônomicas. Embora de fácil identificação, o número reduzido dos marcadores morfológicos faz com que a probabilidade de evidenciar correlações entre esses marcadores e características de importância econômica seja reduzida (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998). O advento das técnicas de marcadores moleculares, em meados da década de 80, resultou em aumento significativo da importância dos mapas genéticos no auxílio à seleção em programas de melhoramento (LEE, 1995). Atualmente, diversas técnicas permitem a obtenção de um número praticamente ilimitado de marcadores genéticos neutros, cuja herança pode ser acompanhada sem influência do ambiente e avaliados em qualquer fase do desenvolvimento.

O desenvolvimento de mapas genéticos permite a predição de descendências de cruzamentos controlados, localização das regiões do genoma responsáveis pela expressão das características e quantificação da sua importância para a expressão do fenótipo. Tais informações podem ser utilizadas na decomposição da herança complexa das características quantitativas. A identificação de marcas relacionadas com regiões-chave do genoma para a expressão de características quantitativas (QTL's Quantitative Traits Loci) é um dos principais objetivos da utilização de mapas genéticos inseridos em pro-



Genoma simulado, constituído de dois grupos de ligação com 200 unidades de mapa de tamanho, que apresenta, respectivamente, 27 e 20 marcadores dominantes.

Estimativas de máxima verossimilhança dos grupos de ligação obtidas a partir de progênie F2, constituída de 100 indivíduos, originada do cruzamento de genitores de genótipo contratantes.

Figura 3 - Grupos de ligação 1 e 2 paramétricos (à direita) e estimados (à esquerda), utilizando a metodologia de Máxima Verossimilhança para a obtenção das estimativas da frequência de recombinação "r" e a metodologia da delineação rápida em cadeia para o ordenamento dos locos. Para isso, foi gerada uma população F2, constituída de 100 indivíduos, com 47 marcas dominantes.

gramas de melhoramento. De acordo com DUDLEY (1993), a seleção assistida para características quantitativas por marcadores consiste de dois passos: identificação de associações entre marcadores e QTLs e o uso dessas associações para desenvolvimento de populações melhoradas.

A utilização de marcadores moleculares para auxiliar procedimentos de seleção baseia-se na premissa de ligação gênica entre o locus marcador e as regiões do genoma relacionadas com a expressão de características de interesse econômico (LANDE & THOMPSON, 1990). A identificação e a caracterização de marcas moleculares próximas às regiões do genoma determinantes da

expressão de características de interesse estão diretamente relacionadas com a eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares. Nesse contexto, a condução de experimentos que possibilitem o isolamento do efeito ambiental, juntamente com a análise exaustiva de algumas centenas de genótipos, permite o desenvolvimento de marcadores com alta eficiência de seleção.

A possibilidade de monitoramento da incorporação de genes de interesse por retrocruzamento, a seleção precoce baseada no índice de heterose entre os indivíduos e a presença das marcas moleculares para as características desejadas são utilizações que, potencialmente, po-

dem acelerar e aumentar a eficiência da seleção em programas de melhoramento. (MURO_ABAD, 2000, LANDE & THOMPSON, 1990). A construção de mapas de ligação visando à seleção assistida por marcadores moleculares é considerada por alguns autores como uma das aplicações de maior impacto: é o resultado da utilização da tecnologia de marcadores moleculares associado a programas de melhoramento genético (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998, MURO_ABAD, 2000).

Além do estudo e da localização dos QTLs e da determinação de seus efeitos, é interessante considerar que o desenvolvimento de um mapa genético permite estudos em várias

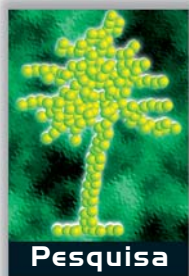
outras áreas como, por exemplo, o esclarecimento da estrutura do genoma, a clonagem de blocos de genes de interesse, e os estudos de sintenia (relativo à localização de dois ou mais genes em um mesmo cromossomo) em espécies relacionadas (LIU, 1998).

O cruzamento das informações obtidas com o mapeamento genético tradicional e com o mapeamento físico do genoma deve facilitar a caracterização de genes e de regiões do genoma críticas para a expressão fenotípica, dando subsídios para a clonagem de blocos de genes desejáveis. A relação entre as unidades de mapa e a distância em pares de base não é uma constante entre as espécies e depende, principalmente, da saturação do mapa e do tamanho do genoma da espécie considerada. Tais estudos associados a sintenia entre as espécies podem facilitar o entendimento de muitos processos fisiológicos e de diferenças entre espécies, fornecendo a base teórica para a seleção e manipulação genética de espécies relacionadas.

4. Referências Bibliográficas

- BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL In: Pinheiro J. B., Carneiro, I F. (Ed.) **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia, FUNAPE, 2000. 232p.
- BRIDGES C. B. Direct proof through non-disjunction that the sex-linked genes of *Drosophila* are borne by the X-chromosome **Science** v.40:p.107-109, 1914.
- BOREM A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, UFV, 1999, 817p.
- CRUZ, C. D., CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, Imprensa Universitária – Universidade Federal de Viçosa, 2003. 585p.
- DUDLEY, J. W.; Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Sci**, v.33:p. 660-668, 1993.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. M.A. SILVA e J.C. SILVA. Viçosa, Imprensa Universitária - Universidade Federal de Viçosa, 1987. 279p.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- GARDNER, E. J.; SNUSTAD, D. P. **Genética**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1996. 497p.
- GRATTAPAGLIA, D., SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137:p.1121-1137, 1994.
- LANDER E. S., BOTSTEIN D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121 p.185-199, 1989.
- MOREAU L., LEMARIE S., CHARCOSSET A., GALLAIS A. 2000 Economic efficiency of one cycle marker-assisted selection. **Crop Science** v.40 p.329-337, 2000.
- LANDER, THOMPSON R. Efficiency of marker-assisted selection in improvement of quantitative traits. **Genetics** v.124 p.743-756, 1990.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. In: LEE, M. **Advances in Agronomy** Iowa: Academic Press Inc., 1995, p.265-344.
- LIU, B. H. **Statistical genomics. Linkage, Mapping and QTL Analysis**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1998, 605p.
- MENDEL, G. **Experiments in plant hybridization**. Tradução de William Bateson 1901.[on line] disponível em <http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/gm-65.pdf>. Acesso em 15 de agosto de 2002.
- MORGANT H., Sex limited inheritance in *Drosophila*. **Science** v.32:p.120-122, 1910.
- MULLIS, K. & FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**. v.55:p.335-350, 1987.
- MURO ABAD, J.I.; **Método de melhoramento, assistido por marcadores moleculares, visando a obtenção de híbridos de *Eucalyptus ssp***. Viçosa, MG, Dissertação. (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, 2000. 74p.
- ROCHA R. B., MURO_ABAD J. I., ARAÚJO, E. F. Seleção de marcadores RAPD visando a construção de mapa de ligação (*Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*) **2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, Viçosa, MG 2003a.
- ROCHA, R. B., ALFENAS, P. F., BARROS, W. S., FERREIRA F. M., CRUZ, C. D., ARAÚJO, E. F. Utilização do Método da Máxima Verossimilhança para comparação de populações utilizadas no mapeamento genético vegetal. **49º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, 2003b.
- STUTERVANT, A. H., The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila* as shown by their mode of association. **Journal of Experimental Zoology** v.14:p.43-59, 1913. [on line] disponível em <http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/gm-65.pdf>. Acesso em 15 de agosto de 2002.
- STUTERVANT, A. H., **A History of Genetics**. New York: Harper & Row, 1965. 156p.
- VERHAEGEN, D., PLOMION, C., GION, J.-M.; POITEL, M., COSTA, P., KREME, A. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: I. Detection of QTL in Interspecific hybrid progeny, stability of QTL, expression across different ages. **Theor Appl Genet**, v. 95:p. 597-608, 1997.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; SCOTT, V.T. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18:p. 6531-6535, 1990.





Filmes Comestíveis de Quitosana

Ação biofúngica sobre frutas fatiadas

Odílio B. G. Assis, Dr.
Embrapa Instrumentação Agropecuária
odilio@cnpdia.embrapa.br

Ariane Maria Leoni
Bióloga - Estagiária,
Embrapa Instrumentação Agropecuária
ariane@cnpdia.embrapa.br

Ilustrações: Embrapa Instrumentação Agropecuária

Introdução

Usar revestimentos e coberturas em frutas e vegetais com o objetivo de aumentar seu período de preservação não consiste em prática recente. Segundo Hardenburg (1967), emulsões derivadas de óleos minerais têm sido empregadas desde o século 13 na China, na conservação de frutos cítricos e em outros produtos que eram transportados por longas distâncias por via marítima. Na década de 1950, a cera de carnaúba foi introduzida para esse fim, mas, devido à aparência fosca resultante de sua aplicação, foram misturados com polietileno e parafina. Nos anos de 1960, ceras e vernizes processados a partir de gomas solúveis em água se tornam populares no revestimento de cítricos e frutas em geral.

As coberturas denominadas “comestíveis” como hoje conhecemos são mais recentes, e datam das décadas finais do século passado, quando os produtores tiveram seu interesse por elas aumentado devido à expansão da oferta de produtos processados. A indústria dos chamados alimentos *minimamente processados* foi inicialmente desenvolvida com o objetivo de suprir restaurantes, hotéis e instituições similares. Nas últimas décadas, contudo, em função das conveniências da vida moderna, os produtos processados experimentaram uma significativa expansão, com oferta de opções no varejo e facilidade de escolha para o consumo direto.

As mudanças nos padrões nutricionais e os benefícios creditados a uma alimentação saudável formaram a grande força impulsionadora desses produtos e têm refletido, desde então, em âmbito mundial, uma atenção para as pesquisas de novos materiais e agentes com propriedades preservativas e bactericidas naturais que possam ser convenientemente empregados em alimentos.

Em particular os seguimentos de “fresh-cut” e “ready-to-eat” são os que requerem uma tecnologia específica para a manutenção apropriada de suas qualidades nutricionais (Wiley, 1997).

De acordo com Clemente (1999), frutas e vegetais minimamente processados foram timidamente introduzidos no Brasil no início da década de 1990 em São Paulo. Estima-se hoje um crescimento na taxa de, pelo menos, 20% ao ano, tendo movimentado, em 1998, cerca de R\$ 450 milhões, só no mercado nacional de vegetais minimamente processados (Fares & Nantes, 2001).

Os revestimentos comestíveis sobre alimentos devem apresentar certas peculiaridades como serem invisíveis, terem aderência suficiente para não serem facilmente removidos no manuseio e não introduzirem alterações no gosto.

Embora atributos de qualidade sejam os objetivos principais de um revestimento, dá-se uma ênfase natural às características visuais. Como dados apresentados nos trabalhos de Ahvenainen (1996) e de Nassu et al., (2001), a principal preocupação dos consumidores está em adquirir produtos com aparência de frescos,

cor aceitável e razoavelmente livres de defeitos.

O principal papel de uma cobertura comestível, no entanto, é atuar como uma barreira à perda de umidade, controlar a respiração do fruto e evitar contaminações microbiológicas e químicas. Durante a respiração, a glicose é metabolizada em dióxido de carbono (CO_2) por meio da interação do ácido tricarbóxico, o que gera o amadurecimento e deterioração natural do fruto. A atmosfera modificada criada pelo revestimento gera um aprisionamento físico do CO_2 dentro do fruto. Se a permeação de oxigênio (O_2) para seu interior é reduzida, ocorrerá um prolongamento do tempo de maturação. Além disso, os revestimentos comestíveis têm a vantagem da biodegradabilidade que os torna “ambientalmente corretos”.

Lipídios, polissacarídeos e proteínas são os produtos comumente empregados na formação das coberturas comestíveis sobre frutas, com vantagens e desvantagens específicas de cada material (Baldwin et al., 1995). Têm sido tentativas recorrentes na pesquisa de superfícies ativas a deposição de multicamadas ou de estruturas compósitas e combinações destes ou adição de demais materiais.

Respiração em Frutos

Sob condições ideais, a maioria das plantas, incluídos seus frutos, respira aerobicamente. A respiração aeróbica envolve a quebra de moléculas de carboidratos obtidos durante a fotossíntese. A queima lenta desses compostos ricos em energia, dos quais um dos mais simples é a glicose, constitui atividades metabólicas bem conhecidas e são usadas na formação de adenosina trifosfatada (ATP). Durante o processo respiratório normal, a planta usa o oxigênio da atmosfera como um aceptor de elétrons no processo de fosforilação e libera dióxido de carbono.

Quando o fruto é colhido, há uma interrupção no balanço gasoso, ocorrendo um alto influxo do oxigênio com proporcional perda do CO_2 . Nessa nova condição (alta concentração de O_2 com baixa de CO_2), as células internas não são mais reno-

vadas e a respiração aumenta, o que provoca uma queda metabólica levando o fruto a um gradual amadurecimento e eventual senescência. Com o revestimento ocorre entupimento parcial dos poros, reduzindo, dessa forma, a troca gasosa, ou seja, reduzindo a taxa de respiração, o que permite um prolongamento da vida do fruto.

Revestimentos Hidrocolóides

Um dos materiais de interesse no processamento de coberturas são os hidrocolóides. Hidrocolóides são polímeros solúveis em meios aquosos, estabilizados em géis que normalmente, solidificam e formam filme por evaporação direta do solvente. Os revestimentos de hidrocolóides constituem excelente barreira aos gases, mas oferecem fraca proteção à migração do vapor de água, dada a sua natureza hidrofílica.

Os hidrocolóides utilizados na preparação de filmes comestíveis podem ser classificados segundo a sua composição, massa molecular e solubilidade. De acordo com Donhwe e Fennema (1994), os filmes hidrocolóides mais utilizados são os glucídicos e os protéicos. Os glucídicos mais utilizados são os derivados de celulose, os alginatos, as pectinas, a goma-arábica e o amido ou amido modificado. A proteína de soja, o glúten, a zeína e o soro de leite são algumas das proteínas frequentemente utilizadas na preparação de revestimentos comestíveis.

Polissacarídeos de origem animal têm sido avaliados como uma alternativa consideravelmente econômica e eficiente para esse fim, sendo a quitosana o composto mais estudado (Coma et al., 2002).

A quitosana

A quitosana é um polímero natural derivado do processo de desacetilação da quitina, que é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, atrás apenas da celulose. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) e apresenta uma cadeia polimérica quimicamente similar à da celulose, conforme expressa na Figura 1. Devido a suas características atóxicas e de fácil formação de géis, a quitosana tem sido considerada há décadas como um composto de interesse industrial e especialmente de uso farmacêutico (Campana-Filho & Desbrières, 2000). Recentemente, contudo, uma série de estudos tem sido publicada caracterizando o uso da quitosana como cobertura de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes processados (Shahidi et al., 1999; Coma et al., 2002). Esses trabalhos enfocam, essencialmente, as propriedades antifúngicas e antibacterianas da quitosana, conforme demonstrado por No et al., (2002), indicando por conseguinte o seu uso potencial sobre superfícies cortadas ou sobre frutos com alta taxa de maturação pós-colheita. Como a quitosana constitui-se de fibras não digeríveis, não apresenta, portanto, valor calórico, independentemente da quantidade ingerida, o que é mais um atrativo para a indústria alimentar.

As diferentes características do produto comercial tornam-se um dos aspectos que têm dificultado seu pleno uso na indústria alimentícia. As quitosanas disponíveis, principalmente no Brasil, são de procedências diversas e apresentam diferentes graus de pureza e densidade molar, além de não seguirem industrialmente um procedimento comum de desa-

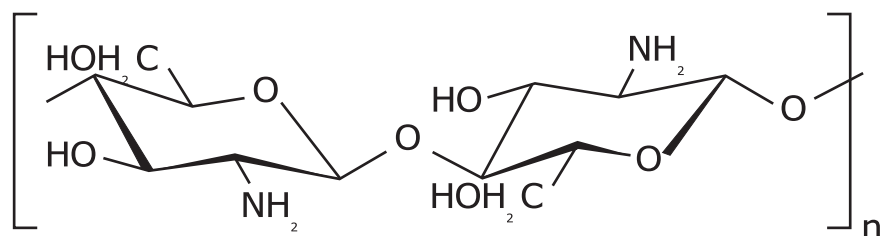


Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo n o grau de polimerização.

cetilação, o que torna os materiais comerciais consideravelmente diferentes entre si. Esse fato dificulta o estabelecimento de um processamento padrão de géis e a obtenção de filmes e revestimentos com características reprodutíveis (Assis & Alves, 2002). Outro aspecto importante é que as quitosanas comerciais são solúveis somente em pHs ácidos, o que pode gerar reações com a superfície a ser revestida, alterando o aspecto e o sabor da polpa. Alterações na seqüência de desacetilação ou mudanças estruturais introduzidas na cadeia da quitosana já processada, como o derivado N-carboximetilquitosana, podem gerar produtos solúveis em pH neutro. De um modo geral, contudo, a quitosana tem sido internacionalmente aceita como material promissor para revestimento de frutas e de alimentos diversos.

Metodologia para Formação de Géis e Revestimento

A quitosana empregada nesta avaliação foi obtida em farmácias de manipulação, sendo, segundo informação inscrita, procedente da purificação de quitinas extraídas de cascas de camarão. Esse material apresenta aspecto granular, ligeiramente amarelado e pode ser classificado como de média massa molar (Signini & Campana-Filho, 1998).

Os géis foram preparados por dissolução sob agitação moderada em ácido acético 0,5 M até equilíbrio em pH próximo a 3. Estudos preliminares indicaram que os melhores resultados na formação de filmes são conseguidos com soluções com concentrações de quitosana próximos a 20 g/L (Assis & Pessoa, 2003). São necessários períodos superiores a 12 horas de agitação para obter uma total homogeneização da solução. Para simplificar o processo, todo o procedimento foi realizado sob temperatura ambiente.

Frutos comerciais de maçãs da cv. Gala, foram seccionadas ao meio, dois procedimentos de revestimento adotados: i) as amostras foram imersas com a ajuda de um suporte metálico na solução filmogênica e ii) as amostras foram revestidas por nebulização, com

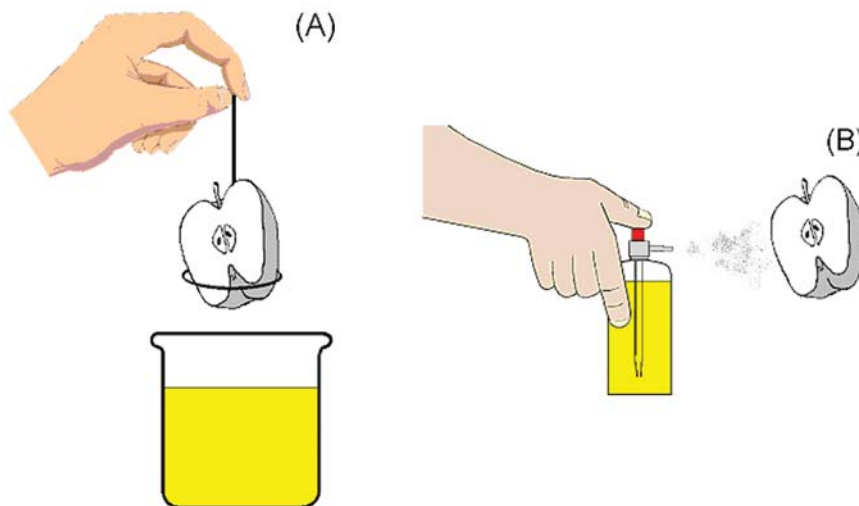


Figura 2 – Procedimentos de revestimento adotados.

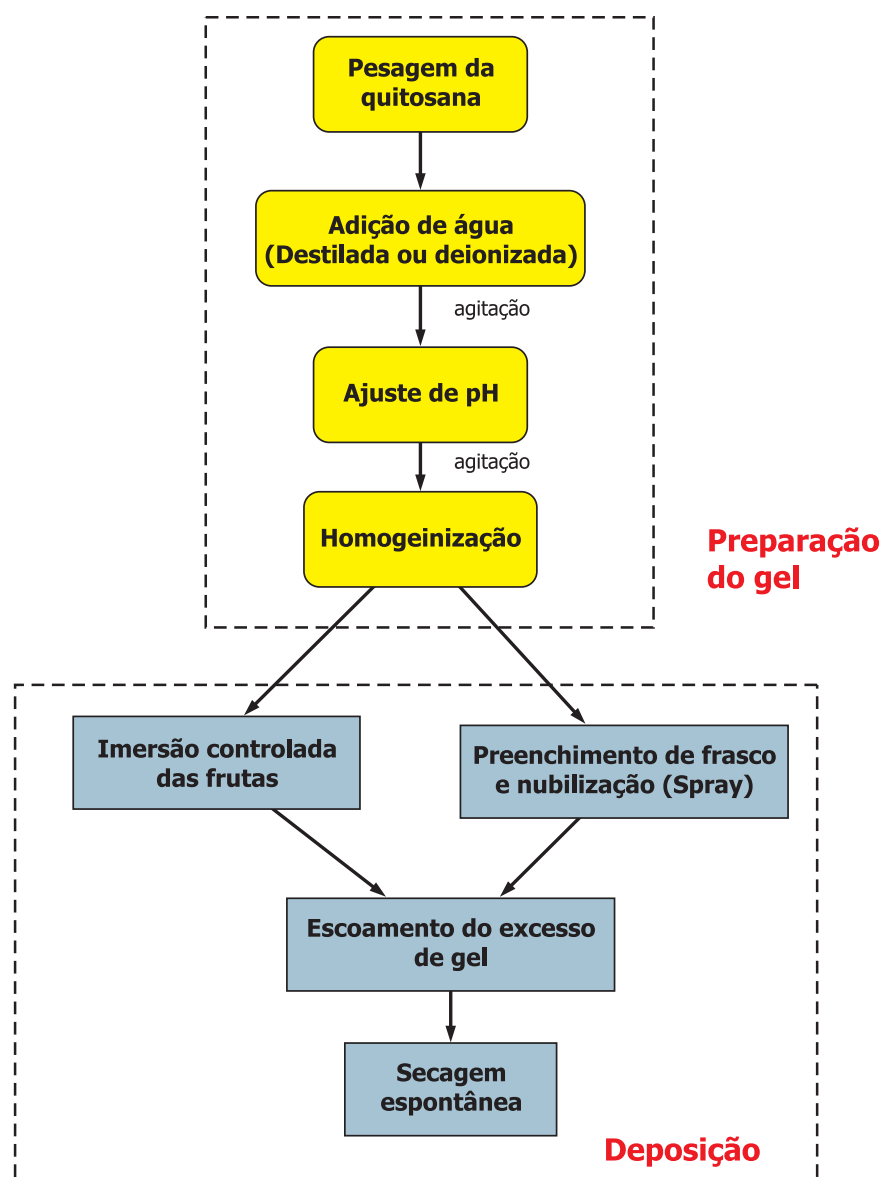


Figura 3. Seqüência empregada para processamento de gel e depósito.

sistema de pressão manual (spray). A consecução de uma nebulização perfeita e a de forma manual são dependentes, evidentemente, da viscosidade da solução empregada.

Após o escoamento do excesso de gel, foram deixadas secar em condição ambiente. A cura (polimerização) do filme dá-se espontaneamente como consequência da evaporação do solvente. A Figura 2 ilustra os procedimentos adotados, cuja seqüência está esquematizada na Figura 3.

Como resultado da aplicação, é observada uma ligeira mudança na coloração da superfície cortada, em ambos os processos, com tendência a um tom tirante a amarelo ou a verde suave. Após a secagem, os filmes

resultantes apresentam boa aderência, sendo totalmente transparentes.

As maçãs naturalmente apresentam um escurecimento superficial sob as faces cortadas, em função da ação enzimática da polifenoloxidase (PPO), em diferentes intensidades, como medido por Sapers e Douglas em 1987. Contudo, em meio ácido, que é necessário para que a quitosana se dissolva em condição não-alterada, essa reação é potencializada. No entanto, foi observado que o tempo de imersão das amostras (de 3 a 8 segundos) aparentemente não afeta a coloração final resultante. A extensão dos danos provocados pela ação ácida pode ser, em princípio, atenuada pelo uso de agentes alcalinos

que, misturados ao gel, ajustam o pH em níveis menos agressivos ou que, por alterações estruturais prévias da quitosana, que a torna solúvel em pHs mais alcalinos. Um revestimento polimérico ideal para uso em alimentos, evidentemente deve ser completamente inerte, com ausência de impacto sobre a polpa ou introdução e alteração de cores na casca ou nas demais partes do fruto.

Têm sido conduzidas análises detalhadas dos filmes, tanto por microscopia eletrônica de varredura (MEV) como por microscopia de força atômica (AFM), (Assis, et al., 1999; Assis, et al, 2002) indicando estruturas descontínuas, que caracterizam certa porosidade residual no filme formado, conforme imagens típicas apresentadas na Figura 4, obtidas por AFM (sistema TopoMetrix Discover - imagens geradas por programa SPIP 2.1 - Scanning Probe Image Processor). Os filmes apresentam espessuras variáveis, dependente da posição no fruto, mas de uma forma geral, são extremamente finos, não superiores a 1,5 μm . Como citado, coberturas totalmente densas e impermeáveis são indesejáveis para coberturas de frutos, pois é necessário que haja nos revestimentos a manutenção de uma respiração mínima.

A literatura tem mostrado que polímeros hidrofílicos, especialmente os altamente polares como a quitosana, podem, em função da umidade relativa do ar, mudar significativamente sua permeabilidade a gases. Resultados apresentados por McHugh & Krochta, em 1994, mostraram que, para uma porosidade específica, a permeação é sensivelmente reduzida com o abaixamento da concentração de água adsorvida pela película. Na realidade, a permeabilidade do filme pode ser alterada devido, não somente à umidade ambiental, mas, principalmente, pela incorporação de elementos aquosos celulares oriundos da polpa da fruta (Baldwin et al, 1996).

Características Protetoras

Com respeito à ação protetora dos revestimentos de quitosana, é observada pouca diferença como re-

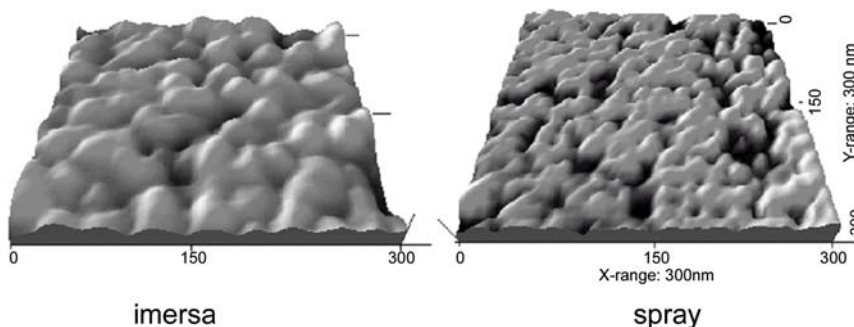


Figura 4. Imagens típicas de filmes de quitosana, obtido por microscopia de força atômica. O aspecto microscópico dos filmes formados indica estrutura descontínua com porosidade residual, mais acentuada para os revestimentos obtidos por nebulização.

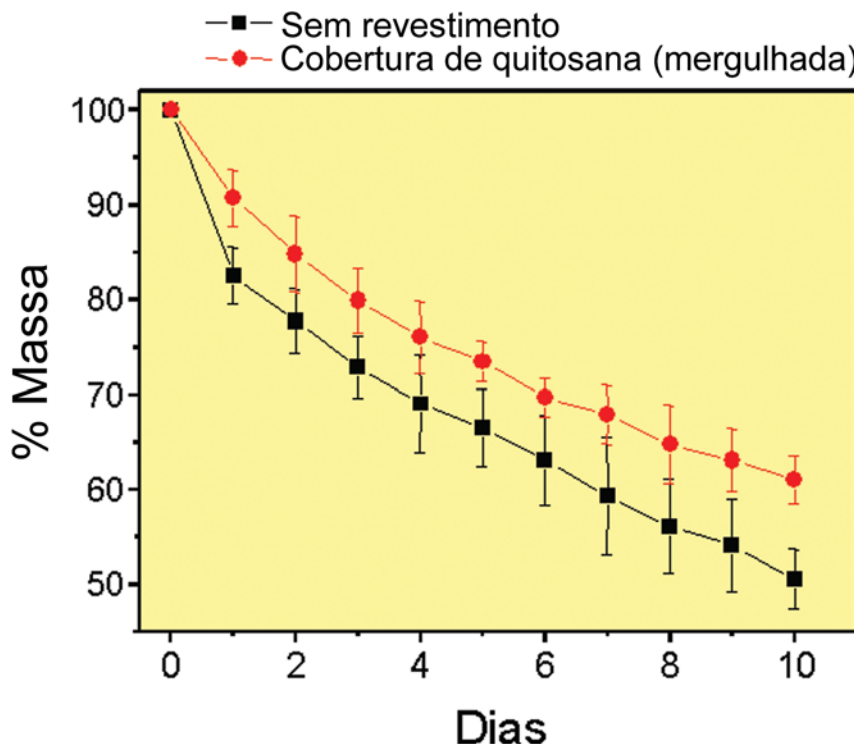
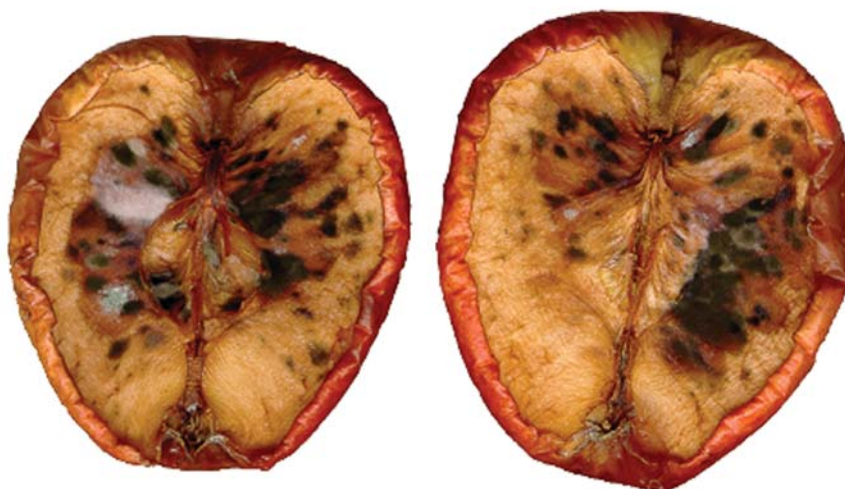


Figura 5. Perda relativa de massa em função do tempo de armazenamento em condições não controladas. Amostras fatiadas e revestidas por imersão.



Com cobertura de quitosana



Sem cobertura

Figura 6. Aspecto genérico das faces cortadas (revestidas e não-revestidas) após o oitavo dia de armazenamento.

sultado dos processos de deposição. A Figura 5 apresenta a perda de massa relativa, obtidas em amostras cobertas por imersão, para 10 dias de armazenamento em condições não controladas (temperaturas entre 25°C -30°C em ambiente com iluminação natural). Ao final desse período, temos uma preservação média de massa superior a 10% para as amostras recobertas. Os dados referem-se a medidas realizadas diariamente para valores estimados pela média de 8 amostras.

Worrell et al., (2002) demonstram que uma das principais características de um filme protetor na redução de perda de massa é o estabelecimento de uma boa diferença nos valores de pressão de vapor entre o fruto e sua vizinhança. Apesar da quitosana ser um material hidrofílico com significativa taxa de absorção de água (Assis & Silva, 2003) o efeito redutor da perda de massa é efetivo e claramente observado. Resultados similares foram coletados para as amostras revestidas por spray.

O caráter antifúngico da quitosana foi avaliado qualitativamente através do acompanhamento fotográfico de colônias espontaneamente crescidas sobre as superfícies cortadas. Embora não tenha sido realizado um acompanhamento rigoroso das culturas e das espécies de fungos, de modo geral, os filmes apresentaram boa ação antifúngica. Fica visualmente clara essa ação na comparação das maçãs revestidas com as não revestidas. Faces não recobertas apresentam proliferação de fungos a partir do quinto dia, com progressão significativa nos períodos seguintes. A Figura 6 apresenta exemplo da aparência das faces após o oitavo dia de estocagem.

O efeito fungicida da quitosana é atribuído à ação de enzimas quitonolíticas, como a quitinase, que degradam as paredes celulares dos fungos e provocam a extração de agentes antimicrobianos como a fitoalexina e a pisatina (Hirano & Nagao, 1989, Coma et al., 2002). A quitinase pertence a uma família de proteínas denominada proteínas relacionadas com a patogênese (conhecidas como proteínas de defesa) ou proteínas PR (Pathogenesis Related proteins). Essas proteínas formam um grupo estrutural e funcionalmente heterogêneo que são capazes de inibir o crescimento da hifa.

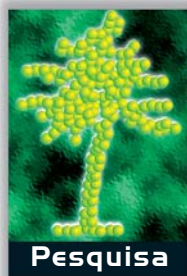
Essas atividades antifúngicas são frequentemente influenciadas pelo pH local. Estudos conduzidos por Sudarshan e colaboradores (1992) indicaram que a interação entre quitosana positivamente carregada (o que ocorre em meio ácido) e resíduos ou superfícies microbianas negativamente carregadas são fundamentais para uma efetiva ação inibitória do crescimento de microorganismos. Feng et al., 1994, também mostraram que a atividade microbiana da quitosana aumenta com o percentual de desacetilação, que, normalmente, se encontra entre 65% a 85%. Jung, et al., (1999) resumem as atividades antimicrobianas da quitosana em dois principais mecanismos: i) A natureza catiônica da quitosana, que

favorece ligações com o ácido siálico nos fosfolipídios, e conseqüentemente, restringe o movimento de substâncias microbiológicas; e ii) A penetração através da parede celular que impede a transformação do DNA em RNA. Ou seja, a atividade antimicrobiana se dá por interação dos grupos amino livres da cadeia polimérica da quitosana.

O uso de substâncias polissacarídeas abundantes e bioativas como a quitosana, que, além de atóxicas, reduzem a maturação e atuam ou induzem defesas a microorganismos, são potencialmente interessantes para aplicações em biotecnologia e merecem ser mais bem avaliadas como potencial material para revestimentos comestíveis de uso genérico.

Referências

- ASSIS, O.B.G., ALVES, H.C. (2002) Metodologia Mínima Para a Produção de Filmes comestíveis de quitosanas e avaliação preliminar de seu uso como revestimento protetor em maçãs cortadas. Comunicado Técnico – Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP., 5p.
- ASSIS, O.B.G., PESSOA, J.D.C. (2003) Chitosan thin-film preparation for use as edible and fungi growth inhibitor coating on sliced fruits. Submetido ao Brazilian J. of Food Tech.
- ASSIS O B. G., SILVA, V. L. (2003) Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecn.*, **13**[4] p.223-228.
- ASSIS O. B. G., VIEIRA, D. C., BERNARDES-FILHO R., CAMPANA-FILHO, S. P. (2002) AFM characterization of chitosan self-assembled films. *Intern. J. Polymeric Mat.*, **51**[7] p. 633-638.
- ASSIS, O. B. G., VIEIRA, D.C., BERNARDES-FILHO, R. (1999) Surface Evaluation of Self-Assembled Multilayered Organic Films by AFM. *SCANNING - J. Scanning Microscopy*, **21**[2] p. 71-72.
- BALDWIN, E.A., NISPEROS-CARRIEDO, M.O., (1995) Baker, R.A. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, **30**[1] p 35-38
- BALDWIN, E. A., NISPEROS, M. O., CHEN, X.; HAGENMAIER, R. D. (1996) Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Tech.*, **9** p. 151-163.
- CAMPANA-FILHO, S. P., DESBRIÈRES, J. (2000) Chitin, chitosan and derivatives. in *Natural polymers and agrofibers composites*. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária., p. 41-71.
- CLEMENTE, E.S. (1999) O Mercado de vegetais minimamente processados. Seminário sobre hortaliças minimamente processadas. ESALQ-USP, Piracicaba, SP.
- COMA, V., MARTIAL-GROS, A., GARREAU, S.; COPINET, A., SALIN, F., DESCHAMPS, A. (2002) Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *J. Food Sci.*, **67** [3], p. 1162-1169.
- DONHWE, G., FENNEMA, O. (1994) Edible Filmes and Coatings: Characteristics, Formation, Definitions and Testing Methods, in *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, (Krochta et al., eds), Technomic Publ. Co., Lancaster, PA, p.1-24.
- FARES, C.B., NANTES, J.F.D. (2001) Transações comerciais entre a indústria de vegetais minimamente processados e o setor varejista. In IV Congresso Internacional de Economia e Gestão de Redes Agroalimentares.
- FENG, S.W., LI, C.F., SHIH, D.Y.C. (1994) Antifungal activity of Chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *J. of Food Prot.*, **61** p.136-140.
- HARDENBURG, R.E. (1967) Wax and related coatings for horticultural products. A bibliography. *Agr. Res. Bulletin* 51-15. US. Dept of Agriculture. Washington, DC.
- HIRANO, D., NAGAO, N. (1989) Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agr. Biol. and Chem.*, **53** p. 3065-3071.
- JUNG, B.O., KIM, C.O., CHOI, K.K., LEE, Y.M., KIM, J.J. (1999) Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *J. Appl. Polym. Sci.*, **72** p. 1713-1719.
- MCHUGH, T. H., KROCHTA, J. M. Permeability properties of edible films. In: *Edible coatings and films to improve food quality*. (Kochta, J. M. et al. Eds.). Lancaster: Technomic Publishing, 1994. p. 139-187.
- NASSU, R. T., LIMA, J. R., SOUZA-FILHO, M.S.M. (2001) Consumer's acceptance of fresh and combined methods processed melon, mango and cashew apple. *Revista Bras. de Fruticultura*, **23**[3] p. 551-554.
- NO, H. K., PARJ, N. Y., LEE, S. H., MEYERS, S. P. (2002) Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. *Intern. J. Food Microbiology*, **74** p. 65-72.
- SAPERS, G.M., DOUGLAS, F.W. (1987) Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in juice of raw apple and pear fruits. *J. Food Sci.*, **52** p.1258-1262.
- SHAHIDI, F., ARACHCHI, J. K. V., JEON, Y.J. (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Sci. Tech.*, **10** p. 37-51.
- SIGNINI, R., CAMPANA-FILHO, S.P. (1998) Purificação e caracterização de quitosana comercial. *Polímeros: Ciência e Tecn.*, **8** [4] p. 63-68.
- SUDHARSHAN, N.R., HOOVER, D.G., KNORR, D. (1992) Antibacterial action of chitosan. *Food Biotech.*, **6** p.257-272.
- WILEY, R.C. (1997) Métodos de conservación de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. In: *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. (Wiley, R. C. Ed.). Zaragoza: Editorial Acribia, p.65-129.
- WORRELL, D.B., CARRINGTON, C.M.S., HUBER, D.J. (2002) The use of low temperature and coating to maintain storage quality of breadfruit, *Artocarpus altilis* (Parks.) Fosb. *Postharvest Biology and Techn.*, **25** p. 33-40.



Bactérias Produtoras de Biossurfactantes

Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo

Ester Ribeiro Gouveia

Departamento de Antibióticos – UFPE
Doutora em Engenharia Química.
ester.gouveia@bol.com.br

Danielle Patrice Alexandre Lima

Departamento de Antibióticos – UFPE
Bacharel em Ciências Biológicas.
daniellepatrice3@hotmail.com

Maria do Socorro Duarte

Departamento de Antibióticos – UFPE
Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos.
msocorrodda@bol.com.br

Gláucia Manoella de Souza Lima

Departamento de Antibióticos – UFPE
Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos.
gmslima@yahoo.com.br

Janete Magali de Araújo

Departamento de Antibióticos – UFPE
Dr^a Prof^a adjunta da UFPE.
janetemagali@yahoo.com.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Resumo

Os biossurfactantes são moléculas produzidas por bactérias, fungos ou leveduras, que apresentam propriedades biológicas aplicáveis a várias indústrias, tais como, a indústria farmacêutica, de cosméticos, de petróleo e de alimentos. Estes compostos, nos últimos anos, têm recebido atenção especial devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e conseqüente aceitabilidade ecológica. Os biossurfactantes são classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, biossurfactantes poliméricos, fosfolipídeos e ácidos graxos. Dentre os glicolipídeos, os mais estudados são os raminolipídeos, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Este trabalho teve como objetivo a produção de biossurfactantes raminolipídico por bactérias isoladas de poços de petróleo. Inicialmente, 40 bactérias isoladas de poços de petróleo no Canto do Amaro/RN foram isoladas e caracterizadas como produtoras ou não de raminolipídeos, utilizando-se um ensaio primário semiquantitativo. Destas bactérias, 13 deram resultado positivo e foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, com exceção de duas bactérias, que foram identificadas apenas como *Pseudomonas*. Na segunda etapa foram realizados cultivos em frascos agitados com meio de cultura contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono. O glicerol foi uma fonte mais apropriada, com produtividade de raminose maior que aquela encontrada na literatura utilizando o mesmo meio e outra linhagem isolada de outro local. Na etapa seguinte, foram realiza-

dos experimentos de degradação de petróleo bruto pelas 13 bactérias. Estes resultados mostraram o potencial destas linhagens em produzir biossurfactantes raminolipídico, utilizando petróleo bruto como fonte de carbono o que apresenta ser de grande importância para a biorremediação de áreas contaminadas por derramamento de petróleo.

1. Introdução

Os surfactantes compreendem uma classe importante de compostos químicos muito utilizados em diversos setores industriais, uma vez que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos, apresentando baixa solubilidade em água. A importância comercial dos surfactantes torna-se evidente a partir da tendência do mercado que vem aumentando sua produção em decorrência da diversidade de aplicações industriais.

Os surfactantes possuem estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro emulsões, ação espumante ou antiespumante, solubilidade e detergência. Um dos índices mais utilizados para avaliação desta atividade surfactante é a concentração de micelas críticas (CMC) que é a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a mais baixa tensão superficial ou interfacial (Lin, 1996). A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC que varia de 1 a 2000 mg/l, enquanto que a efetividade está relacionada com as

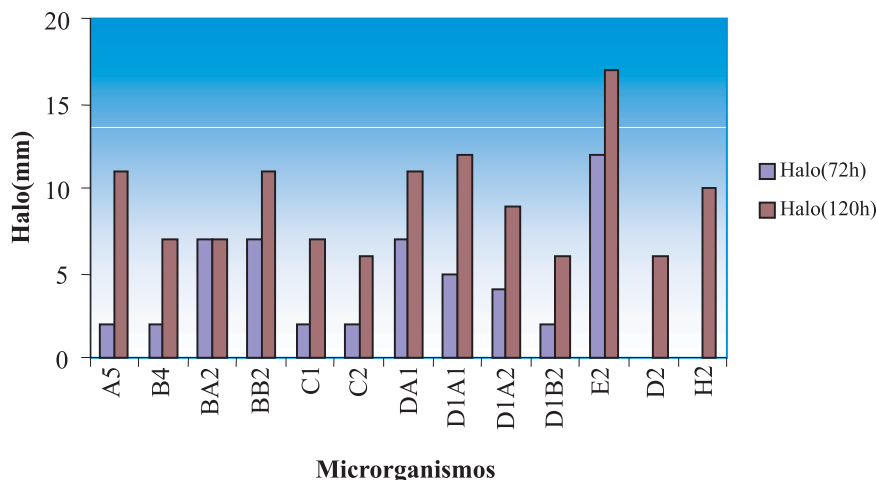


Figura 1. Diâmetro dos halos azuis das bactérias caracterizadas como produtoras de raminolipídeo.

tensões superficiais e interfaciais as quais devem atingir valores menores que 30 e 1 mN/m, respectivamente (Muligan, 1993).

Um outro parâmetro muito utilizado para avaliar o comportamento do surfactante é o valor do balanço hidrofílico - lipofílico (HLB). Segundo Parkinsom (1985) surfactantes com HLB menor que 6 são mais solúveis na fase oleosa, enquanto valores entre 10 e 18 exibem características opostas (Desai e Banat, 1997). A adição de um bom surfactante na água pode diminuir a tensão superficial e interfacial a 20°C de 72 para 30 mN/m (Kosaric, 1996).

Os surfactantes são aplicados em áreas como agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, na indústria alimentícia como aditivo em condimentos, nas indústrias farmacêuticas, têxtil e cosmética (Yamane, 1987; Lin *et al.*, 1993; Shephord *et al.*, 1995). Entretanto, o maior mercado para os surfactantes é na indústria petrolífera, onde são amplamente utilizados para a recuperação terciária do petróleo (MEOR - Microbial Enhanced Oil Recovery), como na

remoção e mobilização de resíduos de óleo e biorremediação (Desai e Banat, 1997; Ron e Rosenberg, 2002).

Surfactantes microbianos ou biosurfactantes são metabólitos microbianos de superfície ativa, que apresentam moléculas com porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Estas propriedades promovem a redução da tensão superficial e interfacial, conferindo a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (Desai e Banat, 1997). A porção hidrofílica é constituída por grupamentos aniônicos, catiônicos, não-aniônicos ou anfóteros, enquanto que, a parte hidrofóbica, geralmente é um hidrocarboneto linear ou ramificado apresentando ou não duplas ligações e/ou grupos aromáticos (Georgiou *et al.*, 1992). Os surfactantes microbianos são produzidos principalmente por bactérias, embora fungos e leveduras também os produzam (Fiechter, 1992).

A maioria dos surfactantes utilizados comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo.

Entretanto, nos últimos anos o interesse por surfactantes de origem microbiana tem aumentado significativamente em decorrência de serem naturalmente biodegradáveis diminuindo assim o impacto ambiental (Makkar e Cameotra, 2002). Os biosurfactantes apresentam inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como, baixa toxicidade, tolerância à temperatura, pH e força iônica, além de serem biodegradáveis na água e no solo (Lin, 1996).

Segundo Georgiou *et al.* (1992), uma grande variedade de microrganismos produz biosurfactantes, sendo que o tipo, a quantidade e a qualidade do biosurfactante são influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons como P, N, Mg, O₂, e Fe⁻ no meio de cultura, além das condições de cultivo.

Os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar, enquanto que os biosurfactantes são diferenciados por sua natureza bioquímica e pela espécie microbiana produtora (Desai & Desai, 1993). As principais classes incluem os glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, biosurfactantes poliméricos, fosfolipídeos e ácidos graxos (Georgiou *et al.*, 1992; Desai e Banat, 1997).

Uma ampla diversidade de biosurfactantes de origem microbiana pode ser observada na Tabela 1.

A classe dos glicolipídeos compreende um grupo dos mais conhecidos e estudados, apresentando longas cadeias de ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos. Nesta classe destacam-se os raminolipídeos, trealolipídeos e soforolipídeos (Reis, 1998).

Os raminolipídeos são formados por uma ou duas moléculas de raminose, ligadas a uma ou duas moléculas de ácido b-hidroxidecanóico (Desai e Banat, 1997). Foram isolados pela primeira vez por Bergstrom *et al.* (1946) de *Pseudomonas pyocyanea*. Posteriormente, Jarvis e Johnson em 1949 mostraram uma ligação glicosídica de b-hidroxidecanoil-b-hidroxidecanoato com duas moléculas de raminose em cultivo de *P. aeruginosa* com 3% (v/v) de glicerol.

Os raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas* spp. têm a capacidade de diminuir a tensão interfacial

Tabela 1- Diversidade de surfactantes de origem microbiana (Mulligan *et al.*, 2001).

Microrganismos	Biosurfactantes
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptídeo
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina
<i>Bacillus sp.</i>	Raminolipídeo
<i>Candida bombicol</i>	Soforolipídeo
<i>Candida lipolytica</i> Y-917	Soforolipídeo
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Fosfolipídeo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Raminolipídeo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeo
<i>Rhodococcus sp.</i>	Glicolipídeo

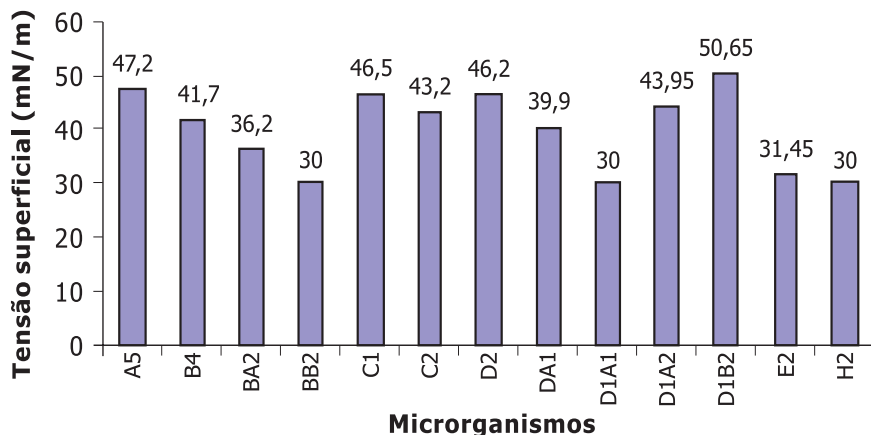


Figura 2. Tensão superficial obtida durante cultivo em frascos agitados em meio MLR contendo glicose como fonte de carbono.

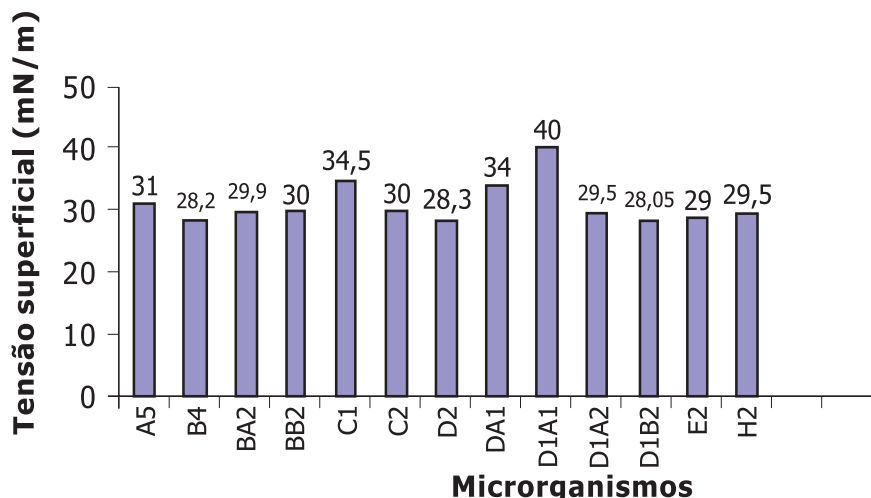


Figura 3. Tensão superficial obtida durante cultivo em frascos agitados em meio MG contendo glicerol como fonte de carbono.

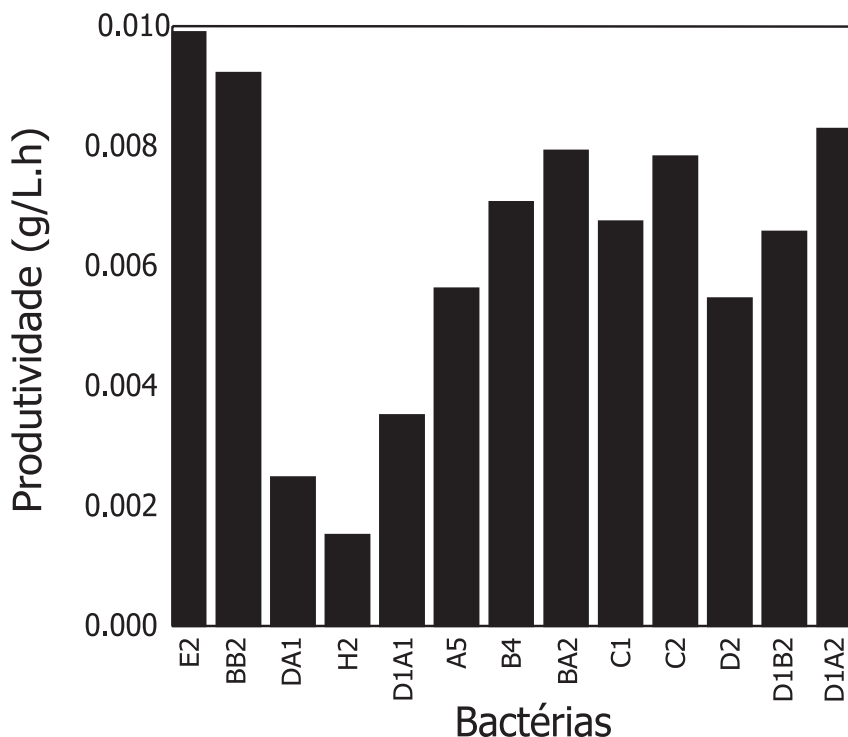


Figura 4. Produtividade em raminose obtidas durante as fermentações com as 13 bactérias produtoras de raminolipídeos.

contra n-hexadecano para 1 mN/m e a tensão superficial para 25 a 30 mN/m (Lang e Wagner, 1987). Além de reduzirem a tensão superficial, estabilizam emulsões e são geralmente atóxicos e biodegradáveis (Banat *et al.*, 2000). Estes biossurfactantes também são uma fonte de L-raminose, usada na produção de condimentos de alta qualidade e também como matéria-prima para a síntese de alguns compostos orgânicos (Linhardt *et al.*, 1989).

Embora o potencial de produção seja determinado pela genética do microrganismo, outros fatores como as condições ambientais e a natureza do substrato também influenciam no nível de expressão (Rahman *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* pode utilizar substratos como alcanos, piruvato, glicerol, succinato, frutose, óleo de oliva, glicose e manitol para produzir raminolipídeos (Mulligan *et al.*, 2001).

Em decorrência da importância dos biossurfactantes, este trabalho teve como objetivo investigar a produção destes compostos por bactérias isoladas de poços de petróleo.

2. Materiais e Métodos

Microrganismos

Foram utilizadas 40 bactérias, 20 Gram-positivas e 20 Gram-negativas, pertencentes à coleção de culturas de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE), isoladas de poços de petróleo de Canto do Amaro/Mossoró/RN (Tabela 2).

Meios de Cultura

A manutenção das bactérias Gram-negativas foi realizada em meio de cultura MPK (King *et al.*, 1954) e das bactérias Gram-positivas em meio Triptona de Soja Ágar - TSA, que contém (em g/l): Trypticase - 15; NaCl - 5; Peptona de soja - 5; Ágar - 15 e pH 7,0.

Na seleção primária de bactérias como produtoras de raminolipídeos foi utilizado o meio MMR como proposto por Siegmund e Wagner (1991).

A investigação sobre a biodegradação de hidrocarbonetos foi realizada utilizando-se o meio mineral Buchnell e Haas (BH), adicionado de petróleo como fonte de carbono.

Tabela 2. Relação das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas de poços de petróleo do Canto do Amaro (RN) e utilizadas neste trabalho.

Bactérias Gram-negativas			Bactérias Gram-positivas		
N.º da Coleção DAUFPE*	Poços de Origem	Código	N.º da Coleção DAUFPE*	Poços de Origem	Código
509	AP-29	G4	511	AP-29	H2
568	AP-44	DB1	522	AP-29	1B
569	AP-44	D1A1	523	AP-29	1C
570	AP-44	BA2	529	AP-29	21
571	AP-44	D1A2	530	AP-29	6
572	AP-44	BB2	532	AP-29	18
573	AP-44	DA1	534	AP-29	9B
574	AP-44	D1B1	535	AP-29	24A
575	AP-44	D1B2	539	AP-29	13A
592	AP-44	17C	540	AP-29	13B
602	AP-44	25B	544	AP-29	14
610	AP-194	A5	545	AP-29	25
611	AP-194	B4	580	AP-44	23B
612	AP-194	C1	588	AP-44	6B
613	AP-194	C2	589	AP-44	6C
614	AP-194	D2	596	AP-44	24
615	AP-194	E2	598	AP-44	29B
618	AP-194	A5 (SAB)	599	AP-44	14A
621	AP-194	D4	601	AP-44	25A
528	AP-29	5C	603	AP-44	25C

* DAUFPE: Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Para a produção de raminolipídeos tendo glicerol como fonte de carbono foi utilizado o meio descrito por Santa Anna *et al.* (2002). O meio descrito por Abu-Ruwaida *et al.* (1991) foi utilizado quando glicose foi a fonte de carbono.

Seleção Primária para Caracterização das Bactérias como Produtoras de Biosurfactante Raminolipídico

Neste ensaio semiquantitativo, segundo a metodologia descrita por Sigmund e Wagner (1991), o raminolipídeo aniônico forma um par iônico insolúvel com o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), na presença de azul de metileno, formando um halo azul escuro em volta da colônia.

Um volume de 3 µl de suspensão de bactéria a 10⁹ Unidades Formadoras de Colônias por ml (UFC/ml), de cada linhagem, foi inoculada em meio sólido contendo CTAB e azul de metileno. Em seguida as placas foram cultivadas a 30°C por 120 horas.

Identificação das Bactérias

As bactérias Gram-negativas, inicialmente selecionadas como produtoras de raminolipídeos, foram iden-

tificadas através das características bioquímicas, com a utilização do Kit Bac Tray III específico para bactérias Gram-negativas (Difco).

Cultivos em Frascos Agitados

A investigação da produção de biosurfactantes raminolipídicos foi realizada através de cultivos em mesa incubadora rotativa. Inicialmente as bactérias foram cultivadas em meio sólido MPK a 30°C. Após 24 horas, foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio de produção e incubadas sob agitação, a 30°C, 250 rpm durante 24 horas. Após este período, 2 ml de cada bactéria foi inoculado em 48 ml do meio de produção, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml a incubação foi realizada nas mesmas condições da etapa anterior. Durante os cultivos foram retiradas amostras em intervalos de 24 horas, as quais foram centrifugadas a 11.000 rpm durante 5 minutos e submetidas às seguintes análises:

- Tensão superficial - a tensão superficial do caldo livre de células foi medida usando um tensiômetro CSC-Du Nouy (705) à temperatura ambiente;
- Concentração de raminose - a

quantificação de raminolipídeos expressa em raminose, foi avaliada pelo método colorimétrico do fenol ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956);

c) Concentração de biomassa – um volume conhecido da amostra foi centrifugado em tubos de eppendorfs (pesados previamente – P1) a 11000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido para análises posteriores e os tubos de eppendorfs contendo a biomassa foram colocados em estufa a 80°C. Após 24 horas, os tubos foram pesados (P2). A concentração de biomassa expressa em g.l⁻¹ foi obtida pela equação: (P₂-P₁)/V(L), onde V foi o volume centrifugado em litro.

Degradação de Petróleo

No ensaio de degradação de petróleo foi utilizada a metodologia de Brown e Braddock (1990) modificada, uma vez que no presente trabalho o ensaio foi realizado em tubos e a concentração de raminose foi determinada. Os tubos de ensaio continham o meio BH, o inóculo e o petróleo bruto. O tubo controle negativo não continha inóculo. Todos os tubos foram incubados a 30°C por 20 dias.

Tabela 3. Produtividade em raminose e redução da tensão superficial obtida durante as fermentações com as 13 bactérias caracterizadas como produtoras de raminolipídeos.

Bactérias selecionadas na seleção primária	Produtividade em Raminose(g/l)	Tensão Superficial Inicial(mN/m)	Tensão Superficial Final (mN/m)	Redução da Tensão Superficial (%)
<i>Pseudomonas sp.</i> 615-E2	0,0099	40,00	29,00	27,50
<i>P. aeruginosa</i> -572-BB2	0,0092	35,50	30,00	15,50
<i>P. aeruginosa</i> -571-D1A2	0,0083	33,55	29,80	11,18
<i>Pseudomonas sp.</i> 570-BA2	0,0079	37,00	29,45	20,41
<i>P. aeruginosa</i> -613-C2	0,0078	37,50	30,00	20,00
<i>P. aeruginosa</i> -611-B4	0,0071	36,25	28,20	22,21
<i>P. aeruginosa</i> -612-C1	0,0068	44,65	34,05	23,74
<i>P. aeruginosa</i> -575-D1B2	0,0066	33,2	28,7	13,55
<i>P. aeruginosa</i> 610-A5	0,0056	40,00	38,50	3,75
<i>P. aeruginosa</i> -614-D2	0,0055	45,30	28,30	37,53
<i>P. aeruginosa</i> -569-D1A1	0,0035	41,00	40,00	2,45
<i>P. aeruginosa</i> -573-DA1	0,0025	39,50	35,00	11,40
<i>Bacillus sp.</i> -511-H2	0,00015	35,00	30,00	14,29

Tabela 4. Resultados dos ensaios de degradação de petróleo pelas 13 bactérias selecionadas inicialmente como produtoras de biossurfactantes raminolipídico.

Nº da coleçãoDAUFPE	Código	Degradação de petróleo bruto
610	A5	++
611	B4	+++
570	BA2	++
572	BB2	++
612	C1	+++
613	C2	+++
614	D2	+++
573	DA1	+++
569	D1A1	++
571	D1A2	+++
575	D1B2	+++
615	E2	+++
511	H2	++

++ Degradação parcial; +++ Degradação total

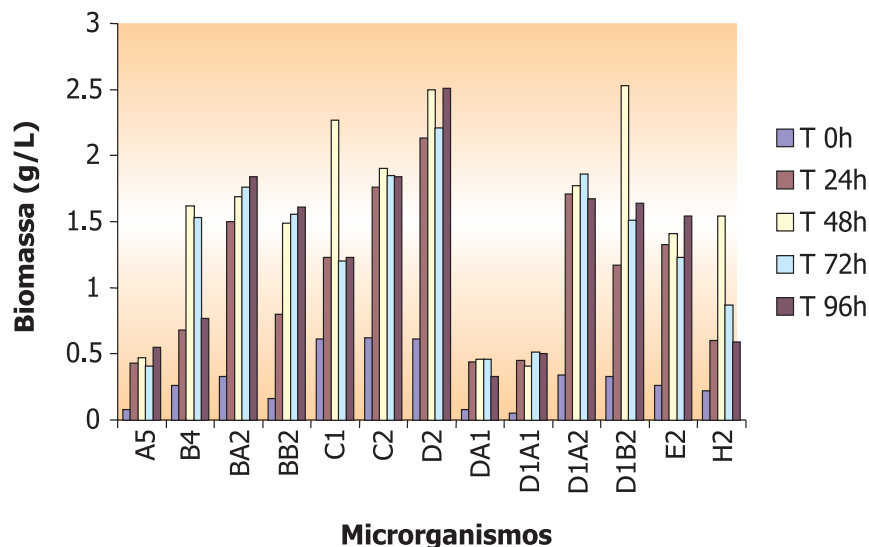


Figura 5. Biomassa obtida durante os cultivos em frascos agitados em meio MG contendo glicerol como fonte de carbono.

3. Resultados e Discussão

Caracterização das Bactérias Isoladas de Poços de Petróleo

Na seleção primária das bactérias para a caracterização como produtoras de biossurfactantes raminolipídicos, 27,5% (11) das bactérias Gram-negativas deram resultados positivos após 72 horas de cultivo (Figura 1).

Das 20 bactérias Gram-positivas utilizadas, apenas a linhagem DAUFPE-511 (H2) foi caracterizada como produtora de biossurfactante raminolipídico. Por outro lado, das 20 linhagens Gram-negativas, 12 (60%) exibiram a formação de halo azul nessa seleção primária.

A identificação bioquímica das 12 bactérias Gram-negativas permitiu o conhecimento da espécie. Com exceção das bactérias *Pseudomonas sp.* 570-BA2, e *Pseudomonas sp.* 615-E2, todas foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*.

Produção de Biossurfactantes Raminolipídico em Frascos Agitados

A partir da seleção primária, as 13 linhagens positivas para raminolipídeo foram utilizadas para a investigação da produção deste biossurfactante em meios líquidos contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono.

Uma vez que os biossurfactantes podem ser produzidos em substratos solúveis em água, inicialmente, as 13 bactérias foram cultivadas em meio

MLR, contendo glicose como fonte de carbono e tensão superficial de 58mN/m. Nos resultados apresentados na Figura 2, a tensão superficial alcançou o valor mínimo de 30mN/m para as bactérias BB2, D1A1 e H2.

Na Figura 3 podem ser observadas as tensões superficiais obtidas durante o cultivo em frascos agitados em meio MG contendo glicerol como fonte de carbono. Estes resultados comparados com aqueles obtidos com o meio MRL (Figura 2) indicam o glicerol como uma fonte de carbono mais apropriada para a produção de raminolípido do que a glicose. A análise destes resultados indica que estas linhagens se destacam como boas produtoras de raminolípido quando a fonte de carbono é glicerol, corroborando com os resultados obtidos por Mulligan e Gibbs (1989), os quais comprovaram que a composição do meio de cultura influencia diretamente na produção do biossurfactante.

Com relação à quantificação da raminose, apenas as amostras dos ensaios com o meio MG foram utilizadas. A Figura 4 apresenta os valores de produtividade em raminose obtidos durante as fermentações com as 13 bactérias produtoras de raminolípido em meio MG. A produtividade em raminose foi calculada considerando o maior valor de concentração dividido pelo respectivo tempo, sendo o tempo de produção máxima entre 72 e 96 horas de cultivo.

Os maiores valores foram observados para as bactérias *Pseudomonas* sp. 615-E2, *P. aeruginosa*-572-BB2, *Pseudomonas* sp. 570-BA2, *P. aeruginosa*-613-C2 e *P. aeruginosa*-571-D1A2. Todas estas bactérias produziram valores superiores a 0,007g/l.h. A produtividade obtida por Santa Anna *et al.* (2002) utilizando o mesmo meio de cultura e *Pseudomonas aeruginosa* PA1 foi de 0,0069g/l.h. Valores superiores de produtividade são geralmente obtidos em cultivos em batelada alimentada. Rahman *et al.* (2002) obtiveram produtividade maior que 0,03g/l.h quando foram adicionados óleo de soja ou glicerol após 46, 144 e 192 horas, em cultivos com *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129.

A Tabela 3 apresenta os valores de tensão superficial e de produtividade em raminose obtidos nos ensaios com o meio MG. Observa-se nesta Tabela que nem sempre os maiores valores de concentração de raminose

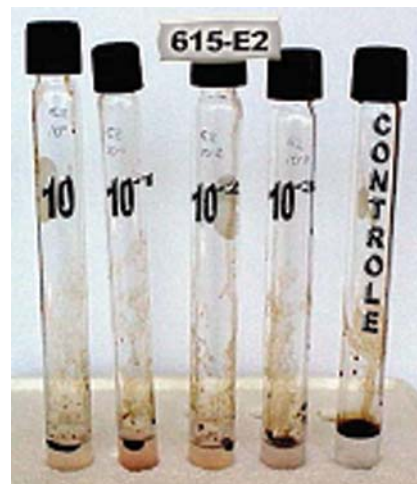
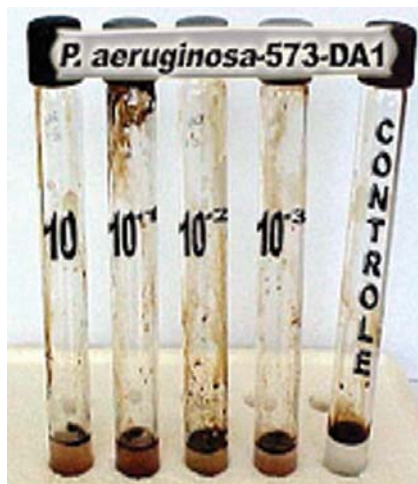


Figura 6. Aspecto macroscópico de degradação do petróleo pelas bactérias *P. aeruginosa* 573-DA1 e *Pseudomonas* sp. 615-E2.

correspondem aos menores valores de tensão superficial, indicando a importância de quantificar a produção de raminolípido. A medida da tensão superficial serve apenas como uma medida indireta da produção de biossurfactantes.

Santa Anna *et al.* (2002) também observaram que quando utilizaram óleo parafínico como fonte de carbono para a produção de raminolídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1, a redução da tensão superficial foi de apenas 4,4%, sendo produzido 260 mg/l; por outro lado, quando a fonte de carbono foi n-hexadecano, a redução da tensão foi de 47,4% e a concentração de raminose igual a 130 mg/l.

Conforme a Tabela 3, as linhagens 611-B4, 575-D1B2 e 614-D2 apresentaram os menores valores de tensão superficial, 28,2; 28,7 e 28,3 mN/m, respectivamente. Segundo Desai e Banat (1997), a tensão superficial durante a produção de raminolídeos por *P. aeruginosa* pode chegar a 29 mN/m, de forma que os valores mínimos de tensão superficial encontrados no presente trabalho são similares aos relatados na literatura.

A maioria das bactérias apresentou crescimento máximo com 48 horas de cultivo, sendo a maior concentração de biomassa observada (Figura 5) para a linhagem *P. aeruginosa*-575-D1B2, que alcançou 2,53 g/l. Con-

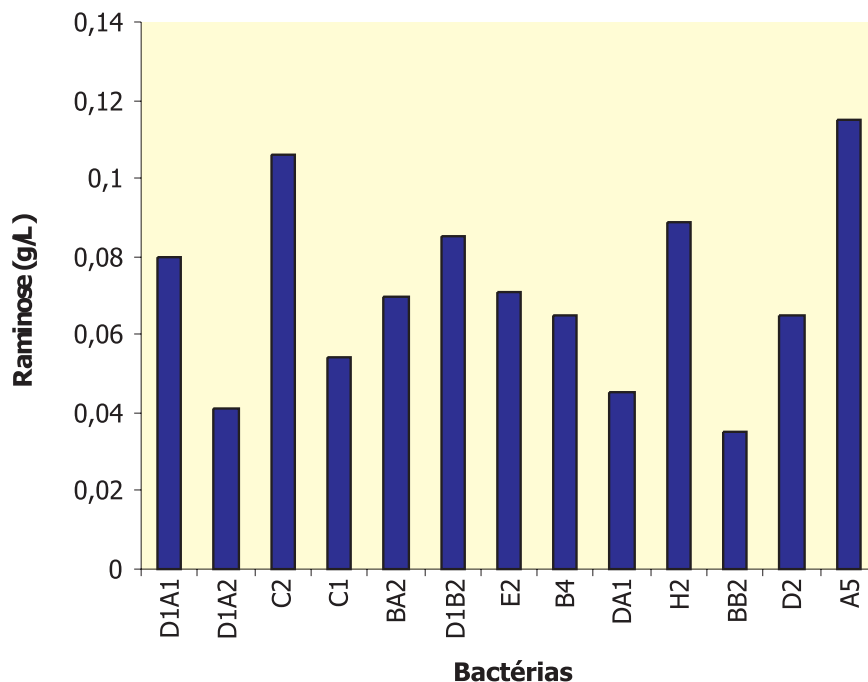


Figura 7. Produção de biossurfactante raminolípido produzido pelas 13 bactérias em meio mineral BH contendo petróleo.

centração de biomassa maior que 5g/l foi encontrado na literatura apenas quando glicerol foi adicionado após a fase exponencial de crescimento durante fermentação com *P. aeruginosa* em meio contendo glicose como fonte de carbono (Rahman *et al.*, 2002).

A produção de biosurfactante raminolipídico foi não associada ao crescimento, tendo em vista que sua concentração máxima foi obtida durante a fase estacionária de crescimento, típico de um metabólito secundário. Outros autores também observaram produção de raminolipídeos na fase estacionária (Ron e Rosenberg, 2002; Santa Anna *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2002).

Experimentos para a Degradação de Petróleo

As 13 linhagens caracterizadas como produtoras de biosurfactantes raminolipídico foram utilizadas nos ensaios de degradação de petróleo. O petróleo foi totalmente ou parcialmente degradado como podem ser observados na Figura 6 e na Tabela 4, pelo desaparecimento e emulsificação do óleo.

Para confirmar se durante a degradação do petróleo ocorreu a produção do biosurfactante raminolipídico foi determinada a concentração de raminose. De acordo com os resultados apresentados na Figura 7, as bactérias produziram biosurfactante raminolipídico. Nestes resultados vê-se o potencial destas linhagens em produzir biosurfactantes raminolipídico, utilizando petróleo bruto como fonte de carbono, o que apresenta ser de grande importância para a biorremediação de áreas contaminadas por derramamento de petróleo. Segundo Rahman *et al.* (2003), bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, produzem raminolipídeo pela utilizando hidrocarbonetos.

A importância de determinar a concentração de raminose consistiu no fato de que a análise visual apresentada na Tabela 4 não concorda com os resultados apresentados na Figura 7, para todas as bactérias investigadas. A bactéria *P. aeruginosa* 610-A5, por exemplo, apresentou resultado visual parcial e um dos maiores valores de concentração de raminose. Brown e Braddock (1990) não determinaram a concentração de

raminose, apresentando apenas o resultado visual.

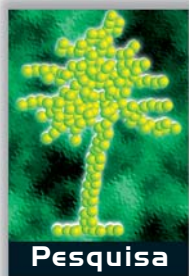
Das 40 bactérias isoladas de diferentes poços de petróleo, 13, sendo 12 Gram-negativas e 1 Gram-positiva, foram caracterizadas como produtoras de biosurfactantes raminolipídico tanto utilizando glicerol, como petróleo bruto, como fonte de carbono.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa) pelo apoio financeiro recebido.

4. Referências Bibliográficas

- BANAT, I.M.; MAKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BROWN, E.J.; BRADDOCK, J.F. Sheen screen, a miniaturized most-probable-number method for enumeration of oil-degrading microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3895-3896, 1990.
- DESAI, A. J.; BANAT, I.M. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. **Current Science**, v. 57, p. 500-501, 1997.
- DUBOIS, M., K.A. GILLES, HAMILTON, J.K., REBERS. AND SMITH, FRED Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Tibtech**, v. 10, p. 208 – 217, 1992.
- GEORGIOU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.
- JARVIS, F.G.; JONSON, M.J. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal American Chemical Society**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.
- KING, E.O., WARD, M.K. E RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **J. Lab. Clin. Med.** v. 44, p. 301, 1954.
- KOSARIC, N. Biosurfactants. In: RHEN, H.J.; REED, G. (eds). **Biotechnology**, cap. 17, 1996.
- LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (eds). **Biosurfactant and Biotechnology**, p. 21-47, 1987.
- LIN, S.C.; SHARMA, M.M.; GEORGIOU, G. Production and deactivation of biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnology Program**, v. 9, p. 138-145, 1993.
- LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnology Bioeng.** v. 33, p. 365-368, 1989.
- MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 58, p. 428-34, 2002.
- RAHMAN, K.S.; RAHMAN, T.J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R., BANAT, I.M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology. Program**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.
- REIS, F.A.S.L. **Estudo da síntese de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC6633**. 1998. 107f. Dissertação de Mestrado (em tecnologia de processos químicos e bioquímicos), Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.
- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249-252, 2002.
- SHEPHORD, R.; ROCKEY, J.; SHUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, n. 40, p. 316-320, 1995.
- SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids exerted by *Pseudomonas* species grown on mineral agar. **Biotechnology Letters**, v. 95, p. 95-100, 1993.
- YAMANE, T. Enzyme technology for the lipid industry: na engineering overview. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 64, p. 1657-1662, 1987.



Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais

Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites em espécies vegetais tropicais

Glaucia Salles Cortopassi Buso, Dra.

Pesquisadora do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF
buso@cenargen.embrapa.br

Ana Yamaguishi Ciampi, Dra.

Pesquisadora do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF
aciampi@cenargen.embrapa.br

Marcio de Carvalho Moretzsohn, M.Sc.

Pesquisador do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF
marciocm@cenargen.embrapa.br

Zilneide Pedrosa de Souza Amaral

Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF
zilneide@cenargen.embrapa.br

Rosana Vianello Brondani, Dra.

Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia-GO
rosanavc@cnpaf.embrapa.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Introdução

Marcadores moleculares podem ser derivados de qualquer tipo de dado molecular que forneça um polimorfismo detectável entre os organismos a serem comparados. Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética com as mais diversas finalidades, tais como identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos. Devido ao desenvolvimento nos campos da biologia molecular e genética, uma grande variedade de técnicas para analisar polimorfismos genéticos tem sido disponibilizada. Esses marcadores podem diferir com respeito a características importantes como abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro.

Uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismos entre seqüências de DNA é SSR ("Simple Sequence Repeats") ou microsatélites (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989). Essa técnica baseia-se no uso de pares de primers na reação de PCR para detectar variações em locos de seqüências repetitivas. Estas são constituídas de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem lado a lado no genoma de eucariotos. A técnica de SSR revela polimorfismo em um loco devido a diferenças no número de vezes (n) em que, por exemplo, um dinucleotídeo (AG_n) se repete naquele loco.

Essas variações no número de repetições constituem-se, em última análise, em variações no comprimento do segmento detectado pela reação de polimerase em cadeia e na separação de fragmentos amplificados em gel de eletroforese.

Os marcadores SSR caracterizam-se por serem codominantes, baseados em PCR, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados. O conteúdo genético informativo de um loco SSR é bastante alto, por se tratarem de seqüências de alta taxa evolutiva. Mesmo em comparações de germoplasma com estreita base genética, geralmente detecta-se um alto número de alelos em um loco SSR. A grande limitação do uso em larga escala de marcadores SSR é a obtenção dos primers que serão usados na PCR para amplificar alelos em cada loco. Trata-se de uma técnica de elevado custo e intensiva em mão-de-obra, considerando-se todas as etapas de seu desenvolvimento (incluindo construção de biblioteca genômica, seleção de clones positivos, desenho e teste de primers). Em geral, somente cerca de 10% a 20 % dos primers são informativos, o que torna SSR uma técnica de custo elevado e intensiva em trabalho. O uso de bibliotecas enriquecidas e do conceito de "primers ancorados" tem facilitado o trabalho envolvido, e reduzido o custo de obtenção de primers informativos em, pelo menos, 5 vezes (Scott Tingey, informação pessoal).

No entanto, uma vez obtidos os primers informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica. SSR constitui uma ferramenta extremamente eficiente na identificação e na diferenciação de indivíduos. Os marcadores SSR apresentam diversas vantagens em relação aos RFLPs, entre essas: são baseados em PCR, menos laboriosos, de menor custo, não demandam o uso de radioatividade, além de serem geralmente mais polimórficos. SSRs podem ser trocados entre laboratórios, uma vez que cada loco é definido pelas seqüências dos primers que flanqueiam a região repetitiva. Os ensaios com SSRs são mais robustos do que com RAPD e mais versáteis do que com AFLP. A natureza codominante dos microssatélites é uma vantagem sobre os marcadores RAPD e AFLP (dominantes), principalmente para mapeamento genético.

Powell et al (1996) examinaram a utilidade dos marcadores RFLP, RAPD, AFLP e SSR para análise de germoplasma de soja, avaliando o conteúdo de informação (heterozigosidade esperada), o número de locos analisados simultaneamente por experimento (taxa de multiplex) e a efetividade na análise de relação entre acessos. Os marcadores SSR tiveram a maior heterozigosidade esperada, enquanto os marcadores AFLP tiveram a maior taxa de multiplex.

O Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem desenvolvido marcadores SSR para várias espécies, através de um protocolo otimizado pela Dupont (Rafalski *et al.*, 1996), que utiliza bibliotecas enriquecidas, e que foi adaptado para nossas condições. Já foram desenvolvidos primers para eucalipto (Brondani, *et al.*, 1998), pequi (Collevatti *et al.*, 1999), palmito (Gaiotto, *et al.*, 2000), mogno (Lemes, *et al.*, 2002), arroz (Brondani, *et al.*, 2001), *Magnaporthe grisea* (Garrido, 2001), melão (Ritschel, *et al.*, 2002), amendoim, sumaúma, cedro, pau-brasil, pupunha, cerejeira, cumaru, paraparâ, tatajuba, andiroba, anani e maçaranduba (ainda não pu-

blicados). O objetivo do presente trabalho foi desenvolver marcadores microssatélites para 5 espécies de plantas tropicais, a saber: pimentão, feijão, coco, copaíba e jatobá. Os locos microssatélites identificados e caracterizados servirão, entre outras aplicações, para: (a) analisar a diversidade de coleções de germoplasma; (b) identificar acessos duplicados; (c) estudar a estrutura genética de populações; (d) estudar paternidade; (e) desenvolver mapas genéticos; (f) utilizar em experimentos de seleção assistida por marcadores e analisar "pedigrees".

Material e Métodos

Material experimental

O desenvolvimento de marcadores SSR requer uma quantidade mínima de 50 µg de DNA de boa qualidade. Para a extração de DNA na grande maioria das espécies vegetais, tem sido utilizado o protocolo com o detergente CTAB ("cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide"), como descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). O DNA foi extraído de folhas jovens de um acesso de cada uma das cinco espécies: pimentão (*Capsicum annuum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), coco (*Cocos nucifera*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e jatobá (*Hymenaea courbaril*).

Construção de biblioteca genômica enriquecida para SSR

Na construção de biblioteca genômica enriquecida para SSR, foi utilizado o protocolo desenvolvido por Rafalski *et al.* (1996), com algumas adaptações. Foram testadas digestões do DNA genômico com três enzimas de restrição, *MseI*, *Sau3AI* e *Tsp509I* para se obterem fragmentos entre 300 e 800 pares de bases. Para pimentão, feijão e coco, o DNA genômico foi digerido com *Tsp509I*, para copaíba e jatobá, com *Sau3AI* e os fragmentos de tamanho entre 300 e 800 bp foram recuperados em membrana de celulose (DEAE-celulose NA-45), via eletroforese em gel de agarose. Aproximadamente 30 µg dos

fragmentos foram recuperados e ligados com T4 DNA ligase (a 12 °C, durante a noite) a adaptadores que continham o sítio de restrição das respectivas enzimas (Figura 1). Um total de 200 pmol de oligonucleotídeos biotinilizados (TC)₁₃ foi ligado a 1 mg de contas magnéticas ligadas a estreptavidina em 400 µl de tampão BW 2x (Tris HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 2 mM) em temperatura ambiente, sob agitação por uma hora. O excesso de sonda foi removido por lavagem com 400 µl de BW 1x e 400 µl de SSPE 5x contendo SDS a 0,1 %. O DNA ligado foi então hibridizado ao complexo sonda-contas magnéticas a 65 °C por 90 min, em um volume total de 300 µl (150 µl de SSPE 10x, SDS 0,2% e 150 µl de DNA mais adaptador). As contas magnéticas foram repetidamente sedimentadas por aplicação de um campo magnético e lavadas duas vezes por 5 min em SSPE 2x, SDS 0,1% a temperatura ambiente, uma vez por 15 min em SSPE 2x, SDS 0,1% a 65 °C. As contas magnéticas foram então ressuspensas em 200 µl de H₂O estéril.

Seleção de clones positivos

O DNA ligado às contas magnéticas foi amplificado com a utilização de primers complementares às seqüências dos adaptadores via PCR e os produtos da amplificação foram purificados utilizando-se o kit de purificação de PCR Qia-quick (QIAGEN). O DNA purificado foi clonado em plasmídeo pGEMT. Células de *E. coli* (XL1-Blue) foram transformadas por eletroporação ou choque térmico, plaqueadas em meio LB + ampicilina e crescidas durante a noite a 37 °C. As placas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e processadas por 5 min nas seguintes soluções: desnaturante (NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M), neutralizante (Tris-HCl 0,5 M e NaCl 1,5 M). Em seguida, o DNA foi fixado às membranas através de luz ultra violeta e pré-hibridizadas (3h a 65 °C, em SSC 5x, N-laurylsarcosine 0,1%, SDS 0,02%, "blocking" 1%). Sondas poli AG/CT marcadas com digoxigenina foram então desnaturadas e hibridizadas às membranas

por 12 horas. Após lavagens de alta estrigência (2 vezes por 5 min com SSC 2x, SDS 0,1% em temperatura ambiente; 2 vezes por 15 min com SSC 0,1M, SDS 0,1% a 65 °C), as membranas foram lavadas e preparadas para detecção quimioluminescente e, então, expostas a filmes de raio X. As placas que continham clones positivos para SSRs foram identificadas por autoradiografia. Os clones positivos foram submetidos a reações de PCR-ancorado (Taylor *et al.*, 1992; Rafalski *et al.*, 1996) para verificação da presença, da orientação e do tamanho do inserto de SSR (Figura 1).

Seqüenciamento dos clones positivos e desenho de primers

Os clones selecionados cresceram em meio Lb + ampicilina e tiveram os respectivos DNAs isolados por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Os insertos foram então amplificados via PCR usando-se primers complementares às seqüências dos vetores. O produto da amplificação foi purificado e foram executadas reações de seqüenciamento com kits de Dye-terminator (Applied Biosystems/ABI). Foram, então, desenhados primers específicos para cada região flangeadora das seqüências SSR utilizando-se para isso os programas Primer (Lincoln *et al.*, 1991) e Primer 3 (Whitehead Institute of Biomedical Research) (Figura 2). No desenho dos primers, foram utilizados os seguintes critérios: temperatura média de anelamento de 52 °C a 58 °C (diferença máxima de 3 °C na temperatura de anelamento entre cada primer do par) e conteúdo de GC entre 40% e 60% e ausência de complementaridade entre os pares de primers.

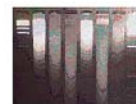
Otimização dos “primers” desenvolvidos

As PCRs para testes dos primers sintetizados foram realizadas em volumes totais de 13 µl, contendo: 0,3 µM de cada primer, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, DMSO 50% (1,3 µl) e 7,5 ng do DNA. A reação de amplificação seguiu os seguintes

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SSR

■ Construção de biblioteca genômica

a) digestão com *Tsp* 509 I



b) recuperação do DNA



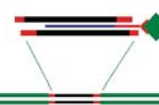
c) ligação à adaptadores



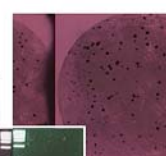
d) enriquecimento utilizando sondas biotiniladas



e) recuperação dos fragmentos com contas magnéticas

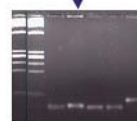
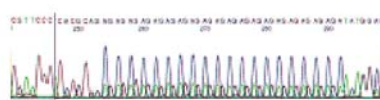


f) PCR dos fragmentos e clonagem em plasmídeo pGEMT



■ Identificação e triagem de clones positivos

■ Seqüenciamento e desenho dos primers



■ Triagem de primers SSR

■ Caracterização dos locos SSR

Figura 1 . Etapas do desenvolvimento de primers microsátélites (Cortesia de André Beló)

passos: 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 54-62 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. A temperatura de anelamento foi otimizada para cada par de primers. Os fragmentos amplificados foram visualizados em géis de agarose a 3,5% de concentração, corados com brometo de etídio (Figura 1).

Caracterização dos locos

Após a definição das temperaturas de anelamento, foram analisadas amostras de pimentão, feijão e coco em gel de poliacrilamida a 4%, corado com nitrato de prata (Bassam *et al.*, 1991). Para copaíba e jatobá, os primers foram marcados com fluorescência e as análises realizadas em seqüenciador automático (ABI 377). Os programas GeneScan e Genotyper foram utilizados para essas análises. Para cada loco foram observados o número de alelos (A) e a diversidade alélica ou hete-

rozigosidade $h = 1 - \sum p_i^2$ (onde p_i é a frequência do i-ésimo alelo). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com padrões obtidos com DNA ladder 10-bp (Gibco BRL).

Resultados e Discussão

A eficiência do enriquecimento, da seleção por hibridização e da seleção de clones que continham seqüências hipervariáveis por PCR-ancorado resultou na obtenção de um grande número de clones positivos a serem seqüenciados, evidenciando-se a abundância de elementos repetitivos no genoma das espécies analisadas (Tabela 2). As bibliotecas enriquecidas foram hibridizadas com a sonda AG/TC, para detecção de microsatélites e foram selecionados 575 clones para pimentão, 286 para feijão, 115 para coco, 270 para copaíba e 235 para jatobá. Após seleção por PCR-ancorado, 475 clones da biblioteca de pimentão, 100 de feijão, 76 de coco, 156 de copaíba e 86 de jatobá

mostraram-se adequados ao sequenciamento. Destes, 259 para pimentão, 28 para feijão, 43 para coco, 156 para copaíba e 86 para jatobá mostraram-se adequados para o desenho de primers (Tabela 1). Em vários casos, a limitada distância entre a sequência flanqueadora e a região SSR mostrou-se insuficiente para o desenho dos primers. A maioria dos SSRs detectados continha repetições AG e TC, apesar de também terem sido detectados SSRs com repetições TA e CA. Os microssatélites variaram em comprimento, alguns tendo 40 repetições perfeitas. Microssatélites que contêm repetições AG/TC são comuns em várias espécies de plantas (Gupta & Varshney, 2000), o que parece também ser o caso das espécies trabalhadas neste estudo.

Para a determinação da temperatura ótima para cada par de primers, foram utilizadas amostras das espécies em estudo. Inicialmente, todos os primers foram testados com a temperatura de anelamento a 56°C. Essa temperatura foi então aumentada ou diminuída de acordo com o produto gerado na PCR. A não amplificação ou amplificação de bandas fracas indicou a necessidade de reduzir a temperatura de anelamento do primer. Por outro lado, a presença de várias bandas indicou a amplificação de produtos inespecíficos, tornando necessário o aumento da temperatura de anelamento.

Para pimentão, até o momento, 118 tiveram as condições de PCR otimizadas e geraram produtos com boa resolução. Para feijão foram otimizados 25, para coco, 16, para copaíba, 36 e para jatobá, 26 pares de “primers”.

Para pimentão, até o momento, foram caracterizados 51 locos, sendo 3 monomórficos e 48 polimórficos. A diversidade alélica foi de 0,3 a 0,83 e o número de alelos variou entre 2 e 11, com uma média de, aproximadamente, 6 alelos por loco. Cerca de 48 % dos locos possuem 6 ou mais alelos, o que os torna pro-

Espécie	Clones hibridizados	Clones positivos	Clones sequenciados	Primers desenhados
<i>Capsicum annuum</i>	575	475	259	118
<i>Phaseolus vulgaris</i>	286	100	28	25
<i>Cocos nucifera</i>	115	76	43	16
<i>Copaifera longsdorffii</i>	270	156	156	45
<i>Hymenaea courbaril</i>	235	86	86	51

Tabela 2. Número de indivíduos analisados por espécie (n), número de primers polimórficos, números máximos, mínimos e médios de alelos amplificados por loco (A) e de diversidade alélica (h).

^a Valores obtidos para os ecótipos gigantes (alógamos).

missores para estudos de caracterização de germoplasma e mapeamento genético.

Para feijão, 25 locos foram caracterizados e 8 mostraram-se monomórficos. Os outros 17 locos foram caracterizados e amplificaram de 3 a 10 alelos por loco. A diversidade alélica variou de 0,21 a 0,83, com média de 0,63. Esses resultados são um bom indicativo do alto nível de polimorfismo dos locos SSR para essa espécie autógama e do potencial desses marcadores para estudos genéticos de espécies cultivadas e silvestres de *Phaseolus*.

Para coco, dos 16 “primers” SSR testados, 3 mostraram-se monomórficos e 3 não apresentaram resoluções de bandas satisfatórias. Para os demais 10 “primers”, foram detectados de 2 a 14 alelos por loco, com uma média de 8,25. A heterozigosidade variou de 0,47 a 0,86, com uma média de 0,68, entre os ecótipos de gigante (alógamos), enquanto a diversidade gênica (h) variou de 0,00 a 0,77, com uma média de 0,37 entre os ecótipos de anões (autógamos).

Para jatobá, foram escolhidos os 8 primers mais polimórficos para caracterização dos locos SSRs. Foi detectada uma média de 9,25 alelos por loco e uma heterozigosidade média de 0,76.

Para copaíba, utilizando-se os 8 primers mais polimórficos com ótima resolução, foram observados de 19 a 27 alelos por loco e heterozigosidade média de 0,88 (espécie preferencialmente alógama). Esses marcadores permitiram a análise detalhada de parentesco, cuja magnitude da probabilidade de identidade combinada foi de $1,1 \times 10^{15}$ e o poder de exclusão combinado de 99,9999%, evidenciando que esses marcadores permitem estimar relações precisas de parentesco em populações naturais de copaíba.

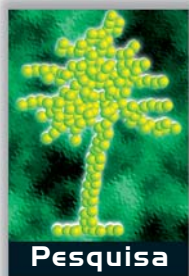
Esses microssatélites, desenvolvidos para as espécies tropicais estudadas, são de extrema importância na obtenção de informações genéticas para dar suporte aos programas de melhoramento genético, coleta, conservação e manejo de recursos genéticos vegetais.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro do PRODETAB, Programa Avança Brasil (MAPA) e PROBIO (MMA)

Referências Bibliográficas

- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Analyt. Biochem.** 196: 80-83.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; AND GRATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theor. Appl. Genet.** 97: 816-827.
- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity** 83: 748-756.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. Pp 220.
- GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R. P. V. Microsatellite markers for Heart of Palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology**. , v.1, n.1-2, p.86 - , 2000.
- GARRIDO, L.R. 2001. Identificação, desenvolvimento e uso de marcadores de regiões hipervariáveis do genoma de *Magnaporthe grisea* na análise da estrutura de populações do patógeno infectando plantações de arroz (*Oryza sativa*). Tese de Doutorado, UnB
- GUPTA, P.K. & VARSHNEY, R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica** 113: 163-185.
- LEMES, M.R.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. 2002. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity** 93(4): 287-290.
- LINCOLN, S.E.; DALY, M.J.; LANDER, E.S. 1991. “Primer” software.
- LITT, M. & LUTY, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in-vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Human Genet.** 44: 397-101.
- POWEL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M., VOGEL, J. TINGEY, S., E RAFALSKI, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding** 2: 225-238
- RAFALSKI, J.A.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M.; TINGEY, S.V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: Birren, B. & Lai, E. (eds.) **Analysis of non-mammalian genomes a practical guide**. Academic Press, New York, pp 75-134.
- RITSCHER, P. S.; BUSO, G. S. C.; BUSO, J. A.; FERREIRA, M. E. Towards the development of a microsatellite marker based genetic map of melon. In: The International Conference on the Status of Plant, Animal & Microbe Genomes Research, 2002, San Diego. Plant, Animal & Microbe Genomes X. 2002. p.129.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning A laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- WEBER, Z. & MAY, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Human Genet.** 44: 388-396.



Biovidros

Sinterização de biovidros na forma de partículas e do tipo espuma

Elias da Costa

Centro Interdisciplinar de Pesquisa e
Pós-Graduação – CIPP-UEPG

Lexandra Novaki

Departamento de Química – DEQUIM-UEPG

Hui I Tsai

Centro Interdisciplinar de Pesquisa e
Pós-Graduação – CIPP-UEPG

Lara Tschopoko Pedrosa Pereira

Depto. de Engenharia de Alimentos, DEA-UEPG

André Vitor Chaves de Andrade

Depto. de Física – DEFIS-UEPG

Carlos de Oliveira Paiva Santos

Instituto de Química de Araraquara
UNESP, Físico-Química

Christiane Philippini Ferreira Borges

Depto. de Química – DEQUIM-UEPG

Mariza Boscacci Marques

Depto. de Química – DEQUIM-UEPG

Ariádne Cristiane Cabral da Cruz

Centro Interdisciplinar de Pesquisa e Pós-
Graduação – CIPP-UEPG

Fábio André dos Santos

Centro Interdisciplinar de Pesquisa e
Pós-Graduação – CIPP-UEPG

José Caetano Zurita da Silva

Departamento de Química – DEQUIM-UEPG
jzurita@uepg.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Resumo

Vitrocerâmicas do sistema Na_2O - CaO - P_2O_5 - SiO_2 têm bom desempenho e biocompatibilidade como material de implantes. Preparou-se um biovidro com composição 12% Na_2O - 28% CaO - 10% P_2O_5 - 50% SiO_2 a partir de óxidos puros via fusão, obtendo-se material não-cristalino com características físicas e químicas adequadas. Amostras de biovidro foram preparadas na forma de vidro-espuma (“Foam-Glass”) combinando a matriz vítrea com o aditivo de B_4C . Essas amostras sinterizadas no intervalo de temperaturas de 600 e 840°C apresentaram baixa densidade e indicaram evolução na fase cristalina com presença de SiO_2 , $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$, CaSiO_3 e uma quantidade de material não cristalino. Ensaio “in-vitro em meio de SBF” foram realizados com blocos de biovidro puro e levados a estufa a 37°C. Posteriormente ao ensaio, observou-se por microscopia eletrônica de varredura (MEV) pequenos cristais na superfície dos blocos e dos pós, indicando homogeneidade na superfície da amostra. A análise de MEV do “Foam-Glass” em SBF também apresentou camada de cristais na sua superfície indicando que o material tem característica de bioatividade.

Introdução

Dentre os diversos biomateriais desenvolvidos, atualmente, existem os biovidros sintetizados para ter comportamento fisiológico específico como material constituinte de aparelhos protéticos ou como material de preenchimento para reparação de defeitos ósseos.

Diversas composições de biovidros foram preparadas por Hench e colaboradores^(1,2) à base de SiO_2 - Na_2O - CaO - P_2O_5 , em diferentes composições, e são conhecidas por serem particulados altamente bioativos, e têm sido usados em clínicas como preenchedor ósseo de cavidades e como substituto de massa óssea perdida em determinados traumas. Esses biovidros são indutores de formação de trabéculas, no osso em algumas regiões, num período de 2 a 7 dias, e de partes de osso que são formados num maior período de tempo⁽³⁾. Entretanto, análises qualitativa e quantitativa de ensaios in-vivo na geração de ossos são importantes para se estabelecer a propriedade aloplástica do material de implante⁽⁴⁾. Os biovidros à base de 45% SiO_2 - 24,5% Na_2O - 24,5% CaO - 6% P_2O_5 apresentam bioatividade quando inseridos em meio aquoso, nos ensaios in-vitro em fluido de corpo simulado. Esses biovidros perdem íons sódio para o meio e formam

um filme superficial rico em SiO_2 , o que provoca a formação de uma camada de gel de fosfato de cálcio, inicialmente amorfo e que gradualmente evolui para uma camada policristalina de aglomerados de apatita, os quais podem ser incorporados a compostos orgânicos, por exemplo, no colágeno. Essa camada formada é importante para que o processo de dissolução do vidro se estabilize, e possibilite que processos físico-químicos ocorram e formem ligações químicas entre a superfície vítrea e o tecido ósseo recém-formado na região de intervenção cirúrgica⁽⁵⁾. O fenômeno de osteogênese direcionada por partículas de biovidros ativos com uma larga distribuição granulométrica tem sido explicado por Scheppers et al⁽⁶⁾. A troca iônica interfacial entre as partículas de biovidros e os fluidos dos tecidos vizinhos resultam na formação de uma sílica gel, a qual é coberta rapidamente por uma camada rica em cálcio-fósforo⁽⁷⁾.

Recentemente, a cadeia de silicatos minerais como wollastonita (CaSiO_3)⁽⁸⁾, e diopsida ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$)⁽⁹⁾, têm sido preparados sinteticamente para uso como materiais cerâmicos bioativos. Inicialmente, a superfície cerâmica reage com o fluido fisiológico das vizinhanças, portanto, a natureza do sólido formado na superfície é determinada pela química da cerâmica e os constituintes do fluido de corpo simulado⁽¹⁰⁾. Um novo processo de preparação in-situ de cerâmicas bioativas porosas com porosidade interconectada em cerâmicas densas foi desenvolvido usando uma solidificação lenta da composição eutética do sistema CaSiO_3 - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ que são as chamadas cerâmicas bioeutéticas, e possuem a habilidade de reestruturar sua morfologia quando imersos em meio de fluido de corpo simulado⁽¹¹⁾. O trabalho em estudo tem aplicação na área de implantes dentais, onde biovidros e cerâmicas do sistema Na_2O - CaO - SiO_2 - P_2O_5

apresentam uma boa bioatividade e uma biocompatibilidade para uso como material de preenchimento ósseo. O objetivo foi a preparação de um biovidro do tipo vidro-espuma, com a característica de osteocondução no interior dos poros do biovidro possibilitando, portanto, um crescimento ósseo e levando a uma melhor fixação do material na matriz óssea.

Materiais e Métodos

Preparação do pó do biovidro e moagem

Preparou-se uma mistura de pó, com composição 12% Na_2O , 28% CaO , 10% P_2O_5 e 50% SiO_2 em peso, partiu-se de reagentes puros e anidros: Na_2CO_3 , CaO , Na_2HPO_4 , SiO_2 . Colocou-se o pó dentro de um cadinho de platina e levou-se para fusão em um forno elétrico a 1450°C por um período de 4 horas. Retirou-se rapidamente o fundido do forno e colocou-se dentro de um recipiente contendo água destilada, assim formaram-se grânulos de vidro não cristalino. Em seguida os grânulos foram triturados em um jarro de polietileno contendo cilindros de zircônia durante 6 horas.

Caracterização dos pós puros e sinterizados

Os pós de biovidros foram caracterizados por fluorescência de raios X (FRX), difratometria de raios X (DRX), picnômetro de hélio, análise termogravimétrica (TG/DTA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDX).

Preparação do vidro-espuma (Foam-Glass)

A matriz vítrea foi misturada com diferentes percentagens de aditivo de B_4C , em moinhos de bolas de zircônia por 6 horas, e em seguida o material foi peneirado e caracterizado física e quimicamente.

Compactação e sinterização

A sinterização de amostras de biovidro (BV) puro e biovidro + carbeto de boro (B_4C) foi realizada em forno elétrico, no intervalo de 600°C a 840°C por 2 horas para cada amostra.

Preparação de Solução de Fluido de Corpo Simulado (SBF)

A preparação de solução fisiológica bioativa foi realizada contendo os seguintes componentes: 0,2 g KCl, 8,0 g NaCl, 0,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g NaH_2PO_4 , 1,0 g NaHCO_3 , 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g de glicose para 1000 mL de água.

Ensaio in-vitro em meio de SBF

Os blocos ou pós sinterizados foram limpos e desengordurados em ultra-som e lavados com água deionizada, secos em estufa a 120°C , e tratados em autoclave. Os experimentos foram realizados em tubos de polipropileno de 15 mL cuidadosamente limpos, com tampa de rosca contendo 10 mL de solução e mantidos a uma temperatura constante de 37°C em estufa elétrica. A superfície das amostras foi analisada em um microscópio eletrônico de varredura após os períodos de 3 e 10 semanas de imersão no SBF.

Resultados e Discussão

A caracterização química por fluorescência de raios X mostra a composição de: 26,1% CaO , 55,5% SiO_2 , 13,1% Na_2O , 10,1% P_2O_5 , indicando que as partículas de biovidro em estudo estão situadas na faixa de bioatividade, segundo o diagrama de fases⁽⁵⁾.

Inicialmente o biovidro puro foi caracterizado por uma análise termogravimétrica (TG/DTA) e pode-se observar que temperatura de transição vítrea assim como as temperaturas de nucleação e de

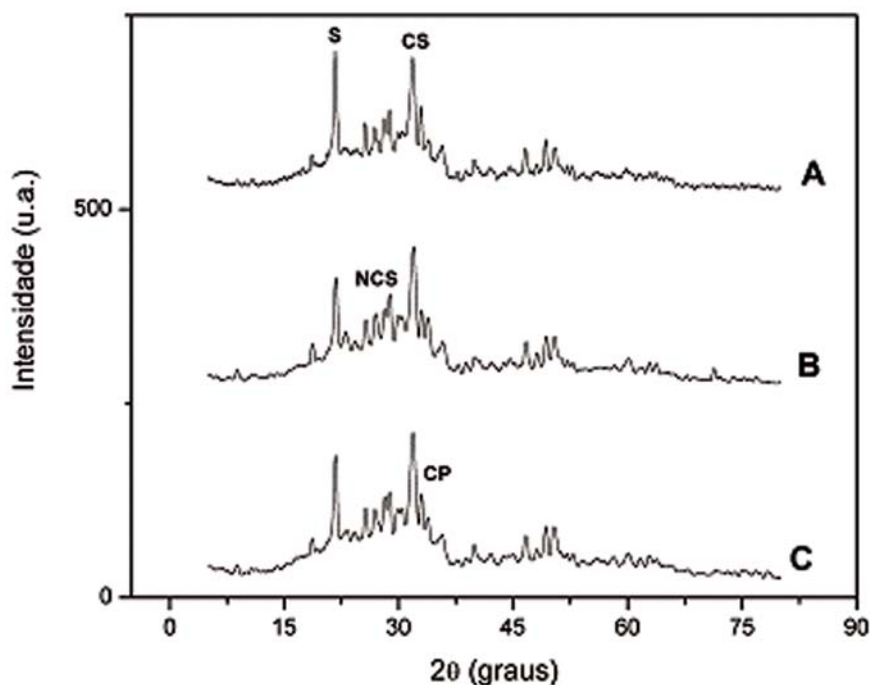


Figura 1 - Difratoograma de raios X de amostras de biovidro (BV) do tipo espuma, sinterizados a 750°C: **A** - BV + 7% de B_4C ; **B** - BV + 5% de B_4C ; **C** - BV + 3% de B_4C .

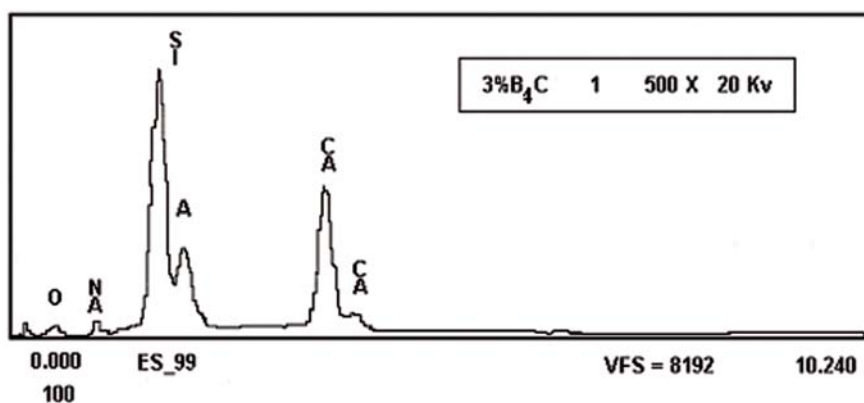


Figura 2 - EDX obtido de uma amostra de biovidro + 3 % de B_4C .

cristalização apresentam-se na faixa de 680-800°C, a partir destes dados pode-se arbitrar uma temperatura para a sinterização dos biovidros tipo espuma em 750°C. Porém, em análises realizadas em biovidros com outros tipos de aditivos verifica-se outras temperaturas de nucleação e de cristalização. Portanto, a temperatura de sinterização para a obtenção do biovidro tipo espuma depende da natureza do aditivo a ser misturado.

As amostras sinterizadas foram caracterizadas por DRX, os resultados obtidos são apresentados na Figura 1. A análise de DRX

(SHIMADZU-XRD-6000) indica pouca evolução de fases cristalinas, ou seja apresenta uma extensa faixa de material não-cristalino, isto é devido ao curto período de sinterização. Os picos mostram fases cristalinas bem distintas e nítidas de sílica em sua forma de Cristobalita (SiO_2), fosfato de cálcio ($Ca_2P_2O_7$), silicato de cálcio ($CaSiO_3$) e devitrita ($Na_2Ca_3Si_6O_{16}$). O difratograma mostra também picos de boro em sua fase única, indicando que nem todo boro reagiu com a massa do biovidro, porém a intensidade desse pico aumenta em amostras com maior teor de B_4C .

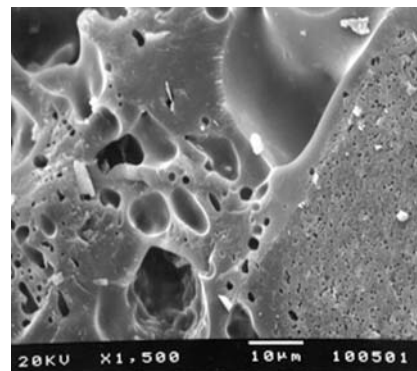


Figura 3 - MEV de uma amostra de Biovidro + 3 % de B_4C .

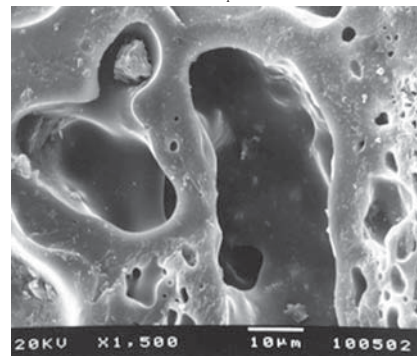


Figura 4 - MEV de uma amostra de Biovidro + 5 % de B_4C .

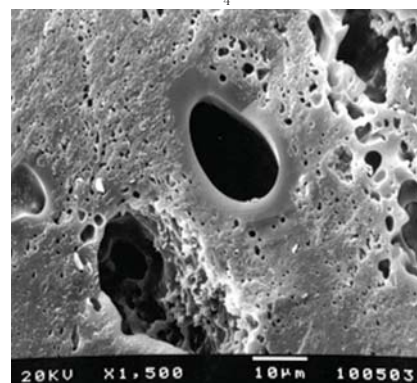


Figura 5 - MEV de uma amostra de Biovidro + 7 % de B_4C .

A composição elementar dos biovidros sinterizados foi analisada através de MEV-EDX como pode ser observado na Figura 2. Verifica-se que o biovidro não apresenta impurezas, sendo visualizados somente os elementos formadores da composição do material em estudo. Nesta mesma análise o elemento Boro não pode ser identificado, pois o aparelho utilizado não possui detector específico para esse elemento.

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostram as microestruturas porosas das amostras. Esses poros podem ser observados nas figuras 3,

4 e 5, e são interconectados e de vários tamanhos. Esse fato não descarta a hipótese destes biovidros possuírem poros fechados em sua estrutura. O mecanismo de formação de poros na estrutura do biovidro pode ser explicado pela evolução de gases, os quais levam à formação de bolhas deixando o material poroso. Como encontrado na literatura, algumas soluções aquosas de carbonatos de metais polivalentes são utilizados para a produção destes materiais porosos devido à sua fácil descarbonização⁽⁴⁾, esse é um dos motivos do estudo do aditivo carbeto de boro no biovidro. Outro mecanismo que pode também ser responsável pela diminuição da densidade do biovidro, é a entrada do elemento boro nas redes cristalinas de silicatos e fosfatos fazendo com que essas estruturas se deformem ocasionando aumento do volume no material.

Outra característica que pode ser analisada nas micrografias destas amostras é a alta densificação observada nas regiões em volta dos poros que, provavelmente, são devidas a regiões onde houve uma maior reação química com o boro, e o gás que se difundiu provocou um maior empacotamento da matriz vítrea e ao mesmo tempo expandindo com a formação de microporos.

Ensaios in-vitro de amostras sinterizadas indicam que o biovidro puro e biovidro contendo carbeto de boro apresentam uma camada superficial pouco cristalina, na forma de fosfato de cálcio, a qual com o passar do tempo (envelhecimento) se tornam cristalinas. Análise por MEV-EDX da película indica a presença de cálcio e fósforo na superfície e verifica-se que está fortemente aderido em sua superfície.

Os biovidros produzidos foram também caracterizados quanto à sua densidade aparente usando picnômetro de hélio, considerando-se somente o volume do sólido e dos poros abertos, desconsiderando o volume relativo aos poros fechados. Os dados obtidos estão relacionados na tabela a seguir, Tabela 1:

Tabela 1 - Valores de densidade aparente das amostras de biovidro obtidas em picnômetro de hélio.

Amostra	Densidade(g/cm ³)
Biovidro+ 7% carbeto de boro	1,43
Biovidro+ 5% carbeto de boro	1,38
Biovidro +3% carbeto de boro	1,26
Biovidro puro	3,16

Os dados da Tabela 1 são muito significativos, pois os valores de densidade média obtidos variam em função da percentagem de carbeto de boro, indicando uma menor densidade para amostra com 3% de carbeto de boro.

Conclusão

Após a análise dos resultados obtidos, conclui-se que o biovidro produzido do tipo espuma apresentou pouca evolução de fases e pode-se constatar que a mistura de aditivos ao biovidro provoca a formação de poros de tamanhos variados e interconectados. Portanto, o objetivo de se obter um biovidro tipo espuma foi alcançado obtendo estrutura microporosa pouco densa. Ensaios in-vitro das amostras mostram que ocorre formação de uma película à base de fosfato de cálcio na sua superfície indicando que o material é bioativo.

Agradecimentos

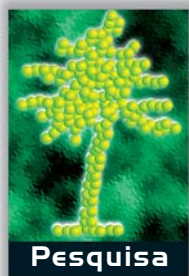
Ao CNPq-PIBIC, Fundação Araucária e IQR-UNESP.

Palavras-chave: Biovidros, vidro-espuma, bioatividade

Referências Bibliográficas

1. LIN, F.H., HON, M.H., High Strength Bioglass Ceramic Containing $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, J. Austr. Ceram. Soc. 25 1 41-49 (1989).
2. MCMILLAN, P.W. Glass Ceramics, Academic Press Inc, 1979.
3. STANFORD, J.W.; Bone-inducing materials: Their place in dentistry, Int. Dent. J., 37 162-168 (1987).
4. HÖLAND, W.; Biocompatible and bioactive glass-ceramics - state of the art and new directions, J. of Non-Crystalline Solids, 219 192 - 197 (1997).
5. STRNAD, Z., Role of the glass phase in bioactive glass-ceramics, Biomaterials, 5 317 - 321 (1992).
6. SCHEPERS, E.; De CLERCQ, M.; DUCHEYNE, P.; Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions, J. Oral Rehabil., 18 439 - 452 (1991).
7. SCHEPERS, E.J.G.; DUCHEYNE, P.; BARBIER, L.; Bioactive glass particles of narrow size range: A new material for the repair of bone defects, Implant Dentistry, 3 151 - 156 (1993).
8. De AZA, P.N.; GUITIÁN, F.; De AZA, S.; Bioactivity of wollastonite ceramics: in vitro evaluation, Scripta Materialia, 8 1001 - 1005 (1994).
9. MIAKE, Y.; YANAGISAWA, T.; YAGIMA, Y.; NOMA, H.; YASUI, N.; NONANI, T.; High resolution and analytical electron microscopy studies of new crystals induced by a bioactive ceramic(diopside), J. of Dental research, 11, 1756 - 1763 (1995).
10. OHTSUKI, C.; AOKI, Y.; KOKUBO, T.; BANDO, Y.; NEO, M.; YAMAMURO, T.; NAKAMURA, T.; Characterization of apatite layer formed on bioactive glass-ceramic A-W, Bioceramics, 5 87 - 94 (1992).
11. De AZA, P.N.; LUKLINSKA, Z.B.; ANSEAU, M.R.; HECTOR, M.; GUITIÁN, F.; De AZA, S.; Reactivity of a wollastonite-tricalcium phosphate bioeutectic ceramic in human parotid saliva, Biomaterials, 21, 1735 - 1741 (2000).





Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais

Produção de alcalóides e óleos essenciais

Introdução

A conversão das plantas e de suas partes, cujo valor medicinal tenha sido confirmado pelas pesquisas, em fármacos para a população esbarra na dificuldade de se obter matéria-prima na quantidade e qualidade necessária para suprir a demanda requerida pelo mercado nacional e internacional. Porém, não se cogita fazer uma incursão na já tão devastada natureza, pois, além dos danos ecológicos que essas coletas poderiam provocar, sem deixar de mencionar que diversas plantas já se extinguíram e que várias outras se encontram ameaçadas de extinção, o controle qualitativo e quantitativo dos seus princípios ativos, seria muito difícil, uma vez que existem variações nos tipos e nos teores de substâncias ativas, devido à interação do genótipo com o meio ambiente. Deste modo, recomenda-se o cultivo de plantas medicinais.

Para se ter uma produção confiável de drogas terapêuticas como uma espécie recentemente adaptada às práticas de cultivo, faz-se necessário acompanhar esse cultivo; sendo que, se se tratar de plantas anuais, o tempo para o seu cultivo leva de 3 a 5 anos, enquanto que se tratar de plantas perenes, de 10 a 12 anos. Em geral, dos princípios ativos aos medicamentos são gastos cerca de 10 a 15 anos, com o custo entre 100 a 500 milhões de dólares na elucidação química, testes pré-clínicos e clínicos. Reconhecendo-se que uma planta produza 10g de massa seca e que nessas 10g se obtenha 0,3g da droga

isolada e que sejam necessários, para atender ao mercado, 30kg dessa substância, então será preciso 100.000 plantas só nesse primeiro momento, o que se torna extremamente dispendioso. Uma possível solução para esse problema é o fitomelhoramento, que pode ser clássico ou moderno.

O melhoramento genético de plantas medicinais, apesar de estar em sua fase embrionária, tem conseguido avanços; principalmente no que refere-se às plantas produtoras de alcalóides e óleos essenciais. Esses compostos são amplamente distribuídos no reino vegetal. As famílias Apocynaceae, Euphorbiaceae e Solanaceae destacam-se como produtoras de alcalóides; já as famílias Compositae, Lamiaceae e Umbelliferae apresentam-se como produtoras de óleos.

Melhoramento Genético Clássico e Moderno

Os trabalhos que envolvem seleção de genótipos superiores, com subsequentes cruzamentos, com vistas a obter híbridos ou cultivares, são incipientes. Com relação a composição e conteúdo de moléculas terapêuticas, encontraram-se altas herdabilidades para essas substâncias, o que facilita o melhoramento por seleção. Por esse meio, têm, freqüentemente, sido desenvolvidas e produzidas em larga escala cultivares de *Achillea*, *Chamomilla*, *Lavandula*, *Melissa*, *Mentha* e *Thymus*. Com vistas à produção qualitativa e quantitativa de princípios ativos tem-se conseguido êxito

Cláudio Lúcio Fernandes Amaral

Doutor em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa. Professor do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Líder do Grupo de Pesquisa Biotecnologia, Genética Vegetal e Melhoramento de Plantas. Membro do Instituto Baiano de Biotecnologia. Coordenador de Pesquisa da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Coordenador da Área de Genética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. geneticamaralclfuesb@bol.com.br

Anderson Brito da Silva

Especialista em Genética pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Professor do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Membro do Grupo de Pesquisa Biotecnologia, Genética Vegetal e Melhoramento de Plantas, Membro da Área de Genética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. anderbs@uol.com.br

Ilustrações cedidas pelos autores

com a seleção de clones superiores (ex.: *Artemisia annua* - Artemisia) ou com a introdução de novos acessos (ex.: *Chamomilla recutita* - Camomila), seguidos de seleção e hibridação (ex.: *Catharanthus roseus* x *Catharanthus trichophyllus*). Entretanto, com relação a diversificação estrutural e funcional dos fitofármacos, pode ser que os híbridos apresentem características inéditas às dos parentais (ex.: *Mentha aquatica* x *Mentha longifolia*).

A biotecnologia compõe-se basicamente das seguintes tecnologias: biologia molecular, engenharia genética, transformação genética e cultura de tecidos. A biologia molecular permite identificar, isolar e caracterizar o gene de interesse. A engenharia genética possibilita clivar, por meio de enzimas de restrição, seqüências nucleotídicas específicas de ácidos nucléicos pela geração de extremidades aderentes de fitas simples da molécula de DNA de uma espécie que se associam a fragmentos de DNA de outra espécie clivados por essas mesmas enzimas. O gene selecionado é inserido enzimaticamente em um plasmídeo em particular de uma bactéria específica e, subsequentemente, introduzido por transformação genética em uma célula vegetal. Entretanto, torna-se necessário regenerar a planta a partir da célula que foi geneticamente modificada, o que pode ser feito por cultura de tecidos. Assim, espera-se que o gene para o caráter almejado seja passado, através da reprodução sexuada e assexuada, dos parentais transformados para as progênes que expressarão também esse gene, significando que tal habilidade constitui valiosa contribuição para a obtenção rápida, segura e eficiente de fármacos.

Cultura de Tecidos e Transformação Genética

Cultura de tecidos é um processo, por meio do qual fragmentos vegetais ou suas partes denominadas explantes são isolados dos organismos ou obtidos a partir destes, sendo assepticamente cultivados em meio de cultura apropriado sob condições adequadas. Esse termo é genérico, referindo-se a cultura de células, te-

cidos, órgãos, embriões e plântulas. Essas técnicas consistem em selecionar explantes, desinfestá-los e cultivá-los em meio nutritivo mantido sob condições assépticas, sendo a multiplicação dos propágulos feita através de sucessivos subcultivos em meio próprio. Os brotos desenvolvidos em um meio são transferidos a outro meio para formação das raízes, obtendo-se, assim, plantas inteiras. Essas são cultivadas no laboratório em substrato de aclimação e, conseqüentemente, levadas à casa de vegetação antes de serem transferidas para o campo definitivamente.

Entre as principais funções da técnica de cultura de tecidos cabe dar ênfase à produção de (a) clones (ex.: *Aloe vera* - Babosa), ou seja, material homogêneo e uniforme, em larga escala, de rápida propagação, livre de patógenos, vigoroso e produtivo; (b) híbridos, por hibridação somática, através de fusão de protoplastos (ex.: *Nicotiana tabacum* - Tabaco); (c) haplóides (ex.: *Hyoscyamus niger* - Meimendo negro); (d) mutantes portadores de caracteres desejáveis, por meio do uso de agentes mutagênicos ou por variação somaclonal (ex.: *Datura innoxia* - Datura); (e) plantas-biorreatoras (ex.: *Atropa belladonna* - Beladona); (f) plantas geradoras de vacinas (ex.: *Solanum tuberosum* - Batata); bem como (g) conservação de germoplasma vegetal por criopreservação ou por manutenção do material vegetal, durante períodos prolongados, sob condições limitantes de crescimento e desenvolvimento (ex.: *Hyoscyamus muticulus* - Hiosciamus) e, finalmente, (h) biotransformação de compostos pouco interessantes em compostos muito interessantes sob o aspecto econômico [ex.: *Digitalis lanata* (Digitalis) e *Digitalis purpurea* (Dedaleira)].

A cultura de tecidos permite interferir nas rotas metabólicas vegetais mediante o cultivo de plantas em meio preparado com agentes estressantes, elicitores e mutagênicos, que afetam qualitativa e quantitativamente os princípios ativos produzidos, e altera a composição e/ou o teor, como foi observado em *Atropa belladonna* (Beladona), *Catharanthus roseus* (Vinca) e *Digitalis lanata* (Digitalis) ou

Quadro 1 - Substâncias derivadas de cultura de células vegetais

Produtos Industriais
Óleos
Perfumes
Aromatizantes
Pigmentos
Antioxidantes
Fármacos
Gomas
Inseticidas
Vitaminas

Fonte: Amaral (1999)

Quadro 2 - Compostos farmacológicos produzidos normalmente pelas plantas

Substâncias	Famílias
Alcalóides	Apocynaceae, Solanaceae
Flavonóides	Rutaceae
Glicosídeos Cardiotônicos	Scrophulariaceae
Taninos	Lauraceae
Terpenóides	Asteraceae, Lamiaceae

Fonte: Amaral (1999)

Quadro 3 - Compostos farmacológicos não produzidos normalmente pelas plantas

Substâncias	Espécies
Voafrina	<i>Catharanthus roseus</i>
Picracina	<i>Picralimia nitida</i>
Rutacultina	<i>Ruta graveolens</i>
Tarenosídeo	<i>Gardenia jasminoides</i>
Epicrosina	<i>Ochrosia elliptica</i>

Fonte: Amaral (1999)

Rosmarinus officinalis (Alecrim), *Ruta graveolens* (Arruda).

A cultura de células vegetais constitui uma fonte potencial de síntese de moléculas altamente valiosas às indústrias de alimentos, cosméticos, fármacos e têxteis, as quais têm utilizado as plantas como matéria-prima básica para seus produtos (Quadro 1).

Em cultura de células, podem-se produzir metabólitos especiais com propriedades terapêuticas (Quadro 2).

Além disso, verificou-se que substâncias que não são, usualmente, encontradas em plantas foram identifi-

cadadas, isoladas e caracterizadas nesse tipo de cultura *in vitro*. Soma-se a isso o fato de que foram obtidos, em cultura de células, compostos inteiramente novos (Quadro 3).

Além de sintetizarem e acumularem metabólitos secundários de significância comercial, as células vegetais podem ser usadas devido a apresentarem capacidade de realizar certas alterações estruturais nesses compostos. A biotransformação envolve processos bioquímicos de epoxidação, esterificação, glicosilação, hidroxilação, isomerização, oxidação, redução, saponificação, etc (Quadro 4).

Em geral, a produtividade de compostos fitoterapêuticos é menor em cultura de células se comparada a de tecidos sintetizadores nas plantas, o que provavelmente pode ser explicado pela perda da diferenciação de tecidos e de órgãos das culturas de suspensão de células e de calos em meio líquido. Acredita-se que isso seja devido à distribuição insuficiente de enzimas necessárias para a síntese e ao acúmulo de metabólitos secundários ou, simplesmente, seria reflexo do estado de não totipotência das células desenvolvidas em tais culturas. Desse modo, os calos em fase de diferenciação de raízes de *Atropa belladonna* são capazes de produzir atropina, enquanto os calos não diferenciados não produzem. Por outro lado, plantas inteiras de *Coptis japonica* produzem 5% de berberina em 5 ou 6 anos de cultivo, enquanto suspensão celular de linhagens não-selecionadas e selecionadas produzem, respectivamente, 5% e 13% dessa substância em apenas 3 semanas, o que reflete em produção rápida e econômica. Esse é um entre vários outros exemplos (Quadro 5).

A cultura de células mostra-se bastante promissora para a produção de princípios ativos, apresentando, porém, alguns inconvenientes que limitam seu uso, pois há compostos fármaco-ativos que só são produzidos em plantas intactas ou em tecidos e órgãos, mas não em células isoladas. Tem-se, como exemplo, vimblastina e vincristina, obtidos de *Catharanthus roseus*. Nesse caso, pode-se induzir, a partir das células em cultura, a organogênese ou a

Quadro 4 - Cultura de células de plantas comercialmente viáveis pela biotransformação

Espécies	Reações	Substratos	Produtos
<i>Cannabis sativa</i>	Oxidação	Geraniol	Nerol
<i>Datura spp.</i>	Esterificação	Tropina	Acetiltropina
<i>Digitalis spp.</i>	Hidroxilação	Digitoxina	Digoxina
<i>Digitalis spp.</i>	Glicosilação	Gitoxigenina	Gitoxina
<i>Mentha spp.</i>	Redução	Mentona	Neomentona
<i>Ruta graveolens</i>	Epoxidação	Hidroxycumarinas	Furanocumarinas

Fonte: Amaral (1999)

embriogênese somática de forma que a capacidade biosintética do vegetal seja restaurada.

A produção em larga escala de metabólitos secundários em cultura de células depende de algumas estratégias que tenham chance de se viabilizarem economicamente, e, entre elas, estão:

- Melhorar a estabilidade e a viabilidade da linhagem celular, selecionando plantas com alta produtividade;
- Selecionar meio de cultura mais adequado para o máximo crescimento;
- Minimizar a contaminação microbial;
- Identificar rotas bioquímicas que levem as células da planta à produção dos metabólitos desejáveis;
- Estabelecer métodos para aumentar a produção de metabólitos secundários;
- Determinar meios para aumentar a excreção de metabólitos secundários;
- Estudar os mecanismos regulatórios associados;
- Obtenção de produtos das células em suspensão, via excreção natural ou induzida;

- Otimização da produção média;
- Obtenção de extratos das células organizadas quando elas mesmas forem utilizadas.

Diante do exposto, sugere-se um esquema básico que permita produzir princípios ativos por meio de cultura de células, para contornar alguns problemas peculiares a esse sistema de produção, o qual, em suma, segue os seguintes passos: seleção do material vegetal, introdução "in vitro" de plantas altamente produtivas, indução de calos com separação de linhas celulares estáveis, otimização das condições de cultivo, re-seleção de linhas celulares superiores, cultura em massa em biorreatores, isolamento e purificação dos metabólitos desejáveis e, finalmente, comercialização (Figura 1).

A produção de metabólitos especiais com propriedades fitoterápicas em cultura de células diferenciadas (tecidos e órgãos) é mais previsível do que em células indiferenciadas (células em suspensão e calos). A diferenciação associa-se, usualmente, a uma melhor produção qualitativa e quantitativa. O teor e a composição de fitofármacos em órgãos, tais como raízes, são comparáveis àqueles das plantas intactas. Generalizando-se, tem-

Quadro 5 - Comparação da produção de compostos bioativos in vivo e in vitro

Espécies	Substâncias	Produção in vivo (%)	Produção in vitro (%)
<i>Talictum minus</i>	Berberina	0,80	1,00
<i>Galium aparine</i>	Antraquinona	0,43	20,00
<i>Morinda citrifolia</i>	Antraquinona	2,50	8,00
<i>Coleus blumei</i>	Ácido Rosmarínico	3,60	5,00
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Xiconina	2,75	14,00
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Vomileina	0,06	51,00

Fonte: Amaral (1999)

se que raízes não transformadas apresentam crescimento lento, desenvolvimento retardado e menor produtividade de fitoterápicos, ao passo que raízes transformadas possuem crescimento rápido, desenvolvimento acelerado e maior produtividade de fitoterápicos (Quadro 6). As raízes não-transgênicas, ao contrário das transgênicas, necessitam ser cultivadas em meio preparado com substâncias reguladoras de crescimento. Cabe enfatizar que o uso de raízes, transformadas ou não, é limitado àqueles biofármacos sintetizados somente em raízes. Entretanto, plantas inteiras podem ser regeneradas a partir dessas raízes.

A tecnologia transgênica oferece enormes oportunidades para o melhoramento de plantas. Para manipular o metabolismo produtor de princípios ativos nas plantas, têm sido feitos muitos esforços. Não é fácil controlar a produção dessas substâncias, até mesmo por meio de métodos moleculares sofisticados; devido a esses compostos serem sintetizados em diversos passos enzimáticos que ocorrem em vários tipos celulares.

A manipulação desse metabolismo pode-se dar por estímulo anabólico por meio da inclusão de rotas metabólicas feita pela tecnologia super-expressora, ou por desestímulo catabólico por meio da exclusão de vias feita pela tecnologia supressora-senso ou supressora anti-senso. Um dos pré-requisitos para o sucesso da manipulação genética é identificar, isolar e caracterizar os genes envolvidos na biossíntese de princípios ativos e o outro pré-requisito é compreender os mecanismos de regulação espaço-temporal desses genes em fases distintas de crescimento e desenvolvimento vegetal. Concomitantemente, faz-se necessário desenvolver protocolo de regeneração e de transformação. Embora, isso nem sempre seja possível, algum progresso tem sido, recentemente, alcançado. Esse avanço envolve duas categorias: cultura de órgãos transformados e plantas transgênicas.

Em cultura de células, suspensões celulares podem passar por crescimento em larga escala em biorreatores, usando-se, para tal fim, linhas

celulares superiores, isto é, estáveis e com alta produção em detrimento de linhas celulares inferiores, ou seja, instáveis e com baixa produção. Esse tipo de cultura pode ser manipulado suplementando-se o seu meio com elicitores, tais como: preparações fúngicas; o que é exemplificado por *Tagetes patula*, cuja cultura de células produziu, ao ser submetida a extratos de *Phytophthora sp.*, níveis significativos de polienos. Contudo, em cultura de células, instabilidade e baixa produtividade é regra e estabilidade e alta produtividade é exceção. Além disto, verificou-se, nesse tipo de cultura, compostos que não são, usualmente, encontrados em plantas, como os tarenosídeos em *Gardenia jasminoides*.

Há substâncias terapêuticas que não são produzidas em cultura de células, mas só em órgãos e em cultura destes, ou em plantas inteiras, a exemplo dos alcalóides vimblastina e vincristina, encontrados em *Catharanthus roseus*.

A cultura de órgãos não transformados apresenta produção estável e média, com crescimento lento, menor ramificação lateral e meio acrescido com reguladores de crescimento; ao passo que a cultura de órgãos transformados possui produção estável e alta, com crescimento rápido, maior ramificação lateral e meio não acrescido com reguladores de crescimento.

Figura 1 - Esquema básico de produção de princípios ativos em cultura de células



Broto tumorado como os de *Mentha citrata* são menos usados que as raízes em cabeleira como as de *Scopolia japonica*, pois é mais fácil estabelecer raízes do que brotos em cultura em meio líquido. A cultura de órgãos não é manipulada como a cultura de células, ao se alterarem as condições do meio. Entretanto, a adição de quitosana elevou a produção de hiosciamina em *Hyoscyamus multicus*.

Cabe enfatizar que, em se tratando de viabilidade comercial da produção de princípios ativos, deve-se considerar não apenas a produtividade, mas também a liberação dos princípios ativos no meio de cultivo, no sentido de se colherem os compostos fitoterápicos sem danificar ou destruir o material biológico que os produz. Em *Duboisia leichhardtii*, 75% de escopolamina é liberado no meio em 4 semanas. Todavia, há produtos, como os fitocomplexos,

Quadro 6 - Produção excedente de metabólitos secundários em cultura de raízes transformadas comparada com a de raízes não-transformadas

Espécies	Metabólitos	Conteúdo
<i>Atropa belladonna</i>	Escopolamina	0,37%
	Hiosciamina	0,95%
<i>Datura stramonium</i>	Escopolamina	0,56%
	Hiosciamina	0,30%
<i>Scopolia japonica</i>	Escopolamina	0,50%
	Hiosciamina	1,30%

Fonte: Amaral (1999)

que não são obtidos em órgãos, porém só em plantas intactas.

Estudos que envolvam plantas transgênicas regeneradas a partir de órgãos transformados são escassos. Em plantas medicinais transformadas por *Agrobacterium* spp. tem-se, preferencialmente, usado a *Agrobacterium rhizogenes* para transformar aquelas cujos princípios ativos se encontram em suas partes subterrâneas, como a hiosciamina nas raízes de *Ajuga reptans* e a *Agrobacterium tumefaciens* para transformar aquelas cujos princípios ativos se encontram em suas partes aéreas, como a artemisinina nas folhas de *Artemisia annua*. Entretanto, essa condição não constitui uma regra, o que significa que esses sistemas podem ser usados independentemente do local de síntese dos compostos farmacológicos nos vegetais, o que tem sido verificado em *Catharanthus roseus*. No que tange aos princípios ativos, a transformação pode levar à produção acentuada ou atenuada.

Em plantas medicinais, há exemplos de ganhos obtidos pela tecnologia transgênica, quais sejam: no que se refere a plantas produtoras de alcalóides, tem-se em *Atropa belladonna* a conversão de hiosciamina, pela enzima hiosciamina 6 β hidroxilase, cujo gene é oriundo de *Hyoscyamus niger*, em escopolamina. Já no tocante às plantas produtoras de isoprenóides, tem-se em *Mentha spicata* a conversão de limoneno, pela enzima limoneno 3 hidroxilase, cujo gene é oriundo de *Mentha piperita*, em Mentol.

Há, também, exemplos de perdas obtidas pela tecnologia transgênica, as quais se tem, no que diz respeito às plantas produtoras de isoprenóides, a redução dos teores de glicirizina, tanto em *Glycyrrhiza glabra* quanto em *Glycyrrhiza uralensis*.

Atualmente, vem-se tentando transformar outros caracteres de plantas medicinais que não a produtividade, como é o caso da resistência. Transferiu-se para *Atropa belladonna* o gene *bar*, que codifica para enzima fosfinotricina acetil transferase, a qual confere resistência ao herbicida fosfinotricina. O problema é que, ao invés de uma correlação positiva, obteve-se uma correlação negativa entre a

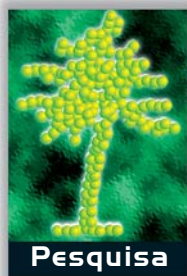
produtividade e a resistência; resultando em plantas resistentes com menos princípios ativos e em plantas suscetíveis, com mais princípios ativos.

Conclusões

As possibilidades de obterem-se novas moléculas terapêuticas destinadas à produção de fármacos tornam a biotecnologia imprescindível ao desenvolvimento técnico-científico dos programas de melhoramento genético do país, e tem como consequência a melhoria na qualidade de vida, principalmente na área da saúde da população brasileira. Portanto, diversos avanços foram alcançados e vários desafios têm sido subjugados; mas, decerto, há ainda bastante para se fazer em se tratando de biotecnologia no melhoramento de medicinais.

Referências Bibliográficas

- AMARAL, C. L. F.; OLIVEIRA, J. E. Z.; CASALI, V. W. D. **Plantas Medicinais e Aromáticas: Avanços no Melhoramento Genético**. Viçosa - MG.: Editora/Departamento de Fitotecnia - UFV., 2001.v.1.155p.
- AMARAL, C. L. F.; OLIVEIRA, J. E. Z.; CASALI, V. W. D. **Plantas Medicinais e Aromáticas: Melhoramento Genético**. Viçosa - MG.: Editora/Departamento de Fitotecnia - UFV., 1999.v.1.153p.
- CALDENTY, K.M.O., HILTUNEN, R. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. **Fields Crops Research**, v.45, p.57-69, 1996.
- DERISI, J.L., IYER, V.R., BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, v.278, p.680-686, 1997.
- LEWINSOHN, E. Molecular biology for the improvement of medical and aromatic plants. **Acta Horticulturae**, v.426, p.443-463, 1996.
- LOWE, K.C. DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant tissue culture: past, present and future. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.2, n.4, p.175-186, 1996.
- PAULS, K.P. Plant biotechnology for crop improvement. **Biotechnology Advances**, v.13, n.4, p.673-693, 1995.
- REES, T.A. Prospects of manipulating plant metabolism. **Trends in Biotechnology**, v.13, p.375-378, 1995.
- SAITO, K., YAMAZAKI, M., MURAKOSHI, I. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. **Journal of Natural Products**, v.55, p.149-162, 1992.
- SIEMENS, J., SCHIEDER, O. Transgenic plants: genetic transformation - recent developments and the state of the art. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.2, n.2, p.66-75, 1996.
- SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspective from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p.1-15, 1996.
- SPRAGUE, G.F., ALEXANDER, D.E., DUDLEY, J.W. Plant breeding and genetic engineering: a perspective. **BioScience**, v.30, p.17-21, 1980.
- STABA, E.J. Milestone in plant tissue culture systems for the production of secondary products. **Journal of Natural Products**, v.48, p.203-209, 1985.
- STEPHANOPOULOS, G.; VALLINO, J.J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. **Science**, v.252, p.1675-1681, 1991.
- VENCOVSKY, R. Melhoramento genético em vegetais. **Ciência e Cultura**, v.38, n.7, p.1155-1160, 1986.
- VERPOORT, R. Metabolic engineering as a strategy to improve the production of secondary metabolites in plants or plant cell cultures. **Acta Horticulturae**, v.457, p.403-409, 1998.
- WETTSTEIN, D. von. Genetic engineering in the adaptation of plants to evolving human needs. **Experientia**, v.39, p.687-713, 1983.
- WOOLHOUSE, H.W. New plants and old problems. **Annals of Botany**, v.60, n.4, p.189-198, 1987. (Suppl.).
- YEOMAN, M.M. Bypassing the plant. **Annals of Botany**, v.60, n.4, p.157-174, 1987. (Suppl.).



Degradação Seletiva de Proteínas e suas Implicações no Câncer

Papel do sistema ubiquitina-proteasoma e enzimas caspases

Humberto Miguel Garay

Aluno de Doutorado do Programa de Farmacologia
do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Juliano Alves

Aluno de Doutorado do Programa de Farmacologia
do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

João Marcelo Ochiucci

Aluno de Iniciação Científica do Depto. de
Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

José Ernesto Belizário

Professor Assistente do Depto. de Farmacologia
do Instituto de Ciências Biomédicas - USP
jebeliza@usp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

As proteínas são responsáveis pela forma e pela função das células. Elas são sintetizadas e destruídas por mecanismos distintos em resposta a uma diversidade de sinais externos e internos, que incluem a secreção de hormônios e a restrição alimentar. A degradação de proteínas determina o início ou o término de eventos bioquímicos que controlam a proliferação, a diferenciação e a morte celular por apoptose. Por esse motivo, o aumento de suscetibilidade ou de resistência à degradação pode levar ao ganho ou à perda de atividade biológica de proteínas, influenciando diretamente nos processos que elas estão envolvidas. Os cientistas já identificaram dezenas de proteínas que se tornaram oncogênicas (isto é: provocaram a transformação celular) após sofrerem modificações em seqüências, domínios e regiões que controlam a sua estabilidade ou destruição. Elucidar os mecanismos moleculares pelos quais as proteínas aumentam sua suscetibilidade ou sua resistência à degradação é o grande desafio da biologia contemporânea pós-genoma. As pesquisas nessa área têm por objetivo não apenas entender como as proteínas são destruídas, mas quando falhas nesse processo dão origem a células imortais, isto é, ao câncer. Neste artigo serão revisados, primeiramente, os recentes avanços na elucidação das bases bioquímicas e genéticas que são envolvidas na transformação de uma célula normal em célula tumoral. Em seguida, serão revisadas as recentes descobertas sobre os mecanismos bioquímicos de reconhecimento e de degradação de proteínas intracelulares pela via ubiquitina-proteasoma e a

importância dos aminoácidos prolina, ácido glutâmico, serina e treonina (região PEST) como sinais para degradação rápida de certas proteínas. Finalmente, será discutida a utilização de bancos de dados de genoma humano e de proteoma - em construção, e como os programas de computador para armazenamento, manipulação e mineração de seqüência de genes provenientes de amostras de tecido tumoral, poderão ajudar os cientistas, principalmente os bioinformáticos, na descoberta de novos oncogenes e métodos de prevenção e tratamento do câncer.

1. Biologia da Célula Tumoral

Nas últimas décadas, com a introdução de novas tecnologias de seqüenciamento do DNA, expressão e análise computacional de genes, foi possível que se vislumbrassem várias pistas que poderão levar a um melhor entendimento da biologia da célula tumoral. O câncer é considerado uma doença genética - isto é, ele pode ser transmitido para uma célula normal através da transferência de genes tumorais ou oncogenes (Hahn & Weinberg, 2002). Oncogenes são cópias de genes normais que sofreram mutações, e dessa forma, quando transcritos, provocam a síntese de proteínas que apresentam perda ou ganho de função biológica. Mutações são causadas por modificações nas bases de DNA, em particular, nas posições O6 e N7 da guanina. A carcinogênese é um processo que pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão, e pode durar de 1 a 30 anos. Durante esse

tempo, ocorre um acúmulo de mutações no genoma celular, em especial, em genes que garantem a ordem dos eventos do ciclo celular e a mitose, ou executam reparo de eventuais erros na replicação do DNA, ou ainda, que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular (Hanahan & Weinberg, 2000, Hahn & Weinberg, 2002).

Na maioria dos casos, os oncogenes capazes de induzir a transformação celular funcionam aos pares, e seus produtos são fatores de crescimento, receptores da membrana plasmática, fatores de transcrição e enzimas quinases de vias de sinalização intracelular implicadas no controle positivo ou negativo do ciclo celular (Hanahan & Weinberg, 2000, Evan & Vousden, 2001). Em geral, as mutações encontradas em oncogenes alteram os nucleotídeos, os quais codificam os aminoácidos de importância crítica para sua ativação ou o arranjo tridimensional da sua estrutura molecular. A deformação de elementos estruturais impede que a proteína estabeleça interações proteína-proteína e proteína-DNA e, conseqüentemente, exerça adequadamente a sua função biológica. Por exemplo, formas mutantes da proteína RAS permanecem constantemente ativadas devido à substituição de um aminoácido indispensável na interação RAS-GAP. GAP é uma proteína que estimula a hidrólise de GTP, uma molécula que ativa RAS. A estimulação contínua da cascata de enzimas serina-treonina-quinases: Raf-MEK-ERK-MAPK, induzida pela forma mutante de RAS, faz com que os eventos bioquímicos de controle positivo do ciclo celular tornem-se constantes e a proliferação celular ininterrupta (Hahn & Weinberg, 2002).

Por outro lado, as deleções de éxons em genes, ou ainda, o seu silenciamento (metilação das bases nitrogenadas), são ocorrências comuns em genes que codificam os fatores supressores de tumor que atuam no controle negativo do ciclo celular. Nesse caso, a desregulação de crescimento e divisão celular acontece porque a célula deixa de checar os erros e as falhas que provocariam bloqueio no ciclo celular, reparo no DNA e indução de morte

celular por apoptose. O exemplo mais estudado é o gene que codifica o fator supressor de tumores chamado p53, cuja função principal é a transcrição de genes de reparo e da apoptose (Hanahan & Weinberg, 2000, Evan & Vousden, 2001).

Recentemente houve uma explosão de trabalhos que mostraram vias alternativas de estimulação da proliferação celular e indução de câncer. Os novos oncogenes identificados têm papel no reparo do DNA, apoptose, reconhecimento célula-célula, mecanismo de adesão célula-matriz extracelular, angiogênese, metástase e degradação de proteínas. O que chamou maior atenção dos investigadores foi a descoberta que para a transformação de células humanas é necessária ativação de telomerase, o que causa a sua imortalização, e a inativação das vias do p53 e RB (Hahn & Weinberg, 2002).

2. O Ciclo Celular

O crescimento e a divisão celular de células somáticas dependem de uma série complexa de reações bioquímicas que ocorrem em um período de 24 a 48 horas, denominado ciclo celular. O ciclo celular compreende os processos de duplicação do DNA e divisão nuclear (mitose), e dele resulta a produção de uma nova célula. Para iniciar um ciclo, a célula em repouso (fase Go) precisa ser estimulada por fatores de crescimento (exemplos, PDGF, EGF, insulina), hormônios esteróides e citocinas produzidas por elas mesmas ou células ao seu redor. Esses fatores ligam-se aos seus receptores de membrana, deflagrando uma série de reações químicas que causam, em última instância, a ativação de fatores de transcrição (exemplos: c-myc, c-jun, c-fos), os quais promovem a síntese de RNA, mensageiros de dezenas de enzimas que promovem a síntese do ácido deoxiribonucleico (DNA), tais como diidrofolato redutase, DNA polimerases e topoisomerases. Essa cascata de eventos químicos e morfológicos ocorre de uma maneira ordenada e sucessiva, fazendo com que a célula avance da fase Go para as fases G1-S-G2 e para a mitose (Malumbres & Barbacid, 2001).

A execução das reações e dos eventos de cada fase do ciclo celular é mediada por dezenas de fatores, cuja síntese e destruição ocorrem em momentos determinados. Os principais são os seguintes: ciclinas A, B e D, enzimas quinases dependentes de ciclinas: CDK-1, 2, 4 e 6, fosfatases: cdc-25 A, B e C, proteínas inibidoras de CDKs: p21, p27, p57, p16, p18, e fatores de transcrição: c-myc, E2F, Rb e p53. Os complexos formados por CDK/ciclina/inibidor de CDK são inativos e a sua ativação requer eliminação, por degradação, do inibidor de CDK associado a ele (por exemplo: p21, p27), um evento que ocorre durante as transições de fases. A ativação dos complexos CDK-4/ciclina D, CDK-4/ciclina-6, CDK-2/ciclina A, CDK-2/ciclina E aumenta a atividade quinase dessas enzimas e provoca a fosforilação progressiva de RB. Isto causa a dissociação do complexo E2F/RB, permitindo que E2F inicie a transcrição de genes da fase S. Mais tarde, a ativação do complexo CDK-1/ciclina B promove a fosforilação de várias proteínas nucleares, a condensação dos cromossomos, a formação do fuso e o início da mitose. A atividade enzimática do complexo cessa após a degradação da ciclina B, e esse evento marca o fim do ciclo celular (Malumbres & Barbacid, 2001). (Figura 1)

As reações e eventos do ciclo celular são interrompidos em momentos específicos nas transições das fases Go/G1 (ponto de restrição R1), fases G1/S e G2/mitose. Durante esses períodos críticos denominados "pontos de checagem", a célula decide se inicia o ciclo (ponto de restrição R1) ou se avança para a fase seguinte, continuando o processo de proliferação, ou se sai do ciclo, iniciando o processo de diferenciação celular, se estiver passando pela mitose, ou ainda, entra em apoptose.

Esse mecanismo de checagem é dependente de reações em cascatas mediada por enzimas quinases e fosfatases. Os exemplos mais estudados de vias de checagem e de reparo são: a via ATM, a via Chk1/Chk2 e a via cdc-25/14-3-3. Em resposta à ativação de uma dessas vias, são sintetizadas as enzimas que fazem reparo, recombinação, junção ou permutação de nucleotídeos e que estão

ção entre ciclo celular e a apoptose é sem dúvida o fator determinante nas variações de sensibilidade à apoptose entre as células tumorais. Este suposto sistema regulador tem servido como base estrutural para unir a genética e a terapia do câncer.

A apoptose é caracterizada por eventos morfológicos e bioquímicos que ocorrem de uma forma ordenada na célula em degeneração. Esses eventos são regulados por genes preservados em vários organismos, incluídas leveduras, parasitas, plantas e insetos. Mais de 200 genes já foram identificados e classificados com base em domínios específicos, como exemplos: DED, DD e CARD (Aravind & Koonin, 2001). Essas seqüências conservadas de aminoácidos estão relacionadas com a função específica que a proteína exerce no processo, como, por exemplo: ligante, receptor, adaptador, inibidor, protease, quinase, etc. Os estudos de cristalografia, ressonância magnética nuclear e difração de raios X têm mostrado em detalhe como os complexos padrões de interação entre essas proteínas, através de seus diferentes domínios, atuam nas vias de sinalização positiva e negativa da apoptose (Fesik, 2000).

A apoptose é desencadeada por duas vias principais. Na primeira via, o sinal vem do lado externo e por isso é denominada via extrínseca. Na segunda, o sinal vem de dentro da célula, e por isso é denominada via intrínseca. A via extrínseca é iniciada através da ativação de receptores de membrana, denominados receptores de morte celular. A via intrínseca é iniciada pela liberação de fatores mitocondriais. Em ambos os casos, o resultado imediato é a ativação de enzimas proteases da família caspase (Figura 2).

As caspases são expressas na forma de pró-enzimas (ou zimógeno) e podem ter uma massa molecular entre 30-60 kDa. A clivagem desse precursor ocorre pela ação de uma caspase iniciadora, que cliva a proteína em duas regiões específicas, para gerar uma subunidade grande de 20 kDa (cadeia α externa) e uma pequena de 10 kDa (cadeia β interna). A forma ativa da enzima possui duas subunidades grandes e duas pequenas, i.e., um tetrâmero $\alpha_1\beta_1\beta_2\alpha_2$, en-

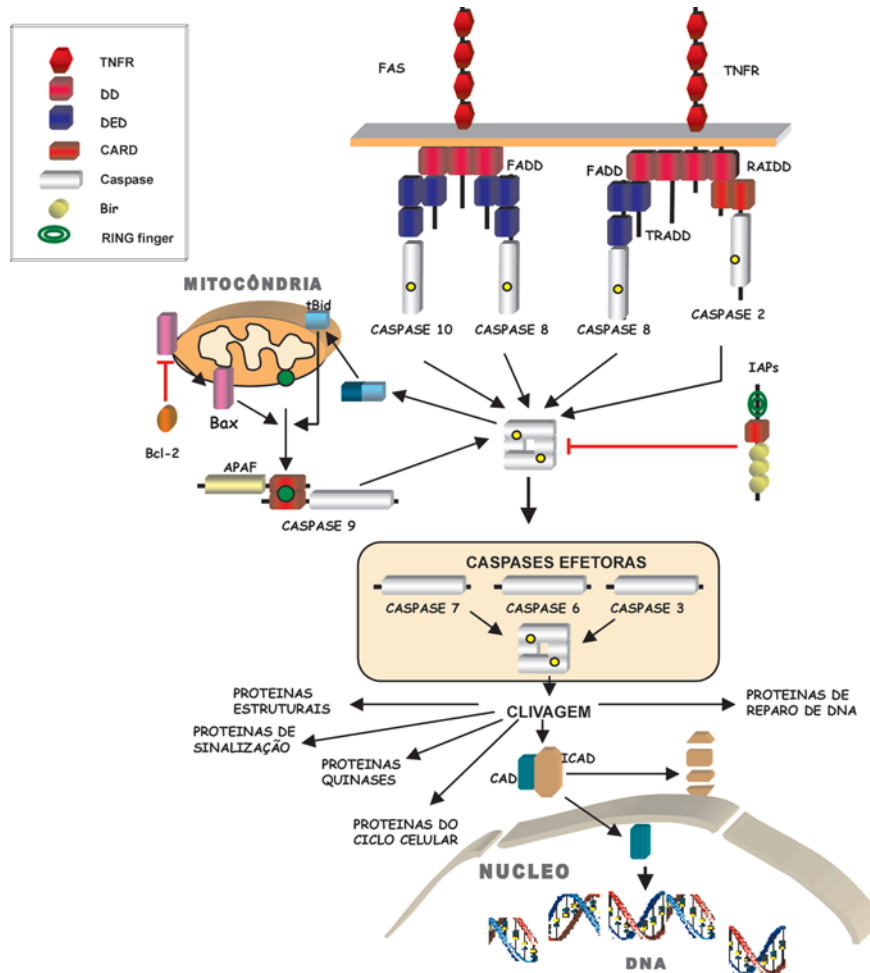


Figura 2 - Esquema representativo das vias de sinalização da apoptose e a ativação em cascata das caspases iniciadoras (2, 8, 9, 10) e efectoras (3, 6, 7) que causam a degradação de proteínas intracelulares. A via extrínseca de ativação da apoptose ocorre com a interação de citocinas aos seus receptores de membrana e conseqüente ativação da caspase-8, 2 ou 10. Na via intrínseca, os eventos químicos e físicos mediados pela proteínas da família BCL-2/BAX provoca a liberação do citocromo c, que provoca a ativação da caspase-9. Na quadra da direita são apresentados os símbolos que representam os principais domínios ou “motifs” das proteínas envolvidas na apoptose.

tre as quais formam-se os dois sítios ativos da enzima (Earnshaw et al., 1999).

As caspases foram divididas em três grupos com base na função que elas exercem no processo. No grupo I, estão incluídas as caspases pró-inflamatórias: caspases -1, -4, -5 e -13, envolvidas no processamento e na geração das citocinas IL-1 e IL-18. No grupo II, as caspases iniciadoras: -2, -8, -9 e -10, atuam na iniciação da cascata de ativação das caspases executoras -3, -6 e -7. Essas caspases fazem parte do grupo III e são responsáveis pela clivagem de dezenas de proteínas vitais ao metabolismo e à estrutura da célula (Earnshaw et al., 1999).

As caspases também foram classificadas em relação à especificidade

na clivagem de peptídeos sintéticos em testes *in vitro* (Thornberry et al., 1997, Garcia-Calvo et al., 1998). Segundo esses estudos, o grupo I é formado pelas caspases -1, -4 e -5, que são as enzimas que têm preferência pela seqüência WEHD. O peptídeo DExD é reconhecido pelas caspases -3, -7 e -2, os principais membros do grupo II. O grupo III é formado pelas caspases -6, -8 e -9, enzimas que clivam preferencialmente peptídeos que contenham a seqüência (LV)ExD. Hoje sabemos que seqüências adjacentes ao sítio de caspases, tanto à direita como à esquerda, também influenciam na clivagem do substrato, como será discutido abaixo.

A ativação das caspases iniciadoras -8, -2 e -10 inicia-se com a

ligação das citocinas da família TNF, Fas ou TRAIL aos seus receptores de membrana, identificados pelas siglas: TNFR1, Fas, DR-3, DR-4 ou DR-5 (Ashkenazi & Dixit, 1998). Esses receptores contêm, em sua estrutura polipeptídica, o domínio DD (death domain), que permite sua associação às proteínas adaptoras FADD e TRADD, que também possuem domínio DD. Esse complexo, por sua vez, interage com a pró-caspase-8 através do domínio DED (death effector domain), para juntos formarem um complexo supramolecular denominado apoptosoma. Dentro desta estrutura multimérica, ocorre a aproximação e a oligomerização de moléculas de pró-caspase-8, as quais promovem sua clivagem e ativação. Uma vez ativa, a caspase-8 inicia a cascata de ativação das pró-caspases executoras; caspases -3, -6 e -7.

A ativação de caspases pela via intrínseca requer a liberação do citocromo *c* armazenado nas mitocôndrias (Adams & Cory, 2001). A saída de citocromo *c* é dependente de uma série de eventos elétricos e químicos, sendo os mais estudados: a queda do potencial de transição de permeabilidade iônica, abertura de megaporos e a ruptura pontual de uma região da membrana externa. Esses eventos são modulados pela interação de proteínas inibidoras de apoptose da família Bcl-2 (principais membros: Bcl-2-W, Bcl-xl, MCL-1) e por proteínas indutoras de apoptose da família Bax (principais membros: Bad, Bid e Bak), capazes de interagir com elementos estruturais da membrana externa das mitocôndrias, como, por exemplo, as porinas que são poros de transição de permeabilidade para várias moléculas, incluídas a H_2O e Ca^{2+} . Essa classificação em indutoras ou supressoras tem como base a presença do domínio BH, que é dividido em BH-1, -2, -3 e -4. Esses domínios provocam a homodimerização de moléculas similares e a formação de poros que permeiam a passagem do citocromo *c* da mitocôndria para o citosol. Por outro lado, a formação de heterodímeros do tipo Bcl-2/Bax evita a formação dessa estrutura e, conseqüentemente, a morte celular (Adams & Cory, 2001).

No citoplasma, as moléculas de citocromo *c* interagem, via domínio CARD, com os complexos formados pela pró-caspase-9 e Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). A união dessas proteínas forma um apoptosoma de aproximadamente 700 kDa, permitindo a aproximação e a oligomerização de moléculas de pró-caspase-9 e sua auto-clivagem e ativação. A caspase-9 livre pode recrutar e ativar as caspases executoras -3, -6 e -7 e as caspases iniciadoras -8, -2 e -10.

Encontradas nos diversos compartimentos celulares, as caspases executoras podem atuar sobre as proteínas estruturais, proteínas de sinalização, fatores de transcrição e várias enzimas envolvidas na síntese e reparo do RNA e DNA. Na tabela I, estão apresentadas algumas das dezenas de proteínas-substrato de caspases. Segundo uma revisão recente, o número de proteínas substratos de caspases é de aproximadamente 280 proteínas (Fischer et al., 2003). A função e os efeitos causados à célula após a clivagem foram também sumarizados no artigo. Em vários casos, a clivagem resulta na inativação das proteínas, mas há também outros casos em que a proteína clivada é ativada. Um exemplo em que a clivagem resulta na ativação é o da ativação da própria caspase. Um outro exemplo é o da proteína ICAD/DFF45 (Enari et al., 1998), um inibidor da nuclease CAD (caspase activated deoxyribonuclease), a enzima responsável pela fragmentação do DNA durante a apoptose. Em células não apoptóticas, CAD está presente como um complexo inativo com ICAD (inibitor of caspase activated deoxyribonuclease). Após a indução da apoptose, ICAD é inativada pelas caspases -3 e -7, deixando CAD livre para funcionar como uma nuclease.

As caspases clivam várias proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto, incluindo gelsolina, fodrina, Gas-2, proteína quinase de adesão focal (FAK), proteína quinase p21, isoformas da proteína quinase C e MEKK-1. A destruição da rede de microtúbulos provoca o arredondamento e o deslocamento da célula do tecido. Várias alterações típicas na morfologia do núcleo apoptótico são

dependentes da ação da caspase-6, a caspase que degrada as lâminas A, B e C do envoltório nuclear. O rompimento dessa estrutura parece facilitar o acesso e degradação das fitas de DNA na região internucleosomal pela nuclease CAD.

A clivagem de substratos de caspases ocorre de uma maneira tempo-dependente e pode anteceder ou proceder à morte por apoptose. Contudo, ainda não se sabe ao certo se a clivagem de uma proteína-chave poderia servir de catalisador do processo, i.e., o processo não se desencadearia sem a sua degradação. Várias linhas de evidências mostraram que a apoptose de células que encontraram defeitos ou erros na replicação do DNA durante a proliferação é dependente da degradação da Rb, fatores inibidores de CDK, p21 e p27 e da proteína MDM2, um inibidor da atividade de p53 (Levkau et al., 1998, Belizário et al., 1991, Belizário et al., 1999, Hiesh et al., 1999). Este postulado foi confirmado em alguns estudos com mutantes das proteínas MDM2 e Rb, nos quais os aminoácidos DEVD - o sítio preferencial de clivagem pela caspase-3 - foram substituídos por aminoácidos neutros. Como era esperado, na ausência de degradação dessas proteínas, as células resistiram à apoptose induzida por vários agentes fisiológicos e farmacológicos (Tan et al., 1997, Fattman et al., 2001). Não há, entretanto, evidências de que uma pressão seletiva na população de células malignas de um tecido tumoral produza células cujas proteínas apresentem mutações em sítios de clivagem de enzimas caspases como um fenômeno geral de resistência à apoptose.

4. O sistema ubiquitina-proteasoma

O sistema ubiquitina-proteasoma é responsável pela degradação de proteínas intracelulares, cuja organização genética e funcional está preservada em certas bactérias, leveduras e organismos multicelulares. Na célula, a proteólise é essencial não apenas para a eliminação seletiva de proteínas defeituosas, como também de proteínas que atuam como reguladores de processos bioquímicos, tais como a prolifera-

ção, diferenciação, biogênese de organelas, resposta imunológica e inflamatória (Ciechanover, 1998, Weissman, 1997, Goldberg et al., 2001). Doenças genéticas, neurodegenerativas e tumores malignos são induzidos quando certos componentes desse sistema de degradação estão ausentes ou desregulados (Ciechanover, 1998).

Diferentemente do processo de degradação mediado por proteases presentes nos lisossomos, a degradação de proteínas por esse sistema requer a energia de ATP e envolve dois passos distintos e sucessivos. No primeiro passo, uma proteína chamada ubiquitina, de peso molecular de 8.5 kDa, é covalentemente adicionada à proteína-alvo. No segundo, a proteína-alvo é degradada após ser desenovelada e fragmentada ao atravessar uma estrutura em forma cilíndrica oca denominada proteassoma (Figura 3).

O proteassoma é constituído de uma parte central que contém 4 unidades que formam um anel, sendo que cada anel é formado por 7 cadeias α e 7 cadeias β distintas. Essa estrutura pode ser representada pela fórmula $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. O coeficiente de sedimentação do proteassoma é igual a 20S. As subunidades β possuem atividade proteolítica e, dessa forma, atuam diretamente na degradação de proteínas. Essas proteases têm especificidade distintas; a primeira possui atividade similar à tripsina, a segunda similar à quimiotripsina e a terceira, similar à glutamyl peptidil hidrolases. Durante a resposta imunológica, o sistema ubiquitina-proteassoma é ativado pelo interferon- γ . Essa citocina induz a síntese de três subunidade β , LMP2, LMP7 and MECL-1, que favorecem a geração de peptídeos da classe I do sistema histocompatibilidade humana (MHS).

Nas extremidades inferior e superior dessa estrutura de 20S, estão acopladas duas estruturas reguladoras de massa molecular igual a 19S. Essas unidades contêm enzimas ATPases, que promovem o desenovelamento das proteínas que sofreram a degradação. A união dessas três estruturas 19S-20S-19S dá origem a um complexo supramolecular de coeficiente de sedimentação 26S e,

aproximadamente, 1500-2000 kDa (Weissman, 1997, Ciechanover, 1998).

A conjugação da ubiquitina ao substrato é feita em um mecanismo de três etapas e requer a participação de três classes de enzimas denominadas E1, E2 e E3. Primeiro, a molécula de glicina da porção C-terminal da ubiquitina forma uma ligação tio-éster com o resíduo de cisteína da enzima ativadora de ubiquitina E1. Essa reação requer a hidrólise de ATP. Até o momento, apenas uma enzima E1 de 117 kDa foi identificada no genoma humano. Em seguida, a ubiquitina ativada é transferida para uma enzima conjugadora de ubiquitina ou E2, também conhecidas por UBCs (ubiquitin-conjugating enzymes). Mais de 25 genes de E2 estão presentes no genoma humano. Em seguida, a E2 transfere a ubiquitina para uma enzima ubiquitina ligase ou E3 (Ubiquitin-protein ligases). As E3 ligam-se ao substrato de uma maneira específica e promovem a transferência da ubiquitina da E2 para o grupamento ϵ -amino de uma lisina na proteína-substrato. Reações su-

cessivas podem ocorrer, levando à formação de substrato com cadeias lineares ou de múltiplas seqüências de ubiquitina (Weissman, 1997, Ciechanover, 1998).

A família de enzimas E3 ligases é a mais abundante na célula humana; são mais de 600 genes preditos; entretanto, até o momento, somente cinco classes principais foram descritas (Ciechanover, 1998, Joazeiro & Weissman 2000). Em geral, as E3s são identificadas pela presença dos domínios Ringer Finger (RF), F-box e WD40, que atuam no recrutamento e na apresentação de proteínas-substrato ao proteassoma (Ciechanover, 1998, Vodermaier, 2001). Ao contrário do que se pensava, as E3 ligases podem reconhecer mais de uma proteína, inclusive proteínas não ubiquitinadas.

No primeiro grupo, estão as enzimas da família E3 α /E3 β . Essas E3 reconhecem proteínas que contenham na porção N-terminal um aminoácido básico (exemplo: Arg, Lys, His) ou um aminoácido hidrofóbico volumoso (exemplo: Phe, Leu, Trp, Tyr, Ile). Essa regra de reconhecimento é denominada "N-

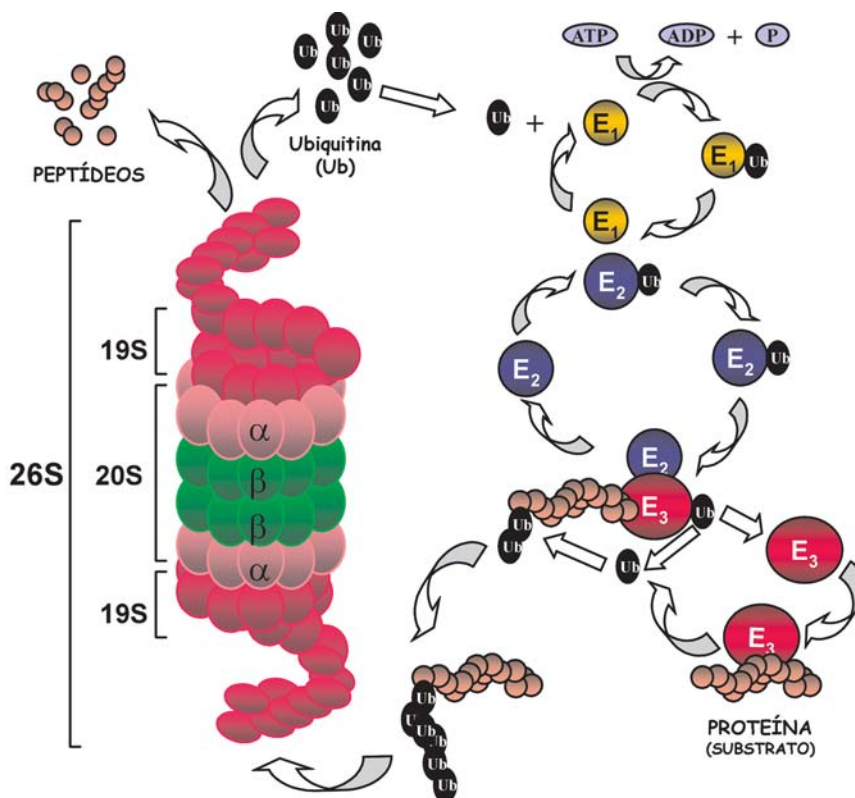


Figura 3 - Esquema representativo mostrando as etapas de ubiquitinação e reconhecimento de uma proteína-substrato pelas enzimas E1, E2 e E3. As proteínas ubiquitinadas são degradadas ao passarem por dentro do proteassoma por enzimas proteolíticas específicas, gerando peptídeos entre 7-12 aminoácidos.

end rule” ou regra do aminoácido N-terminal (Varshavsky, 1992).

O segundo grupo de enzimas E3 tem como membro principal a proteína E6-AP (E6 associated oncoprotein), que foi identificada em um complexo formado com a proteína E6 do papiloma vírus. O complexo recruta e promove a degradação da proteína p53. A degradação de p53 também é promovida pela E3 denominada MDM2 (ver adiante). Essas proteínas, embora de tamanho variados, apresentam um domínio comum na porção carboxi-terminal denominado HECT (homology to the E6-AP carboxyl terminus). Um grande número de proteínas com o domínio HECT já foi identificado.

O terceiro grupo de E3 ligases atuam na degradação de proteínas envolvidas no controle da entrada e saída da mitose. Alguns exemplos de substratos dessas E3 ligases são as ciclinas A e B, securina, cdc5, cdc6, entre outras. A E3 mais estudada nesse grupo é o complexo denominado ciclosoma (C) ou APC (anaphase promoting complex). O complexo pode ter até 10 subunidades (exemplos: cdc16, 20, 26, 27, Apc4, 5, 6) cuja síntese e degradação ocorre de uma maneira dependente dos eventos do ciclo celular (Zacharia & Nasmyth, 1999).

O grupo quatro tem como exemplo mais estudado o complexo “Skp1-cullin-F-Box” ou SCF (Pray et al., 2002). A parte central do complexo é formado pelas proteínas Cul1 (culina 1) e Roc1 (proteína “Ringer finger”) e Skp1. A Skp1 é um dos membros da família de proteínas F-Box. Essas proteínas ligam-se especificamente às proteínas-substratos de E3 ligase. As E3 ligases da família SCF atuam na degradação de componentes do ciclo celular que controlam a transição G1/S. Entre eles estão os inibidores de enzimas CDKs, p21 e p27, e as ciclinas A e E. Em geral, essas proteínas são fosforiladas pelos complexos CDK/ciclina antes de serem reconhecidas pelas proteínas F-Box do complexo E3 (King et al., 1996). Recentemente foi demonstrado que o complexo SCF também pode participar na ubiquitinação das proteínas β -catenina e I κ B (Winston et al., 1999).

O quinto grupo de E3 possui vários membros cuja característica principal é a presença do domínio “Ring Finger” (RF). O domínio RF, definido como uma sequência linear de extensão e estrutura variável, que pode ser representada pela seguinte fórmula: Cx2Cx(9-39)Cx(1-3)Hx(2-3)C/Hx2Cx(4-48)Cx2C, onde C corresponde aos resíduos de cisteína e H aos resíduos de histina, e X a qualquer outro aminoácido. A principal propriedade química da região RF é a captura de duas moléculas de zinco. Não obstante, a maioria das proteínas com domínio RF apresenta atividade E3 e auxilia na transferência de ubiquitina de uma molécula E2 para a proteína-substrato (Joazeiro & Weissman, 2000; Freemont, 2000). Exemplos de moléculas E3 com domínio RF são as proteínas MDM2, BRCA e Siah-1. Um outro exemplo de proteína com domínio RF e atividade E3 é a proteína VHL, responsável pela síndrome von Hippel Lindau (pVHL). A proteína VHL pode se associar às elonginas B, C e culina2, dando origem ao complexo VBC, que tem as mesmas características dos complexos APC e SCF.

Survivin, XIAP-1, IAP-1 e c-IAP-2 fazem parte da família IAPs (inibitor-of-apoptosis), que atuam como inibidores da ativação das enzimas caspases, e que também apresentam, na porção C-terminal, o domínio RF (Deveraux & Reed, 1999). Além disso, essas proteínas são identificadas por apresentarem, na porção N-terminal, uma sequência de aminoácidos chamada de domínio BIR. O domínio BIR é representado pela expressão: Cx2Cx6Wx3Dx5Hx6C. A presença de resíduos de cisteína e histidina pressupõe uma possível estrutura ligadora de zinco, mas não se sabe ao certo se outras propriedades do domínio BIR seriam responsáveis pela inibição da atividade enzimática das caspases. Por outro lado, está bem estabelecido que o domínio RF tem papel no processo de ubiquitinação de várias caspases (Huang et al., 2000; Joazeiro & Weissman, 2000). A ubiquitinação é uma evidência experimental que sugere a degradação de caspases via ubiquitina-proteasoma, mas isto ainda não foi amplamente estudado.

5. A degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer

A falha na ubiquitinação e conseqüente ausência de degradação pelo sistema ubiquitina-proteasoma pode modificar a atividade de pro-oncogenes e facilitar o desenvolvimento de tumores malignos. Mutações e deleções que interferem na degradação foram encontrados nos seguintes pro-oncogenes: β -catenina, p53, c-Jun, E2F, ciclinas A, B, D e E e p27 (Loda et al., 1997, Rubinfeld et al., 1997, Gstaiger et al., 2001).

A proteína β -catenina é um dos componentes de uma via de sinalização que promove a ativação dos fatores de transcrição LEF e TCF. Esses fatores atuam na proliferação de linfócitos T, e, em particular, na indução da síntese dos genes da ciclina D e c-myc. Foi verificado que certas mutações na β -catenina aumentam sua estabilidade e o tempo de sinalização de proliferação celular na célula mutante. A estabilidade da proteína β -catenina também é modificada por mutações encontradas em um outro gene que participa dessa via de sinalização, o gene APC (adenomatous polyposis coli). O APC é um fator supressor de tumores e tem papel chave na indução de polipose e adenoma do cólon instestinal (Fodde et al., 2001). Além disso, a mutação de β -catenina também interrompe a via de sinalização da proliferação mediada pela E-caderina da membrana celular e das proteínas da matriz extracelular (Rubinfeld et al., 1997).

Recentemente descobriu-se que a agressividade de carcinoma do cólon retal, carcinoma da mama e carcinoma da próstata está associada ao aumento da degradação da p27, o inibidor de CDKs que controla o ciclo celular (Loda et al., 1997). O mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está bem definido, mas estudos recentes mostraram que a proteína Skp2, uma F-box proteína, envolvida no reconhecimento da proteína p27, parece ter um papel chave na oncogênese (Gstaiger et al., 2001). GSTAIGER e colaboradores mostraram que o gene dessa proteína é superexpressado em displasias da epiderme e no carcinoma epitelial da boca. Mais importante

ainda, eles mostraram que fibroblastos normais, que expressam os genes H-Ras mutados, e o Skp2, adquiriram as propriedades biológicas de uma célula tumoral nos testes *in vitro* e *in vivo*. Quando essas células eram injetadas em camundongos *nude*, observou-se também a rápida formação de tumores malignos (Gstaiger et al., 2001).

Em aproximadamente 90% dos cânceres da cervix é detectada a expressão das proteínas E6 e E7 de papiloma vírus tipos 16 e 18 (Evan & Voudsden, 2001). Como discutido, as proteínas E6 são homólogas a uma classe de proteínas E3, denominada E6-AP, as quais atuam no recrutamento e ubiquitinação da p53. A produção excessiva de proteína E6 em células infectadas pelo papiloma e a subsequente degradação de p53, via ubiquitina-proteasoma, são eventos iniciais na transformação tumoral mediada por esses vírus (Huibregtse et al., 1995).

Várias proteínas E3, incluindo MDM2, BRCA, Siah-1, Cb1 e PML, foram envolvidas direta ou indiretamente na transformação celular (Freemont, 2000). Foi observado que uma mutação pontual no domínio RF da BRCA1 – uma proteína envolvida no reparo do DNA, predispõe as mulheres portadoras desta mutação ao câncer de mama e de ovário (Baer & Ludwig, 2002). Outro exemplo é a proteína VHL, responsável pela síndrome von Hippel Lindau. Mutações no gene da VHL bloqueiam sua ação E3, responsável pela inativação do fator HIP (hipoxia inducing factor). Com o aumento de estabilidade do HIP, é possível o desenvolvimento de certos tumores malignos em indivíduos portadores dessa síndrome (Tyers & Jorgensen, 2000).

Survivina, uma E3 da família IAP de inibidores de caspases, parece ter um papel relevante na indução de câncer. Foi observado que sua expressão é aumentada na transição G2/M do ciclo celular quando ela se liga aos fusos de microtúbulos do aparato mitótico. Esta associação previne a apoptose induzida pelo taxol. Sabe-se também que a superexpressão de IAP é um marcador de prognóstico ruim de evolução da doenças em pacientes portadores de neuroblastoma, cânceres do colo uterino e gástrico (Deveraux & Reed, 1998).

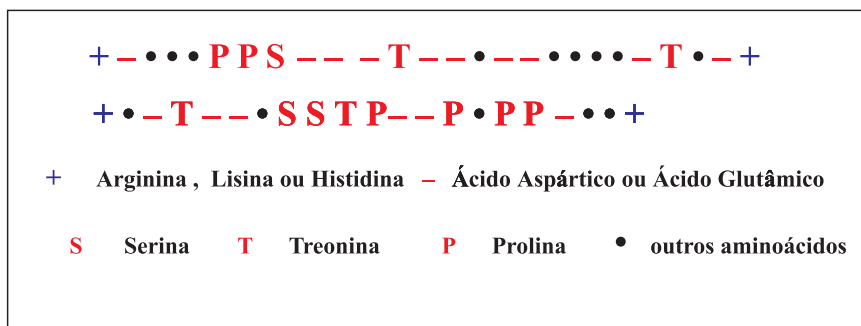
6. A região PEST como um sinal que promove a degradação rápida de proteínas

Além da ubiquitinação, a presença de certas regiões e seqüências na estrutura primária das proteínas pode funcionar como um sinal que define o seu tempo de meia-vida dentro da célula. Várias seqüências de aminoácidos foram identificadas como “sinais proteolíticos” para a degradação por enzimas lisosomais (exemplo, catepsina), calpains e sistema ubiquitina-proteasoma (Dice, 1990, Rechsteiner & Rogers, 1996).

Correlacionando as taxas de degradação de dezenas de proteínas e as suas seqüências de aminoácidos, ROGERS, WELLS e RECHSTEINER (1986) mostraram que as proteínas, com um tempo médio de degradação inferior a 2 horas, apresentam um grupo conservado de aminoácidos. Essa região, que pode ter de 10 a 50 aminoácidos, é rica em prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T), e flanqueada na extremidade N e C-terminal, por um aminoácido positivo, como a arginina,

lisina ou histidina. A região PEST, como foi chamada, tem um número e a ordem de aminoácidos variável, bem como a sua extensão (Figura 4). Ela pode estar presente 5 vezes em uma proteína de 300 aminoácidos. Devido às características químicas desses aminoácidos de carga negativa, a região PEST aumenta a retenção de moléculas de H₂O e íons Ca²⁺ (Rechsteiner & Rogers, 1996). Além disso, os aminoácidos serina e treonina das proteínas contendo a região PEST são alvos de fosforilação por várias enzimas quinases. Como as regiões PEST nunca são seqüências repetitivas e idênticas, acredita-se que a estrutura secundária, em forma de laço (loop), sirva como local de ligação de outras proteínas ou enzimas, em particular, E3 ligases, mas isto ainda não foi definido.

Após essa descoberta, vários grupos mostraram que a deleção ou a substituição de aminoácidos da região PEST aumenta a estabilidade da proteína, isto é, impede a sua rápida degradação. Em geral, a função biológica da proteína sem o PEST é dramaticamente aumentada (Rechsteiner & Rogers, 1996).



MCL1
(350 aa)

¹⁰⁴ RAAPLEEMEAPAAADAIMSPEEELDGYEPEPLGK ¹³⁶

6.19

CASP9
(416 aa)

²⁹⁴ HGFEVA STSPEDES PGSNPEPDAT PFEGLR ³²⁴

12.40

IFI16B
(682 aa)

¹⁷⁰ KTSLSAPPNSSSTENPK ¹⁸⁶

10.62

Figura 4 - Diagrama representativo de uma região PEST. Nesta seqüência aleatória de aminoácidos estão intercalados os aminoácidos designados pelos seus símbolos alfabéticos citados ou figuras representativas (–, +, •). As proteínas MCL1, caspase-9 e IFI16B são exemplos de proteínas que apresentam regiões PEST com um índice PEST indicado.

A região PEST está presente em várias proteínas diretamente envolvidas na etiologia do câncer. Exemplos mais relevantes são MYC, RAS, FOS, JUN, PTEN, p53, EIA, ciclinas A, B, inibidores de CDKs, p21 e p27, β -catenina e NF-kB (Rechsteiner & Rogers, 1996).

A PTEN é um fator supressor de tumores, cujo gene aparece deletado ou mutado em gliomas e cânceres do endométrio. A proteína PTEN atua como enzima fosfatase e, sob sua ação, o fosfolípido PIP_3 (fosfoinositol-3-fosfato) é desfosforilado, tornando-se inativo. O PIP_3 atua na ativação da enzima quinase B (PKB), mais conhecida por Akt. A Akt exerce uma função anti-apoptótica, promovendo a fosforilação e inativação da caspase-9 e BAD, um dos membros da família BAX de proteínas pró-apoptóticas (Cardone et al., 1998). Mutações no gene PTEN, que causam gliomas e câncer do endométrio, geralmente ocorrem na região PEST. A oncogênese, nesse caso, é, em parte, produzida pela produção excessiva de PIP_3 (fosfoinositol) e a ativação contínua da via

Akt de sobrevivência celular. De fato, estudos de mutações sítio-dirigidas mostram que a ausência da região PEST provoca a desestabilização da estrutura secundária da proteína e compromete sua atividade enzimática (Georgescu et al., 1999).

7. A região PEST e o sítio de clivagem de enzimas caspases

Através da consulta de vários bancos de dados do genoma humano (exemplo: National Center For Biotechnology Information, NCBI) e o uso do programa PESTFind (Rechsteiner & Rogers, 1996) e um programa similar desenvolvido em nosso laboratório realizamos um estudo para identificar a presença da região PEST dentro do sítio de clivagem em uma amostragem de proteínas-substrato de enzimas caspases. A motivação para este estudo veio de uma descoberta inicial feita durante a análise da presença de região PEST na família de enzimas caspases. Nesse grupo particular de proteínas notou-se que o sítio de

clivagem (exemplo; DEVD) encontrava-se dentro da região PEST em 10 de um total de 12 enzimas caspases analisadas. Desta forma, a hipótese é que o sítio de reconhecimento de caspase não seja de apenas 4 aminoácidos, mas uma região estendida de 20 a 30 aminoácidos, i.e., a região PEST.

Em seguida, foram analisadas todas as proteínas-substrato de caspases descritas na literatura. Nesse grupo de 144 proteínas, a presença do sítio de clivagem dentro da região de PEST foi detectada em 63% (90/144) da amostragem de proteínas. No restante, 37% (54/144) das proteínas-substrato de caspases, o sítio de clivagem foi encontrado em um local distante da região PEST (Tabela 1). Estas proteínas foram agrupadas em 8 categorias, de acordo com as funções que exercem em diferentes processos biológicos como apoptose, ciclo celular, doenças neurodegenerativas, ou localização celular (Tabela 1). Algumas dessas proteínas foram identificadas no quadro. Elas podem atuar como citocinas, receptores de membrana, fatores de

Tabela 1 - Relação de proteínas-substratos de caspases contendo o sítio de clivagem da região PEST

Categoria Exemplos	Sítio de caspase dentro do PEST		
	Sim	Não	Total
Proteínas Estruturais e do citoesqueleto			
Gelsolina, citoqueratina, catenina, actina, filamina, Gas-2, Foldrina, Plectina, Tau, Vimentina, Rabaptina	14	5	19
Proteínas Nucleares			
Laminas A, B, C, NuMa, HnRNPs, MDM2, SAF-A, RNA helicase, SATB-1 LAP2a, Nup153	6	4	13
Proteínas do Metabolismo de DNA			
PARP, RFC140, DNA topoisomerase, MCM3, PKcs-DNA, DNA helicase, RAD51, BRCA1, acinus	6	8	15
Proteínas Quinases			
PKC (ϵ , δ , τ), PKC-related quinase, CaMK IV, Mst1, Fyn, FAK, MEKK1, Raf1, Akt, Wee1, Src, RIP quinase, P58FYN	15	9	26
Proteínas da tradução de sinais e transcrição gênica			
Pro-interleucinas 1, 16, 18, D4-GDI, PP2A, cPLA2, STAT1, NF-kB, SREBP-1 3 2, calpastatina, PLC- δ , Cb-1, Erb-2, NRF2, PDE 6, 5A e 10A, MAX, Calcineurina A, Fatores de Transcrição AP-2A, ROCK1, GATA-1, TIAM	17	13	32
Proteínas Reguladores do Ciclo Celular e Apoptose			
p21, p27, pRB, CDC27, nedd4, ciclina A, Bcl-xL, FLIP, Bid, Bax, BAD, ICAD, XIAP, hIAP, HSP90, Caspases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, TRAF	20	9	29
Proteínas envolvidas em doenças Neurodegenerativas			
Huntingtina, Atrofin-1, Presenilina-1, 2, APLP2, ataxina-3, Calsenilina, APP, LEDGF, Receptor Androgênio	9	1	10
Outras categorias			
PA28 γ , O-Glicosidade, receptor AMPA, GRASP65, Cálcio-ATPase, GRASP-1	3	5	9
Totais	90	54	144
Porcentagens	63%	37%	100%

transcrição, enzimas quinases, proteases, proteínas do citoesqueleto, citoplasmáticas, nucleares, e várias outras funções não especificadas.

A presença do sítio de clivagem de caspases dentro da região PEST deve ter uma finalidade biológica que ainda não se conhece. Uma hipótese é que essa região determinaria a degradação rápida da proteína pela via ubiquitina-proteasoma. De fato, estudos já mostraram que as IAP funcionam como E3 ligases, promovendo a ubiquitinação de caspases (Huang et al., 2000). Estudos em andamento no nosso laboratório mostraram que a substituição de certos aminoácidos (S199A, T201A) da região PEST da caspase-7 impedem a sua autoativação. É possível, portanto, que a região PEST funcione como um sítio de regulação de ativação de caspase. Possivelmente, o PEST funcionaria como um elemento estrutural de reconhecimento que induz a ativação intra ou intermolecular da proforma da enzima.

Em resumo, os dados apresentados nesse estudo revelaram várias pistas ou hipóteses a serem confirmadas através de trabalhos de bancada que envolvem a mutação sítio-dirigida de genes e a produção de proteínas modificadas para realização de ensaios funcionais. Acredita-se que esses ensaios possam revelar fatos importantes sobre o potencial oncogênico

das proteínas que contenham regiões PEST ainda não reveladas em estudos convencionais de investigação científica (Figura 5). Ressalte-se que existe uma predição de que, pelo menos, um terço das proteínas codificadas pelo genoma humano, isto é, 10 mil proteínas de um universo de 30 mil proteínas possuam regiões PEST (Rechsteiner & Rogers, 1996).

8. Perspectivas

Os bancos de dados gerados por sequenciamento de genes provenientes de tecido normal e tumoral são excelentes provedores de informações para os estudos que visem à análise de possíveis alterações funcionais de proteínas devido a defeitos nos mecanismos que levam à sua destruição. Esta análise tem sido facilitada pelo conhecimento de sítios, regiões e seqüências de reconhecimento de degradação de proteínas, bem como pela identificação de dezenas de famílias de proteínas e enzimas envolvidas nos diferentes processos de proteólise via ubiquitina-proteasoma e a proteólise mediada por enzimas caspases. A identificação destas modificações poderia ajudar a predizer falhas nas interações com os elementos da maquinaria de degradação celular; desenvolver estratégias de inibição ou de ativação dos processos; e, finalmente, propor novas

alternativas profiláticas e terapêuticas.

Entender a origem e a progressão do câncer através da análise de seqüências, regiões e domínios na estrutura das proteínas que servem de sinalização e reconhecimento para sua degradação é o grande desafio do momento. Para vencer esse desafio é preciso ter a cooperação de vários grupos de cientistas especializados em sequenciamento e clonagem de genes, expressão de proteínas recombinantes e, em especial, a cooperação de uma nova classe de pesquisador, o bioinformata, cuja principal ferramenta é o computador. Cabe a esse profissional a análise de conjuntos de dados em grande escala e a formulação de hipóteses que serão executadas por seus colegas. Essa forma inovadora de pesquisa é decisiva para entender a biologia da célula em toda a sua complexidade.

9. Referências Bibliográficas

- Adams JM, Cory S (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26(1): 61-66.
- Aravind L, Dixit VM, Koonin V (2001). Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* 291: 1279-84.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- Baer R, Ludwig T (2002). The BCRA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Genet Dev* 12: 86-91.
- Belizário JE, Dinarello CA (1991). Interleukin-1 β , interleukin-6, TNF- α and TGF- β 1 increase cell resistance to TNF- α by growth arrest in the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 51: 2379-85.
- Belizário JE; Sherwood SW; Beçak W (1999). Induction of apoptosis by tumor necrosis factor and butyrolactone, a chemical inhibitor of cyclin dependent kinases. *Braz J Med Res* 32: 473-82.
- Cardone MH, Roy N, Stennincke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998).

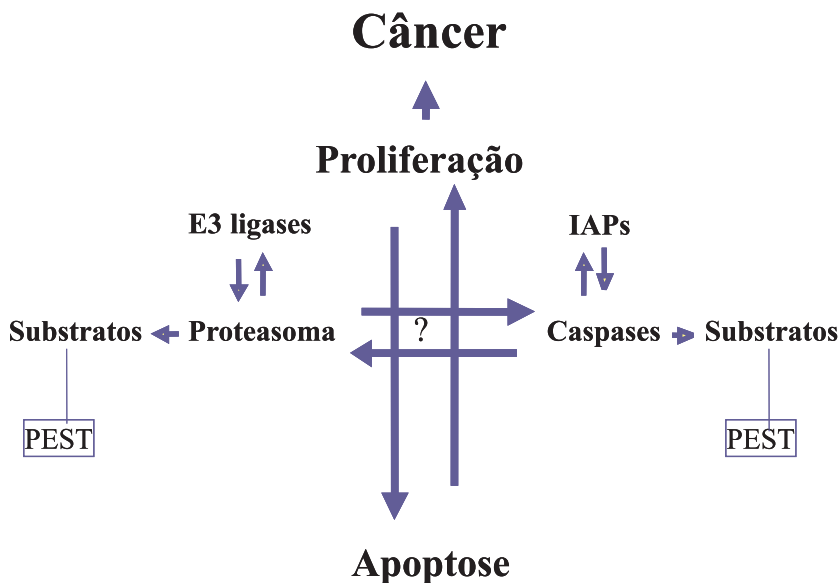
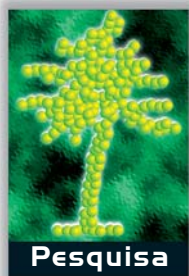


Figura 5. O esquema mostra possíveis etapas na regulação da proliferação e morte celular que quando alteradas por degradação seletiva e inapropriada, ou, a ausência de degradação, pode levar a produção de proteínas oncogênicas. Uma condição específica que pode levar a estas disfunções é a alteração por mutações ou deleção de aminoácidos da região PEST, um elemento chave para o reconhecimento e eliminação de proteínas oncogênicas pelas enzimas caspases e sistema ubiquitina-proteasoma.

- Regulation of cell death protease caspases-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321.
- Ciechanover A (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17: 7151-7160.
- Deveraux QL, Reed JC (1999). IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes & Develop.*, 13: 239-52.
- Dice JF (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 15(8): 305-9.
- Earnshaw W, Martins LM, Kaufmann S (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.
- Enari M; Sakahira H; Hokoyama H; Okama K; Iwamatsu A; Nagata S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391: 43-50.
- Evan G, Littlewood T (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281: 1317-1322.
- Evan G, Vousden KH (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348.
- Fattman CL, Delach S, Dou QP, Johnson DE (2001). Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase 3 and 7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 20: 2918-26..
- Fesik SW (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103: 273-282.
- Fodde R, Smits R, Clevers H (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Rev* 1: 55-67.
- Freemont PS (2000). Ubiquitination: ring for destruction. *Curr Biol* 10: R84-87.
- Fisher U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Diff* 10: 76-100.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry, NA (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273: 32608-32613, 1998.
- Georgescu M-M, Kirsch KH, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H (1999). The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxy-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10182-87.
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W (2001). Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *PNAS* 98: 5043-5048.
- Hahn W, Weinberg RA (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Rev.* 2: 231-341.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hsieh J-K, Chan FSG, O'connor DJ, Mitnacht S; Zhon S, Lu X (1999). RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* 3: 181-193.
- Hoeijmakers JHL (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374.
- Huang H-K, Joazeiro CAP, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD, Hunter T (2000). The inhibitor of apoptosis cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes *in vitro* monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* 275:26661-64.
- Joazeiro CAP, Weissman AM (2000). Ring finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102: 549-552.
- King RW, Deshaies RJ, Peters J-M, Kirschner MW (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274: 1652-1658.
- Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross JM (1998). Cleavage of p21 and p27 mediates apoptosis in endothelial cell through activation of cdk2: role of a caspases cascade. *Mol Cell* 1: 553-563.
- Loda M, Cukor B, Tam S W, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinases inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med* 3(2): 231-234.
- Malumbres M, Barbacid M (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature* 1: 222-231.
- Murray GM, Kirschner MW (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349: 132-38.
- Pray TR, Parlatu F, Huang J, Wong BR et al., (2002). Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resistance Updates* 5: 249-258.
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-71.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-8.
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polaskis P (1997). Stabilization of β -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275: 1790-1792.
- Sadis S, Atienza Jr C, Finley D (1995). Synthetic signals for ubiquitin-dependent proteolysis. *Mol Cell Biol*, 15: 4086-4094.
- Stennicke HR, Salvesen GS (1997). Biochemical characterization of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* 41: 25719-25723.
- Tan X, Martin SJ, Green DR, Wang JYJ (1997). Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor- and CD95-induced cell death. *J Biol Chem* 272: 9613-9616.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Raper, DM, Timkey T, Garcia-Calvo, M., et al. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *J Biol Chem* 272: 17907-17911.
- Tyers M, Jorgensen P (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev* 10: 54-64.
- Varshavsky A (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci. USA* 93: 12142-49.
- Vodermaier HC (2001). Cell cycle: waiters serving the destruction machinery. *Curr Biol* 11: R834-37.
- Weisman AM (1997). Regulating protein degradation by ubiquitination. *Immunol Today* 190: 189-197.
- Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. (1998). The SCF-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B and β -catenin and stimulates I κ B ubiquitination *in vitro*. *Genes Dev* 13: 270-283. 



Archaea: Potencial Biotecnológico

Utilização e aplicação de arqueas na biotecnologia

Alexander Machado Cardoso

Departamento de Bioquímica Médica,
Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.
amcardoso@bioqmed.ufrj.br

Maysa B. Mandetta Clementino

Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional
de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ.
maysa@incqs.fiocruz.br

Orlando Bonifácio Martins

Departamento de Bioquímica Médica,
Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.
omartins@bioqmed.ufrj.br

Ricardo Pilz Vieira

Departamento de Biologia Marinha,
Instituto de Biologia, UFRJ.
pilz@bioqmed.ufrj.br

Rodrigo Volcan Almeida

Programa de Engenharia Química,
COPPE, UFRJ.
volcan@peq.coppe.ufrj.br

Sylvia M. Campbell Alquerres

Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de
Ciências Biomédicas, UFRJ.
alquerres@bioqmed.ufrj.br

Wellington Inácio de Almeida

Departamento de Bioquímica Médica,
Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.
wellington@bioqmed.ufrj.br

Ilustrações cedidas pelos autores

1. Introdução

O domínio *Archaea* é formado principalmente por organismos extremofílicos, isto é, microrganismos que não apenas toleram, mas crescem otimamente em ambientes normalmente considerados inóspitos para a vida, como fontes termais, águas extremamente salgadas, temperaturas baixas e condições extremas de pH. Pode-se dizer que certas espécies de arqueas definem claramente os limites de tolerância biológica nos extremos físicos e químicos da vida. O estudo dos microrganismos provenientes desses ambientes extremos pode nos fornecer informações valiosas acerca da origem da vida na Terra, bem como das estratégias adaptativas aos ambientes onde esta prosperou (Woese, 1998).

A adaptação de organismos a esses ambientes obrigou-os a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas para sua sobrevivência. Por outro lado, devido às características “exóticas” que têm, e às suas propriedades únicas, esses microrganismos geram bioprodutos que podem ser empregados em condições drásticas, que freqüentemente ocorrem em processos industriais. Os componentes moleculares deles retirados possuem muitas vezes propriedades que os tornam especialmente adequados para serem utilizados nesses processos. Nesse contexto, é hoje geralmente aceito que esses microrganismos constituem um precioso repositório de moléculas de interesse industrial e um excelente recurso para o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas.

Os benefícios científicos esperados de um conhecimento maior da biologia das arqueas incluem, entre outros, a compreensão das funções exercidas por esses organismos nos ambientes aquáticos e terrestres, bem como suas interações com outros componentes da biodiversidade. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para obtenção de agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, biorremediação e biolixiviação de poluentes e recuperação de minérios. Outros benefícios incluem a otimização da capacidade microbiana para processamento de alimentos, tratamento e/ou remediação de resíduos (esgoto doméstico e lixo). Embora ainda não sejam totalmente conhecidas as estratégias moleculares para sua sobrevivência em tais ambientes inóspitos, sabe-se que esses organismos possuem enzimas adaptadas a tais ambientes, e isso desperta o interesse tanto acadêmico quanto industrial.

2. Filogenia e Fisiologia

Há cerca de vinte anos, Carl Woese e colaboradores sugeriram que os organismos vivos fossem classificados em três grupos principais: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*, com base no estudo das seqüências das moléculas do gene 16S do RNA ribossomal (16S rRNA). Esses grupos são chamados de domínios e acredita-se que surgiram através de

Tabela 1: Diferenças fundamentais entre os três domínios.

Características	Bactéria	Archaea	Eucarya
Membrana nuclear	Ausente	Ausente	Presente
Número de cromossomos	1	1	>1
Parede Celular	Peptideoglicano	Pseudo-peptideoglicano, glicoproteínas e outros	Celulose em plantas, quitina em fungos e nenhuma em animais
Mureína na parede celular	Sim	Não	Não
Lipídeos da membrana celular	Glicerídeos ligados a éster, não ramificado; saturado ou mono-insaturado	Isoprenóide; glicerol diéter ou di-glicerol tetraéter	Glicerídeos ligados a éster; não ramificado; poli-insaturado
Organelas (mitocôndria e cloroplastos)	Ausente	Ausente	Presente
Ribossomo	70S	70S	80S
Síntese de proteínas inibida por cloranfenicol e estreptomicina	Sim	Não	Não
Síntese de proteínas inibida pela toxina da difteria	Não	Sim	Sim

vias evolutivas distintas a partir de um ancestral comum. A noção de dicotomia da vida entre eucariontes e procariontes, que ainda domina a biologia e influencia, em particular, a percepção sobre o domínio *Archaea*, está sendo lentamente revista por grupos atuantes em microbiologia. A diversidade e a biologia das arqueas representam uma enorme contribuição à compreensão da Ecologia Microbiana (Woese *et al.*, 1990).

O domínio *Archaea* consiste de três divisões: *Crenarchaeota*, que contém as arqueas hipertermofílicas redutoras de enxofre; *Euryarchaeota*, que compreende uma grande diversidade de organismos, incluídas as espécies metanogênicas, as halofílicas extremas e algumas espécies hipertermofílicas; e *Korarchaeota*, uma divisão descrita mais recentemente, que engloba organismos hipertermofílicos pouco conhecidos, identificados a partir de seqüências do gene 16S do rRNA isolados de fontes termais terrestres, porém ainda não cultivados em laboratório.

Após serem divididos os três grandes domínios a partir do seqüenciamento do 16S rRNA, estudos subseqüentes mostraram que cada domínio está associado a uma série de fenótipos. Alguns desses fenótipos

são únicos de cada domínio, enquanto outros são compartilhados entre dois ou até entre todos os três domínios, como pode ser observado na Tabela 1.

3. Ambientes extremos

Os primeiros organismos identificados pertencentes ao domínio *Archaea* viviam em ambientes extremos de temperatura, salinidade ou acidez, sugerindo que a preferência por tais habitats, era um traço característico do grupo. Estudos mais recentes mostraram várias eubactérias e organismos eucarióticos que sobrevivem também em ambientes extremos, como observaram igualmente a presença de arqueas em ambientes mais amenos, demonstrando, dessa forma, a contribuição desse grupo na biomassa global (Forterre, 1997). Entretanto, as arqueas parecem ser os únicos organismos descobertos até o presente momento que podem sobreviver a temperaturas acima de 95°C, e o fenótipo hipertermofílico só é encontrado nesse domínio da vida. Uma outra característica exclusiva de *Archaea* é o metabolismo metanogênico: não se conhecem eubactérias nem eucariotos capazes de produzir metano como resíduo de seu metabolismo.

O habitat das arqueas halofílicas extremas é hipersalino e as espécies em cultivo laboratorial requerem para o crescimento, entre 1,5 a 4 M de NaCl, o que significa um ambiente com cerca de 10 vezes a salinidade encontrada na água do mar. As metanogênicas são organismos obrigatoriamente anaeróbios e liberam gás metano (CH₄) como resíduo metabólico. São encontradas em ambientes com ausência de oxigênio e abundância de matéria orgânica, como pântanos, açudes, lagos, sedimentos marinhos e rúmen de bovinos. Elas retiram hidrogênio e gás carbônico desses ambientes e os utilizam em seu metabolismo. Vivem como simbioses de uma grande variedade de protozoários também anaeróbios, convertendo produtos finais de fermentação em gás metano. São de grande importância ao ambiente em que vivem pela alta eficiência de sua enzima hidrogenase que, mantendo uma baixa pressão parcial de H₂ para que a metanogênese ocorra, permite que os demais organismos fermentadores façam reoxidação do NADH, o que corresponde a um maior rendimento de ATP e um aumento da biomassa (Brock *et al.*, 1994).

As arqueas termoacidófilas compõem um grupo heterogêneo, defini-

Tabela 2: Estratégias de adaptação das arqueas aos ambientes extremos.

Ambiente	Problemas	Mecanismos de adaptação
Hipersalino	Lise celular por diferença de pressão osmótica	Mantém altas concentrações de K ⁺ intracelularmente
		A parede celular é composta por glicoproteínas que tem uma maior porcentagem de aminoácidos ácidos que atraem os íons Na ⁺ para o redor da célula. A ligação dos íons com a parede celular estabiliza esta, impedindo a lise
	Desnaturação das proteínas	Essas proteínas expõem aminoácidos de carga negativa, de maneira que, quando os íons positivos entram em contato com a proteína, esta é estabilizada
Altas temperaturas	Lise celular	Maior rigidez da parede celular
	Desnaturação do DNA	Maior quantidade de histonas
		Maior empacotamento do DNA
	Desnaturação das proteínas	Aumento do número de pontes de hidrogênio
		Aumento das interações hidrofóbicas
		Menor porcentagem de aminoácidos termolábeis
Baixas temperaturas	Inativação das proteínas	Menor quantidade de pontes de hidrogênio, dissulfeto e interações hidrofóbicas, o que aumenta a flexibilidade da proteína

do pela capacidade dos organismos de crescerem em altas temperaturas que vão de 55°C a 85°C, com pH que varia de 1,0 até 6,0. O gênero *Sulfolobus* apresenta parede celular composta principalmente por lipoproteína e carboidratos; oxidam H₂S, mas o princípio para essa oxidação ainda não foi esclarecido. Os principais substratos de crescimento parecem ser fontes quentes e também solos quentes que contenham enxofre, e que, então, oxidam tal elemento em ácido sulfúrico, responsável pela acidez desses habitats. O grupo dos termoplasmas é caracterizado pela ausência de parede celular e é encontrado em minas de carvão, com quantidades substanciais de sulfeto ferroso.

Uma das perguntas que mais intrigam os pesquisadores é como esses incríveis organismos conseguem viver em tais ambientes? Deixam constantemente uma interrogação sobre qual será o limite para o desenvolvimento da vida. Embora muitas dúvidas ainda parem sobre os mecanismos de adaptação a tais ambientes hostis, muitos fatores já são apontados como os responsáveis pela resistência desses organismos. A Tabela 2 reúne os principais mecanismos de adaptação aos problemas causados pelos ambientes extremos.



Meios de Cultivo para Arqueas Termofílicas

A pesquisa envolvendo esses organismos tem sido intensificada nas duas últimas décadas por duas razões principais: pelo conhecimento das condições sob as quais a vida pode existir através do estudo de muitos habitats nunca antes explorados e pelo atual reconhecimento do potencial biotecnológico desses organismos, bem como de seus produtos.

4. Aplicações Biotecnológicas

A tecnologia enzimática experimentou um grande avanço quando as enzimas microbianas passaram a ser utilizadas, principalmente por causa da grande variedade de reações que essas enzimas são capazes de catalisar. Com o descobrimento dos microrganismos extremofílicos (em sua maioria arqueas), o que ampliou ainda mais a

diversidade microbiana, a potencial faixa de processos para utilização de enzimas também se ampliou, principalmente porque as extremozimas (enzimas provenientes de microrganismos extremófilos) sendo naturalmente estáveis em ambientes extremos, vieram suprir a demanda industrial, para a qual, de certa forma, sempre estiveram em desvantagem as enzimas tradicionais. Um problema inerente às extremozimas é a dificuldade de produzi-las utilizando microrganismos selvagens, já que estes, em geral, necessitam de condições especiais para se reproduzirem, como ambientes anaeróbios estritos, altas temperaturas, meios definidos, etc. Contudo esse problema pode ser contornado expressando essas enzimas em outros organismos de mais fácil manipulação, já que existem vários exemplos em que essas enzimas, quando expressas em microrganismos heterólogos, mantêm suas características originais (Eichler, 2001).

Dentre as enzimas de arqueas de grande potencial para a aplicação biotecnológica, destacam-se as hipertermofílicas, psicofílicas, alcalofílicas, halofílicas e barofílicas.

Entre as enzimas de arqueas que têm recebido maior atenção, estão as termozimas, sendo que os principais processos de potencial utilização

dessas enzimas são o beneficiamento do amido, a manufatura e o branqueamento da polpa para produção de papel e a bem estabelecida prática laboratorial da reação em cadeia da polimerase (PCR), entre outras.

4.1. Processamento do Amido

O amido é um dos polímeros mais abundantes na natureza, estando presente principalmente nos vegetais, onde ele é utilizado para o armazenamento de energia na forma de grânulos insolúveis, compostos basicamente de amilose e amilopectina, que são diferentes polímeros de glicose. Além de servir diretamente como alimento na dieta animal, o amido presente nos vegetais pode ser hidrolisado, gerando glicose, maltose e xarope de oligossacarídeos, que, por sua vez, são utilizados para produção de outros químicos ou como substratos em fermentações (Bentley e Willians, 1996; Vieille e Zeikus, 2001).

De uma forma geral, o processo de hidrólise do amido envolve a liquefação e a sacarificação, as quais ocorrem em altas temperaturas. Durante a liquefação, os grãos de amido são gelatinizados em soluções aquosas entre 105°C e 110°C, num pH entre 5,8 a 6,5, quando então, são utilizadas α -amilases termoestáveis a 95°C, que hidrolisam parcialmente as ligações α -1,4. Nesse processo, o controle de temperatura e pH é muito importante pois, se a temperatura estiver abaixo de 105°C, a gelatinização ocorre parcialmente, e se aumentar muito, há a inativação das α -amilases; se o pH estiver mais ácido que 5,5 também ocorre a inativação dessas enzimas, mas, se vai acima de 6,5 são gerados muitos subprodutos. Após a liquefação, o produto é con-

vertido a sacarídeos de baixo peso molecular e, posteriormente, em glicose, utilizando-se pululanase e glicoamilase, e em maltose, utilizando-se pululanase e β -amilase.

Nesse processo, potencialmente poderiam ser feitas duas melhorias com a utilização de extremozimas: a primeira seria a utilização de α -amilases hipertermofílicas com maior tempo de resistência, de forma que não se necessitasse gastar energia com o resfriamento de 105°C para 95°C, da gelatinização para a liquefação. A segunda seria a em que o pH natural de soluções de amidos gelatinizados, que é de, aproximadamente, 4,5 e que força o ajuste para 5,8 na liquefação, e, posteriormente, redução para 4,2; na sacarificação, de maneira que uma α -amilase apta a trabalhar em pHs mais baixos reduziria, em muito, os custos do processo.

A Tabela 3 mostra algumas enzimas isoladas de arqueas com grande potencial de aplicação na indústria de processamento de amido. Embora nenhuma dessas reúna todas as características necessárias apontadas acima, elas indicam, no entanto, que com técnicas de engenharia de proteínas, esses catalisadores poderiam ser aperfeiçoados.

4.2. Manufatura do Papel

O processo de manufatura do papel envolve, de uma maneira geral, dois estágios: o polpeamento e o branqueamento. O polpeamento é o estágio no qual a estrutura macroscópica da fibra da madeira é quebrada, removendo-se dela a lignina, gerando daí uma fibra mais maleável e com características próprias para a produção do papel (Tolan, 1996; Vieille e Zeikus, 2001). Esse processo é conduzido mecânica ou quimicamente por adição de

ácidos (processo Sulfite) ou bases (processo Kraft) em altas temperaturas. Os processos de polpeamento, por envolverem condições muito drásticas (160°C-190°C em concentrações elevadas de álcalis ou ácidos), são potencialmente próprios para utilização de enzimas extremofílicas. Embora as celulases sejam bem distribuídas entre os domínios *Eukarya* e *Bacteria*, somente uma celulase de *Archaea* é relatada, a endoglicanase de *Pyrococcus furiosus*, que é capaz de hidrolisar ligações b,1-4 com uma atividade ótima ocorrendo em 100°C e pH 6,0 (Bauer e Kelly, 1998). Contudo, segundo Eichler (2001), várias arqueas termo e hipertermofílicas possuem enzimas β -glicosídicas.

A polpa resultante de um dos processos acima é levada ao branqueamento, que ocorrerá em menor ou maior grau dependendo da utilização do papel. Nesse processo, a quantidade remanescente de lignina do polpeamento é retirada com a utilização, dependendo do processo, de: cloro, dióxido de cloro, ozônio, peróxido de hidrogênio e altas temperaturas. A utilização desses agentes oxidantes acaba gerando uma quantidade muito grande de poluentes, e, por isso, vem sofrendo sanções das agências ambientais. Uma das alternativas pesquisadas para reduzir esses compostos, principalmente os derivados de cloro, é a utilização de enzimas. Entre as enzimas pesquisadas, as xilanasas, segundo Tolan (1996), são as que possuem uma boa aceitação industrial e têm sido utilizadas em indústrias onde está havendo um decréscimo na utilização dos oxidantes, da ordem de 10% a 15%. Ainda segundo esse autor, as características ótimas para uma xilanase seriam sua ação em temperaturas por volta de 70°C e pH entre 10-12, o que abre uma excelente

Tabela 3. Enzimas com potencial de aplicação na indústria de processamento do amido.

Enzima	Origem	Temperatura	pH	Referência
α -amilase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100°C	5,5-6,0	Dong <i>et al.</i> , 1997
	<i>Pyrococcus woesei</i>	100°C	5,5	Koch <i>et al.</i> , 1997
	<i>Pyrodictum abyssi</i>	100°C	5,0	Niehaus <i>et al.</i> , 1999
Pululanase	<i>Thermus caldophilus</i>	75°C	5,5	Kim <i>et al.</i> , 1996
Glicoamilase	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	50 a 60°C	4,0-5,5	Ganghofner <i>et al.</i> , 1998
Amilopululanases	<i>Pyrococcus furiosus</i>	105°C	6,0	Dong <i>et al.</i> , 1997

oportunidade para a exploração de xilanases de arqueas extremofílicas como as de *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus* sp. e *Thermococcus zilligii* (Eichler, 2001).

Um outro problema na fabricação de papel, principalmente pelo polpeamento mecânico, é a deposição do “pitch”, denominação atribuída ao conjunto de substâncias hidrofóbicas da madeira, principalmente triglicerídeos e graxas, que causam muitos problemas na manufatura da polpa e do papel (Jaeger e Reetz, 1998). As lipases já vêm sendo utilizadas na remoção dessas substâncias. Gutierrez *et al.* (2001) comentam que muitos estudos estão sendo realizados, por meio de técnicas de engenharia de proteínas, no intuito de aumentar a amplitude de substratos hidrolisáveis, atividade e estabilidade em pH e temperatura elevados, sendo importante que a enzima esteja ativa a altas temperaturas, uma vez que para um desempenho ótimo, a lipase deveria ser adicionada à polpa a uma temperatura de, aproximadamente, 85°C. Nosso laboratório vem trabalhando no isolamento, clonagem, expressão e caracterização de uma enzima lipolítica de arquea cuja atividade já foi testada a 80°C (manuscrito em preparação).

4.3. Utilização de Polimerases

A reação em cadeia da polimerase (PCR) revolucionou a prática da biologia molecular, ou seja, a surpreendente replicação *in vitro* de seqüências específicas de DNA possibilitou que o isolamento de genes, seu seqüenciamento e mutações específicas, antes uma prática laboriosa, se tornasse uma atividade cotidiana de qualquer laboratório de engenharia genética. O método da reação em cadeia da polimerase, por sua vez, foi extremamente simplificado com a utilização de enzimas hipertermofílicas. Embora a principal DNA polimerase termofílica utilizada seja a de uma bactéria (*Thermus aquaticus*), as DNA polimerases de arqueas, como as de *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* e outras, apresentam uma vantagem sobre a *Taq* polimerase, pois elas possuem



uma maior capacidade de correção de pareamentos errôneos, diminuindo a frequência de erros na replicação *in vitro* (Lundberg *et al.*, 1991).

Não somente as enzimas adaptadas às altas temperaturas têm potencialidades biotecnológicas. As enzimas de organismos que crescem entre 5°C e 25°C (Psicrofílicos) podem ser empregadas em vários processos e produtos, como proteases, lipases, amilases, b-glicanases em detergentes, pectinases em sucos de frutas, b-galactosidases para produção de leite deslactosado, lipases para maturação de queijos (Herbert, 1992; Eichler, 2001).

4.4. Arqueossomos

As aplicações biotecnológicas das arqueas não se restringem a produção, expressão heteróloga e purificação de extremozimas. Pelo menos uma outra potencialidade biotecnológica deve ser ressaltada. A utilização dos arqueossomos (preparação de lipídeos de membrana arqueana, como coadjuvantes em formulações

de vacinas, proporciona captação 3 a 50 vezes maior pelas células fagocíticas do sistema imune quando comparadas com formulações de lipossomos convencionais, além de geração de resposta imune prolongada (Tolson *et al.*, 1996; Sprott *et al.*, 1997; Krishnan *et al.*, 2000). Todos os estudos realizados *in vitro* e *in vivo* indicam que os arqueossomos são moléculas seguras e não invocam nenhuma toxicidade em ratos. Em geral, os arqueossomos demonstram alta estabilidade ao estresse oxidativo, à alta temperatura, ao pH alcalino, à ação de fosfolipases, de sais biliares e de proteínas do soro. Algumas formulações podem ser esterilizadas em autoclave, sem problemas como fusão ou agregação das vesículas (Patel e Sprott, 1999).

5. Genômica

Uma nova era sobre o conhecimento das arqueas começou em 1996 em decorrência do seqüenciamento completo do primeiro genoma de arquea (Bult *et al.*, 1996). Com o subsequente desenvolvimento de novos projetos de seqüenciamento de outros organismos pertencentes ao domínio *Archaea*, foi produzida uma rica amostragem de genomas desse grupo taxonomicamente bastante diversos. Esse repertório de genomas completamente seqüenciados inclui múltiplos representantes das duas maiores divisões de arqueas estabelecidas pela análise filogenética dos genes de rRNA: a *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, bem como as principais variantes ecológicas de arquea: os hipertermofílicos, termofílicos moderados e mesofílicos, assim como halofílicos e metanogênicos, formas autotróficas e heterotróficas, e múltiplas espécies que representam organismos anaeróbios e aeróbios. Infelizmente os bancos de dados ainda não contam com seqüências genômicas de alguns organismos pertencentes a ramos de arquea potencialmente importantes, como as misteriosas *Korarchaeota*, que devem ter divergido das demais arqueas nos primórdios da evolução, e a igualmente intrigante nanoarchaea, que parece ter o menor genoma entre todos os organismos de vida livre já descritos (Huber *et al.*, 2002).



Métodos de Preservação de Arqueas

A comparação dos genomas já seqüenciados de arqueas e bactérias permite concluir que a diferença mais marcante entre os domínios *Archaea* e *Bacteria* está na organização de seus sistemas de processamento de informações. A estrutura dos ribossomos e da cromatina, a presença de histonas, assim como a similaridade entre seqüências das proteínas envolvidas na tradução, transcrição, replicação e reparo do DNA; todos esses pontos apontam para uma maior proximidade entre arqueas e eucariotos. Por outro lado, alguns componentes chaves da maquinaria de replicação de DNA não são homólogos nos eucariotos nem nas bactérias. Essa observação permite sugerir a hipótese de que a replicação da dupla fita de DNA como principal forma de replicação do material genético dos seres vivos pode ter, na sua evolução, surgido, independentemente, duas vezes: uma nas bactérias e uma outra no ancestral de arqueas e eucariotos. No entanto, muitas, mas não todas as rotas metabólicas de *Archaea*, são mais parecidas com as de bactérias que as de eucariotos. Esses estudos são concordes quanto ao posicionamento das arqueas como um domínio distinto da vida, com conexões específicas com os eucariotos, e enfatizam a natureza misteriosa e única dos genomas das arqueas (Gaasterland, 1999).

Quando analisamos os 18 genomas de arqueas seqüenciados totalmente até hoje, podemos concluir que 16 proteínas são exclusivas de arqueas, enquanto 61 são exclusivas de arquea-eucariotos. Interessantemente, desses 61 genes, apenas 2 não pertencem à maquinaria do processamento de informação. Portanto, a análise genômica das arqueas já

seqüenciadas corrobora a identificação destas como um grupo de organismos que têm uma base sólida e estável de genes, os quais, primariamente, codificam proteínas envolvidas na replicação e expressão do genoma. Além desses, existe um segundo grupo de genes que é compartilhado pelas arqueas e eucariotos, genes que são claramente associados ao processamento da informação. O fato da afinidade arquea-eucariótica ser quantitativamente pequena, demonstra, no entanto, que o processo de evolução tem sido mais complexo que a simples herança vertical, e tem envolvido uma extensiva transferência lateral de genes entre *Archaea* e *Bacteria*. Após a divergência evolutiva entre as linhagens de arqueas e bactérias, vem ocorrendo uma grande mistura de genes codificantes para enzimas metabólicas, componentes estruturais da célula e outras proteínas que não participam da maquinaria central de processamento da informação (Nelson *et al.*, 1999).

Além dos estudos funcionais, a genômica de *Archaea* é fundamental para o conhecimento que temos de duas transições cruciais na evolução da vida: a primeira é a divergência entre as linhagens de bactérias e as de arquea-eucarióticas, que pode ter envolvido a origem da maquinaria de replicação de DNA. A segunda é a origem dos eucariotos. Em relação a esse ponto, a arquea é uma fonte fantástica de informação, particularmente porque, em muitas situações, ela tem retido as características primitivas, enquanto os eucariotos têm sofrido modificações muito maiores. Um exemplo característico é a subunidade menor da DNA polimerase, que possui todas as marcas de uma fosfatase ativa em arqueas, mas não em eucariotos, onde a atividade fosfatásica está provavelmente inativada. Sem sombra de dúvidas, arquea representa um ancestral comum das linhagens arquea-eucarióticas descendentes. Portanto, a genômica de arquea é a nossa melhor oportunidade de reconstruir essa fase intermediária crítica da evolução da vida (Makarova e Koonin, 2003).

6. Considerações Finais

Estudos que envolvem o domínio *Archaea* vêm confirmando as duas hipóteses iniciais de Woese e Fox (1977), isto é, que as arqueas exibem uma diversidade fenotípica no mínimo comparável àquela apresentada pelo domínio *Bacteria* e que os organismos do domínio *Archaea* serão caracterizados por aspectos únicos em âmbito molecular. Outrossim, o fato de *Archaea* exibir um mosaico contendo características dos dois outros domínios continua a estimular discussões entre os evolucionistas (Forterre *et al.*, 2002).

No contexto de extremofilia, a descoberta contemporânea mais surpreendente foi, sem dúvida, a dos organismos hipertermófilos, que estendeu a sobrevivência desse organismo para cerca de 121°C de temperatura em que células vivas proliferam eficientemente. Essa característica notável implica na estabilização de todos os componentes celulares, de modo que a sua funcionalidade seja mantida em condições de temperatura que seriam danosas para a maioria das biomoléculas dos organismos mesófilos. A elucidação das estratégias usadas na estabilização de componentes celulares e, em especial, de proteínas, representa um desafio fascinante para a biologia atual (Kashe e Lovley, 2003).

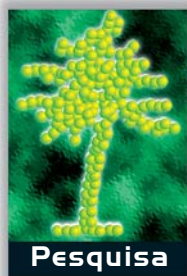
Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e decisivas na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura é derivada das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos.

Considerando que o Brasil possui uma grande extensão territorial com inúmeros e variados ambientes extremos, como: águas termais, salinas, inúmeras estações de tratamento de esgoto, rejeitos industriais, entre outros. A biodiversidade microbiana brasileira, ainda não explorada, pode-se tornar uma fonte para o desenvolvimento biotecnológico do país.

Estamos em plena era biotecnológica, quando os processos bioquímicos são cada vez mais utilizados para a produção de agentes terapêuticos, produtos químicos e biocatalisadores. O grande desafio será incorporar a informação decorrente do estudo desses organismos extremófilos em novas tecnologias, utilizando o enorme potencial de suas enzimas e biomoléculas.

7. Referências Bibliográficas

- Bauer, M. W., Kelly, R. M. (1998). The family b-glucosidases from *Pyrococcus furiosus* and *Agrobacterium faecalis* share a common catalytic mechanism. *Biochem.* **37**:17170-17178.
- Bentley, I. S., Williams, E. C. (1996). Starch conversion. *Ind. Enzymol.* **2**:339-357.
- Björkling, F., Godtfredsen, S. E., Kirk, O. (1991). The Future Impact of Industrial Lipases. *Trends Biotechnol.* **9**:360-363.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (1994). Biology of Microorganisms. 7ed. Prentice Hall: New Jersey, 909p.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D. et al. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science.* **273**:1058-1073.
- Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A., Zeikus, J. G. (1997). Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3569-3576.
- Eichler, J. (2001). Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol. Adv.* **19**:261-278.
- Forterre, P. (1997). Archaea: what can we learn from their sequences? *Curr. Opin. Gen. Devel.* **7**:764-770.
- Forterre, P., Brochier C., Philippe, H. (2002). Evolution of the Archaea. *Theor. Popul. Biol.* **4**:409-422.
- Gaasterland, T. (1999). Archaeal genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:542-547.
- Ganghofner, D., Kellermann, J., Staudenbauer, W. L., Bronnenmeier, K. (1998). Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and an α -glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**:302-308.
- Gutierrez, A., Del Rio, J., Martinez, M. J. (2001). The Biotechnology Control of Pitch in Paper Pulp Manufacturing. *Trends Biotechnol.* **19**:340-348.
- Herbert, R. A. (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol.* **10**:395-402.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., Stetter, K. O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature.* **417**:63-67.
- Jaeger, K. E., Reetz, M. T. (1998). Microbial Lipases from Verstile Tools for Biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**:396-402.
- Kashe, K., Lovley, D. R. (2003). Extending the Upper Temperature Limit for Life. *Science.* **301**:934.
- Kim, C.-H., Nashiru, O., Ko, J. H. (1996). Purification and biochemical characterization of pullulanase type I from *Thermus caldophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**:147-152.
- Koch, R., Canganella, F., Hippe, H., Jahnke, K. D., Antranikian, G. (1997). Purification and properties of a thermostable pullulanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium *Fervidobacterium pennavorans* ven5. *Appl. Microbiol.* **63**:1088-1094.
- Krishnan, L., Dicaire, C. J., Patel, G. B., Sprott, G. D. (2000). Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: comparison to conventional liposomes and alum. *Infect Immun.* **68**: 54-63.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A., Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene.* **108**:1-6.
- Makarova, K. S., Koonin, E. V. (2003). Comparative genomics of archaea: how much have we learned in six years, and what's next? *Gen. Biol.* **4**:115-128.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J. et al. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature.* **399**:323-329.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:711-729.
- Patel, G. B., Sprott, G. D. (1999). Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**:317-57.
- Santos, H., Lamosa, P., da Costa, M. S. (2001). Extremófilos: microrganismos à prova de agressões ambientais extremas. *Bol. Biotec.* **69**:2-10.
- Schiraldi, C., De Rosa, M. (2002). The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol.* **20**:515-521.
- Sprott, G. D., Tolson, D. L., Patel, G. B. (1997). Archaeosomes as novel antigen delivery systems. *FEMS Microb. Lett.* **154**: 17-22.
- Tolan, J. S. (1996). Pulp and Paper. *Ind. Enzymol.* **2**:327-338.
- Tolson, D. L., Latta, R. K., Patel, G. B. and Sprott, G. D. (1996) Uptake of archaeobacterial and conventional liposomes by phagocytic cells. *J. Liposome Res.* **6**, 755-776.
- Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:1-43.
- Woese, C. R. (1998). The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:6854-6859.
- Woese, C. R., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**:5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:4576-4579.



Otimização da Propagação

In vitro de Curauá (*Ananas erectifolius* L. B. SMITH)

Propagação massal de plantas através da cultura de tecidos

Osmar Alves Lameira

Eng^o Agrônomo/Pesquisador Dr.
Embrapa Amazônia Oriental
osmar@cpatu.embrapa.br

Iulla Naiff Rabelo de Souza Reis

Graduanda/Bolsista PIBIC/CNPq/UFRA

Iracema M^a Castro Coimbra Cordeiro

Eng^a Florestal, MSc Bolsista/CNPq

Ilustrações cedidas pelos autores

Resumo

A propagação vegetativa utilizando técnicas de cultura de tecido pode ser um valioso instrumento na propagação clonal rápida de mudas de curauá, em larga escala. O trabalho teve como objetivo otimizar a propagação *in vitro* do curauá. Foram realizados dois experimentos: No primeiro, os explantes foram inoculados em frascos contendo 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 ml do meio líquido MS, suplementados com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP (6-Benzilaminopurina). No segundo, os explantes foram inoculados em frascos contendo 15ml do meio líquido MS, suplementado com 0; 1,5; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,5 mg.L⁻¹ de BAP. Nos dois experimentos a condição de incubação foi realizada sob fotoperíodo de 16h luz branca fria e irradiância de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os tratamentos contendo 10 e 15 ml do meio líquido de cultura MS, suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP, foram mais eficientes na proliferação de brotos de curauá.

1. Introdução

Na Amazônia várias são as espécies de plantas fibrosas com utilização atual. Dentre elas destaca-se o curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith), planta nativa da região do Lago Grande de Curuai no Município de Santarém (PA) sendo cultivada principalmente por pequenos produtores e utilizada na fabricação de cordas, sacos e utensílios domésticos (Medina, 1959).

O curauá é planta pertencente a família bromeliacea distribuída nos Estados do Pará, Acre, Mato Grosso, Goiás, Amapá e Amazonas. Há duas variedades distintas do curauá, uma de folha roxa-avermelhada, chamada de

“curauá roxo” e outra de folha verde-claro, denominada de “curauá branco” (Ledo, 1967), ambas são relativamente pouco exigentes, não necessitando de solos férteis para o seu cultivo. Podendo ser plantada em solos arenosos, em plantios solteiros ou em consórcio com culturas anuais ou perenes e no aproveitamento de áreas degradadas (Oliveira *et al* 1991).

Estudos recentes têm demonstrado o grande potencial desta planta como produtora de fibra de excelente qualidade, podendo ser utilizada na indústria automobilística, por apresentar boa resistência, maciez e peso reduzido (Ledo, 1967). Além dessas razões e principalmente pela exigência do mercado consumidor, grupos empresariais estão preocupados na utilização de produtos naturais biodegradáveis. Ademais, o cultivo dessa espécie impulsionará o desenvolvimento do Estado e ao mesmo tempo cria uma perspectiva de melhoria da qualidade de vida dos pequenos produtores.

Atualmente a demanda por fibras de curauá para indústria automotiva e têxtil é superior a 500 ton/mês, entretanto, no momento o Estado consegue produzir até 8 ton/mês. Um dos problemas para a formação de áreas de cultivo dessa planta está na dificuldade de formação de mudas pelo método convencional. Nesse sentido, a propagação vegetativa, através da cultura de tecidos, apresenta-se como alternativa na propagação clonal rápida de mudas de curauá.

Visando equacionar este problema, a Embrapa Amazônia Oriental através do Laboratório de Biotecnologia de Plantas, realizou coletas da espécie nos municípios paraense de Santarém e Bragança, para formação de um banco

de germoplasma visando trabalhos de propagação *in vitro*, caracterização molecular e melhoramento genético da cultura. A utilização da técnica de cultura de tecidos possibilita a produção em larga escala e manutenção das características fenotípicas e genotípicas das plantas doadoras (Giacometti, 1990).

O processo de micropropagação de plantas envolve etapas definidas como, estabelecimento de explantes, multiplicação, subcultivos e enraizamento *in vitro*. Entretanto, após definido um protocolo de micropropagação de qualquer espécie, este pode ser otimizado com redução e até mesmo substituição de substâncias utilizadas no processo, como é o caso da fonte de carbono, e também pela supressão da fase de enraizamento *in vitro*, o que diminui sobremaneira os custos de produção de mudas por esta técnica. Assim sendo, o trabalho teve como objetivo otimizar a propagação *in vitro* de curauá.

2. Metodologia

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental utilizando-se inicialmente plantas do curauá oriundas do banco de germoplasma da referida Instituição (Figura 1). Após a retirada das folhas, o caule foi lavado com água corrente e sabão neutro. As gemas axilares foram excisadas e passaram pelo processo de desinfestação com lavagem em água corrente e imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por quinze minutos, sendo cinco minutos em agitação. Após o desenvolvimento, as plântulas obtidas *in vitro* serviram como fonte de explantes primário, para os experimentos (Figura 2).

Das plântulas obtidas *in vitro* foram retiradas o excesso de folhas e cortadas em segmentos de 2 cm de comprimento ficando com pelo menos uma gema lateral. Para o estabelecimento da cultura, os explantes utilizados nos experimentos foram inoculados em frascos contendo meio líquido MS (Murashige e Skoog, 1962). O meio de cultura foi ajustado a um pH de 5,8 utilizando-se NaOH (hidróxido de sódio) e/ou HCl (ácido clorídrico) em solução 0,5 N e autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

Foram realizados dois experimentos em delineamento inteiramente



Figura 1 - Banco de Germoplasma de Curauá Roxo e Verde. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA, 2003.



Figura 2 - Plântulas de Curauá obtidas *in vitro*. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA, 2003.

casualizado. O primeiro foi composto de 4 tratamentos com 6 repetições onde foram testadas as quantidades 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 ml do meio de cultura, suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP (6 - Benzilaminopurina). O segundo experimento foi composto de 6 tratamentos com 5 repetições onde se testou as concentrações 0; 1,5; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,5 mg.L⁻¹ de BAP. Nos dois casos as condições de incubação foram realizadas sob fotoperíodo de 16h luz branca fria e irradiância de 25 µmol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 26 ± 1°C. Trinta dias após a inoculação foi realizada a avaliação. A variável número de brotos foi transformada em $\sqrt{0,5 + x}$ e avaliada através da análise de variância e comparação de

médias pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

As plântulas micropropagadas foram transferidas para bandejas de plástico de 24 células contendo substrato organo-vegetal e colocadas em ambiente de telado com sombrite a 70% sob irrigação intermitente até a completa formação de mudas. Após 30 dias as mudas foram cultivadas no campo.

3-Resultados e Discussão

O efeito da quantidade de meio de cultura sobre a produção de brotos de curauá pode ser observado na Figura 3. Aos trinta dias de cultivo, foi observado que houve formação de

brotos em todos os tratamentos, e diferenças significativas entre os mesmos. Os tratamentos mais eficientes foram os que continham 10 e 15 ml do meio de cultura MS, produzindo em média 1,21 e 1,54 brotos/explante, respectivamente. Os tratamentos contendo 5 e 7,5 ml do meio de cultura MS, foram os menos eficientes, não diferindo estatisticamente entre si.

Na Figura 3, é possível observar que a produção de brotos foi diretamente proporcional a quantidade de meio de cultura, ou seja, quanto maior a quantidade de meio de cultura maior foi o número de brotos obtidos por explante. Este fato, muito provavelmente pode ser decorrente da maior disponibilidade de nutrientes às plantas.

É importante ressaltar que o aumento na quantidade de meio talvez possa tornar possível a redução na concentração de regulador de crescimento. Este fato foi evidenciado por Preece (1995) em trabalho sobre a composição de meio de cultura, no qual observou que com a otimização de nutrientes salinos é possível reduzir a concentração ou até mesmo eliminar a suplementação de reguladores de crescimento. Segundo Ammiranto (1983), meios de cultura contendo alta concentração salina, como o meio MS, pode otimizar o crescimento e desenvolvimento de plantas, principalmente pela presença do nitrogênio sob a forma de nitrato de amônia.

Estudos sobre a quantidade ideal de meio de cultura para o cultivo de curauá inexistem, encontrando-se na literatura apenas informações sobre concentrações e tipos de reguladores de crescimento. Embora não se possam oferecer explicações satisfatórias a respeito do assunto, os resultados obtidos evidenciaram o efeito positivo na proliferação de brotos de curauá com o aumento da quantidade do meio líquido de cultura MS.

Na Tabela 1, são apresentados os resultados obtidos com as diferentes concentrações de BAP na proliferação de brotos de curauá a partir de explantes obtidos de plântulas in vitro. Houve diferenças significativas entre as concentrações utilizadas.

O tratamento mais eficiente foi o que continha o meio de cultura MS suplementado com 2,5 mgL⁻¹ de BAP, produzindo em média 4,15 brotos/explante, não diferindo porém do que

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de brotos de curauá. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA, 2003

BAP (mg.L ⁻¹)	Número médio de brotos/explante
0,0	0,71 d
1,5	1,33cd
2,5	4,15 a
3,0	2,25 bc
3,5	3,34 ab
4,5	2,15 bc

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade

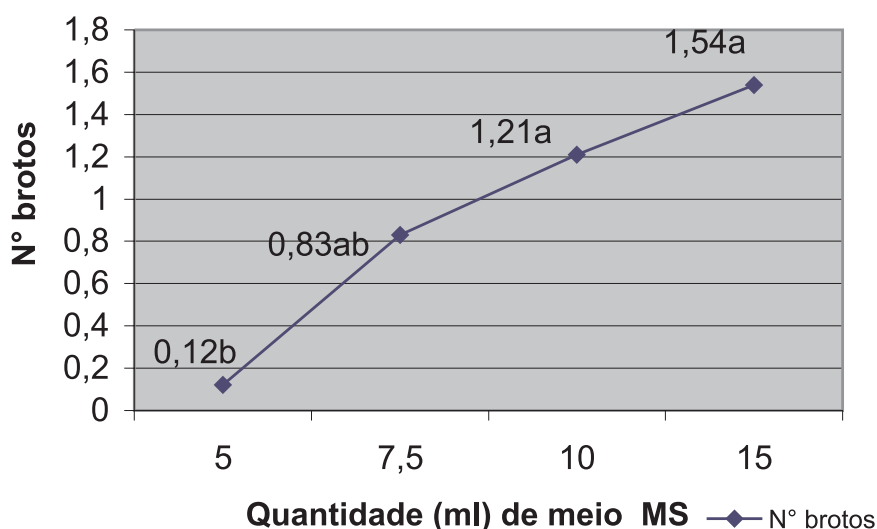


Figura 3 - Efeito da quantidade de meio de cultura na formação de brotos de curauá aos 30 dias de cultivo. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA, 2003.

continha 3,5 mgL⁻¹ de BAP, que produziu em média 3,34 brotos/explante. O tratamento menos eficiente foi aquele na ausência de BAP, produzindo em média 0,71 brotos/explante. Resultados similares foram obtidos por Rios (2002) em seu trabalho sobre a eficiência do BAP na proliferação de brotos de curauá.

Conforme a Figura 4, além da proliferação de brotos maior que 1cm de comprimento, houve a proliferação em grande número de brotos na forma de rosetas na presença do meio de cultura MS, suplementado com 2,5 mgL⁻¹ de BAP. Marciani-Benzedeu *et al* (1990) quando utilizaram a cultivar de abacaxizeiro Smooth Cayenne obtiveram maior número de brotos quando a concentração de BAP foi aumentada. Estudos realizados por Lemos *et al* (1998) revelaram que o BAP adicionado ao meio de cultura foi eficiente na proliferação *in vitro* de brotos de abacaxizeiro, cultivar Cabeça-de-onça, ocorrendo maior taxa de multiplicação a medida que a concentração do regulador de crescimento foi aumentada.

Por outro lado, Menezes *et al* (1999) em resultados preliminares sobre micropropagação de curauá observaram que houve intensa proliferação de brotos com a concentração de 3mg.L⁻¹ de BAP, porém, ocorreu intensa oxidação nos explantes. Bonilla (2002) estudou o efeito do BAP adicionado aos meios MS e WPM sobre a indução de brotações em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*, observando maior taxa de brotações em ambos os meios de cultura na presença de 2mg.L⁻¹ de BAP.

Tem sido reportado que o efeito benéfico do BAP na multiplicação de brotações relaciona-se com a influência deste regulador de crescimento na divisão celular e na liberação das gemas auxiliares imitadas pela dominância apical. Nesse sentido, supõe-se que, plantas que não apresentam uma divisão celular eficiente, o uso de altas dosagens de BAP em diferentes meios de cultura proporcionaria aumento na multiplicação de brotos. Entretanto, algumas espécies são sensíveis a altas concentrações de reguladores de crescimento, sendo necessário estudos para



Figura 4 - Proliferação de brotos de curauá cultivado em meio MS na presença de 2,5 mgL⁻¹ de BAP. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2003.



Figura 5 - Vista parcial de mudas de curauá em fase de aclimação. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2003.



Figura 6 - Mudas de curauá cultivadas no campo. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2003.

determinar qual o meio de cultura e o regulador de crescimento adequado para cada espécie.

As plântulas formadas foram levadas para aclimação e apresentaram crescimento e desenvolvimento uniforme, conforme pode ser observado na Figura 5. Após, 30 dias de cultivo as mudas foram cultivadas no campo. O índice de sobrevivência no campo aos 6 meses de cultivo foi de 100%, não sendo observada deficiência ou deformidade nas plantas (Figura 6).

4. Conclusão

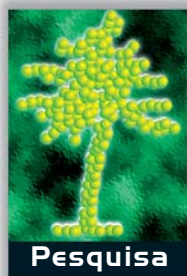
As quantidades de 10 e 15 ml do meio líquido de cultura MS, suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP são mais eficientes para proliferação de brotos de curauá;

Mudas de curauá provenientes da micropropagação podem ser cultivadas no campo com 100% de sobrevivência.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, reguladores de crescimento, *Ananas erectifolius*.

5. Referências Bibliográficas

- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. ed. **Handbook of plant cell culture**. New York; MacMillan, 970p. 1983.
- BONILLA, M. G. O. **Propagação in vitro, indução, curva de crescimento de calos e arborescência fitoquímica em *Rudaea viburnoides* (Cham.)**. Lavras: UFLA, 2002. 162p. (Tese de Doutorado em Fitotecnologia).
- FERREIRA, P.R. **Fibras. Agroamazônia**. n.13, p.26-29, 2003.
- GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura. p. 19-25, 1990.
- LEDO, I. A. de M. **O cultivo do curauá no lago grande de Franca**. Belém: Banco da Amazônia S/A - BASA - 1967. 23 p.
- LEMOS, O.F; SILVA, S.P.G da; ALBIM, E. de M.e S.; LAMEIRA, O. A.; REGO, J.R.; MENEZES, I.C. Efeito de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de brotos de abacaxizeiro. Belém: Embrapa-CPATU, 1998. **Boletim de Pesquisa**, 204. 14 p.
- MARCIANI-BENDEZEU, J.A.; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Efeito de 6-Benzilaminopurina (BAP) sobre a proliferação de brotos de abacaxizeiro, a partir de plântulas produzidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Cruz das Almas, v. 12, n.1, p. 35-39, 1990.
- MEDINA, J. C. **Plantas fibrosas da flora mundial**. Instituto Agrônomo de Campinas. 913 p. 1959.
- MENEZES, I.C.; LEMOS, O.F.; MENEZES, M.A.; LAMEIRA, O. A.; LOPES, S. da C. Micropropagação de curauá (*Ananas erectifolius*): Respostas preliminares. Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 7. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11 (supl) p. 168, 1999.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, J.; ALMEIDA, S. S. de; VILHENA-POTYGUARA, R.; LOBATO, L. C. B. **Espécies vegetais produtoras de fibras utilizadas por comunidades Amazônicas**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica, v. 7, n. 2, p. 393-428, 1991.
- PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 1, p. 26-37, 1995.
- RIOS, M. S. **Multiplicação de plantas de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) através de técnicas de cultura de tecidos**. Belém: UFPA, 12p, 2002 (Trabalho de Conclusão de Curso – TCC).



Cianobactéria Invasora

Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindropermopsis raciborskii* no Brasil

Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira

Profa. Dra. do Departamento de Ciências Biológicas
Laboratório de Cianobactéria, ESALQ - USP.
mbitt@esalq.usp.br

Renato Molica

Coord. do Lab. de Ecofisiologia de Microalgas (LEMD),
Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).
renato@itep.br

Ilustrações cedidas pelos autores

A poluição presente nas bacias hidrográficas decorrente de fontes antropogênicas tem restringido a qualidade e, conseqüentemente, a utilização das águas para o abastecimento das populações humanas, ocasionando sérios problemas à saúde pública e ao meio ambiente. Um dos eventos ocorrentes nos ecossistemas aquáticos mais comumente associados a estas cargas poluidoras formadas, principalmente, por compostos polifosfatados e nitrogenados, são as florações de cianobactérias (Figura 1). Florações são crescimentos populacionais massivos e descontrolados destes microorganismos em ecossistemas aquáticos ocasionados por alterações ambientais.

As florações de cianobactérias podem causar gosto e odor desagradáveis na água, além de alterar o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático. O maior problema, entretanto, está no fato de produzirem toxinas (cianotoxinas) extremamente potentes atingindo um conjunto de organismos muito além daqueles presentes nas comunidades aquáticas. As cianotoxinas podem ser acumuladas na rede trófica, ocasionando diferentes sintomas de intoxicação e efeitos crônicos, muitas vezes, difíceis de serem diagnosticados. Mortandades de peixes e animais silvestres e domésticos já foram registrados em diversas partes do mundo (Carmichael 1992).

Toxinas de cianobactérias

As cianobactérias produzem diferentes metabólitos secundários, sendo alguns deles possuidores de ação tóxica sobre diferentes organismos e

tipos celulares. As neurotoxinas e hepatotoxinas, entretanto, podem ser consideradas os principais agentes tóxicos produzidos pelas cianobactérias, pois causam sérios danos à vida animal e à saúde humana, podendo até mesmo levar a morte.

As neurotoxinas conhecidas até hoje são: anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxina e neosaxitoxina (Figura 2). Apesar de agirem de modo distinto, têm como ação final a paralisação da atividade muscular, levando o animal à morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição. As saxitoxinas foram inicialmente caracterizadas em espécies de dinofíceas marinhas e foram responsáveis por diversos casos de intoxicação humana através do consumo de mariscos contaminados.

As hepatotoxinas são as toxinas produzidas por cianobactérias mais comumente relacionadas com casos de envenenamento animal e humano em todo o mundo. As principais hepatotoxinas são as microcistinas, nodularinas - de natureza peptídica - e cilindrospermopsina (Figura 3), um alcalóide que também inibe a síntese de proteínas (Tabela 1).

O Brasil possui um recente histórico de relatos de contaminações por cianotoxinas, porém, muitos não foram comprovados. Um dos eventos ocorridos, mas não comprovadamente associado às cianotoxinas, aconteceu na Bahia, onde oitenta e oito pessoas morreram devido ao consumo de água proveniente do reservatório de Itaparica (Teixeira et al. 1993).

Contudo, o caso mais grave envolvendo a população humana foi a chamada "Síndrome de Caruaru" ocorrida na cidade de Caruaru, nordeste

do Brasil em 1996, quando 76¹ pacientes de uma clínica de hemodiálise foram a óbito (Jochimsen et al. 1998; Carmichael et al. 2001). Este incidente levou a Fundação Nacional da Saúde, em colaboração com a Organização Panamericana da Saúde, à revisão da portaria 36/MS/90, que definia as normas e os padrões de potabilidade da água para consumo humano no Brasil. Através da homologação da Portaria nº 1469/00/MS de 29/12/2000, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária passou a exigir dos órgãos competentes e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água o monitoramento da ocorrência de cianobactérias e algumas cianotoxinas, tanto na água bruta do manancial utilizado para a captação de água, como na água tratada para consumo (Brasil 2001).

A Portaria nº 1469/00 tornou obrigatória a análise de microcistina e recomenda a análise de saxitoxinas e cilindrospermopsina na água tratada quando for comprovada a toxicidade da floração no manancial de abastecimento através de bioensaios com camundongos. Os valores máximos permitidos (VMP) dessas toxinas na água tratada são de 1,0, 3,0 e 15,0 µg.L⁻¹ de microcistina, equivalentes de saxitoxina e cilindrospermopsina, respectivamente. Esses valores, que resultaram de estudos anteriores, levam em consideração a toxicidade dessas moléculas em testes com animais, além de fato-

O que são cianobactérias?

Cianobactérias são microrganismos procariotos, de origem extremamente remota, geralmente aquáticos, que realizam fotossíntese com liberação de oxigênio, diferente de outras bactérias fotoautotróficas. Devido ao fato de serem fotossintetizantes, aquáticas e possuírem um pigmento azulado (ficocianina), são tradicionalmente chamadas de “algas azuis”, apesar da distante relação filogenética com outros grupos de organismos também denominados de “algas”. Acredita-se que elas foram as responsáveis pelo início da formação da atmosfera atual, rica em oxigênio, e pela evolução de todos os organismos fotossintetizantes, visto que formas relacionadas às atuais cianobactérias, provavelmente, originaram os cloroplastos através de um evento endossimbiótico.

As cianobactérias são predominantes no fitoplâncton de águas continentais, alcançando uma ampla diversidade de formas, devido às adaptações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas adquiridas durante sua longa história evolutiva. Algumas cianobactérias, tais como os gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Planktobrix* formam florações onde há a liberação de toxina através da lise celular.

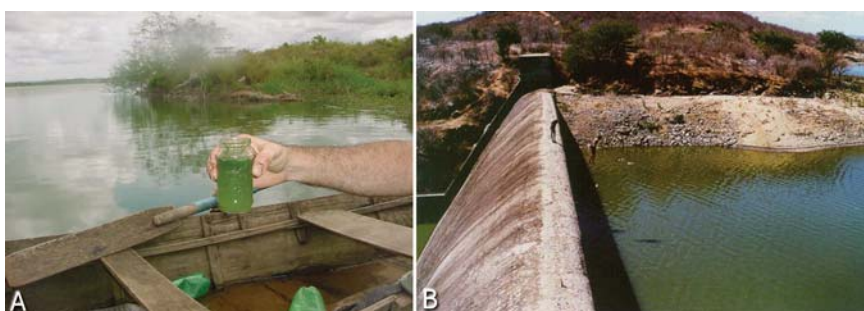


Figura 1. Amostra de floração da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Kütz.) Kütz. coletada no reservatório de Carpina em 2002. b) Banhistas no reservatório de Ingazeira, em 1998, com floração neurotóxica (presença de saxitoxinas) de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Ambos no estado de Pernambuco nordeste do Brasil. Fotos dos autores.

Tabela 1. Características gerais das toxinas produzidas por cianobactérias e os gêneros em que foram encontradas.

Toxina	Como e onde age	Gênero
^a Microcistina	Inibidora das enzimas fosfatases 1 e 2A - Fígado (hepatócitos)	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktobrix</i> (<i>Oscillatoria</i>), <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> e <i>Anabaenopsis</i>
^a Nodularina	Inibidora das enzimas fosfatases 1 e 2A - Fígado (hepatócitos)	<i>Nodularia</i>
^a Cilindrospermopsina	Inibidora de síntese proteica - Fígado.	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Aphanizomenon</i> e <i>Raphidiopsis</i>
^a Saxitoxina	Liga-se aos canais de sódio - Membrana do axônio	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> e <i>Cylindrospermopsis</i>
^a Anatoxina-a	Liga-se ao receptor da acetilcolina - sinapse nervosa	<i>Anabaena</i> , <i>Planktobrix</i> (<i>Oscillatoria</i>), <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i>
Anatoxina-a(s)	Inibidora de acetilcolinesterase - Sinapse nervosa	<i>Anabaena</i>

^a Existem variantes estruturais com diferentes toxicidades

Fonte: Sivonen & Jones (1999), Li et al. (2001), Namikoshi et al. (2003).

¹ Dos 131 pacientes da clínica, 116 apresentaram sintomas de intoxicação. Destes, 100 desenvolveram problemas hepáticos e 76 faleceram ao longo do estudo, que durou até outubro 1997. Destes 76, foram analisadas 52 amostras de fígado de 39 pacientes (todas positivas para microcistina) (Carmichael et al. 2001).

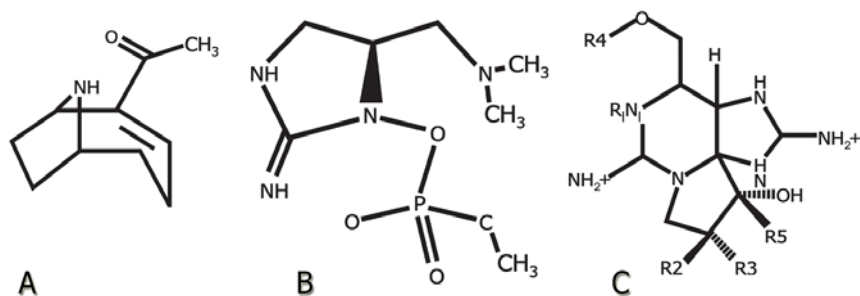


Figura 2. Estrutura das neurotoxinas produzidas pelas cianobactérias. a) anatoxina-a, b) anatoxina-a(s) e c) saxitoxinas. Alterações em R1, R2, R3, R4, R5 geram mais de 20 variantes conhecidas com diferentes toxicidades.

res de risco, que são aplicados no cálculo da dose máxima, entre eles, a variabilidade inter e intra-espécie e, no caso da microcistina, seu potencial carcinogênico. Em relação à cilindrospermopsina, alguns autores, baseados em resultados recentes que mostram um potencial genotóxico, vêm sugerindo que o VMP deva ser menor, em torno de 2 µg/L.

Cepas brasileiras de *Cylindrospermopsis raciborskii* produzem saxitoxinas

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (ordem Nostocales) é um componente importante entre as espécies formadoras de florações, pois pode produzir hepatotoxinas, neurotoxinas e citotoxinas (Chorus & Bartram 1999).

O primeiro caso de intoxicação humana provocada por esta espécie ocorreu em 1979, na Austrália, quando 141 pessoas, sendo a maioria crianças, após consumirem água de um reservatório que havia sido tratado com algicida para eliminar uma floração, apresentaram sintomas de hepatointerite (Hawkins et al 1985). Até então, essa espécie era considerada como não-tóxica. Análises posteriores demonstraram que o composto responsável pela intoxicação havia sido a cilindrospermopsina (Ohtani et al 1992). Também na Austrália, em 1992, uma floração de *C. raciborskii* produtora de cilindrospermopsina causou a morte de bovinos. Apenas as cepas australianas e uma tailandesa de *C. raciborskii*, até hoje, demonstraram produzir cilindrospermopsina e um análogo não tóxico, denominado deoxicilindrospermopsina.

Em análises realizadas pelo Laboratório de Ecofisiologia de Microalgas, do Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco, com amostras de florações de *C. raciborskii* que ocorreram entre 10 de abril e 24 de maio de 2002 no reservatório Tapacurá (São Lourenço da Mata, PE) que abastece cerca de 1,3 milhão de habitantes na Região Metropolitana de Recife, foi demonstrado efeitos neurotóxicos em bioensaios com camundongos. Análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicaram a presença de

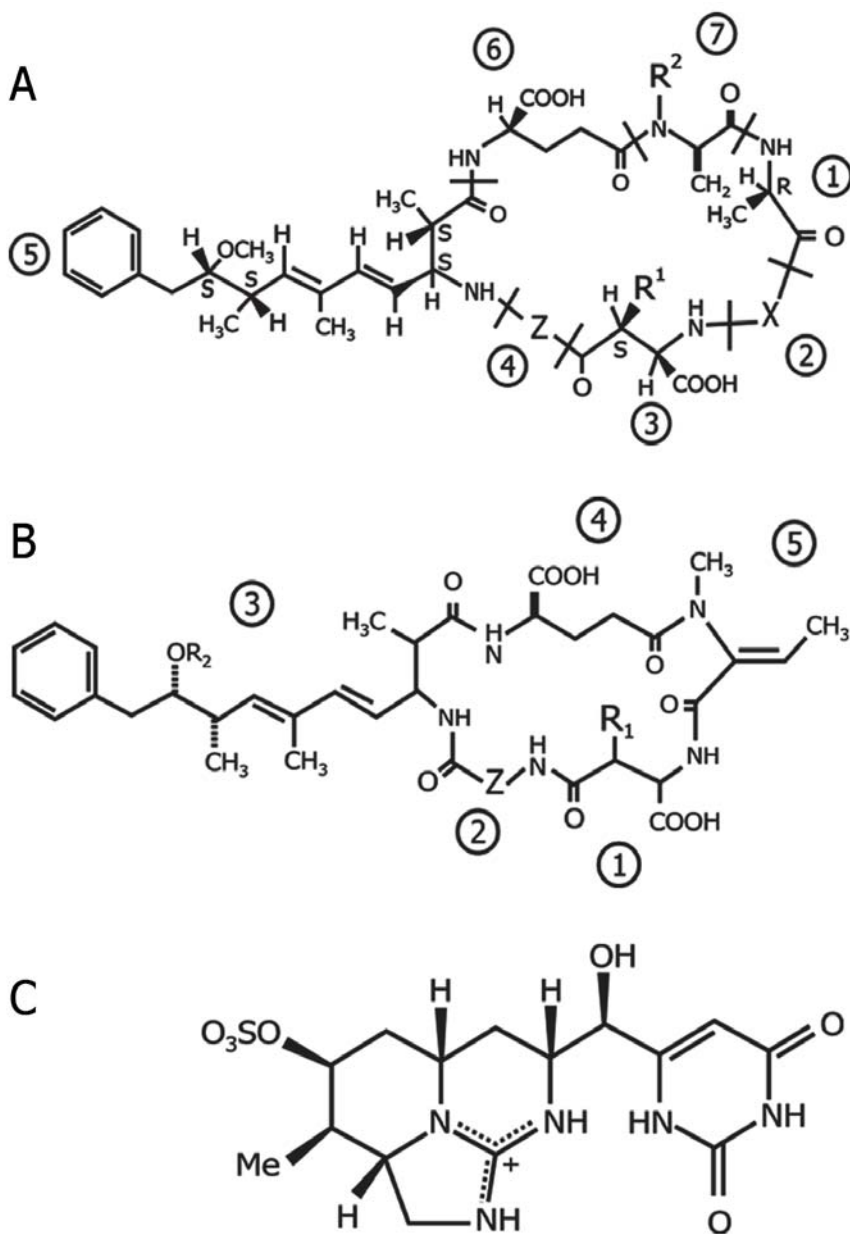


Figura 3. Estrutura geral das microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina. a) Microcistina um heptapeptídeo cíclico. X e Z representam os dois L-aminoácidos que podem variar e R¹ e R² são H ou CH₃; b) Nodularina um pentapeptídeo cíclico. Z representa um L-aminoácido que pode variar e R₁ e R₂ são H ou CH₃; c) Cilindrospermopsina é um alcalóide.

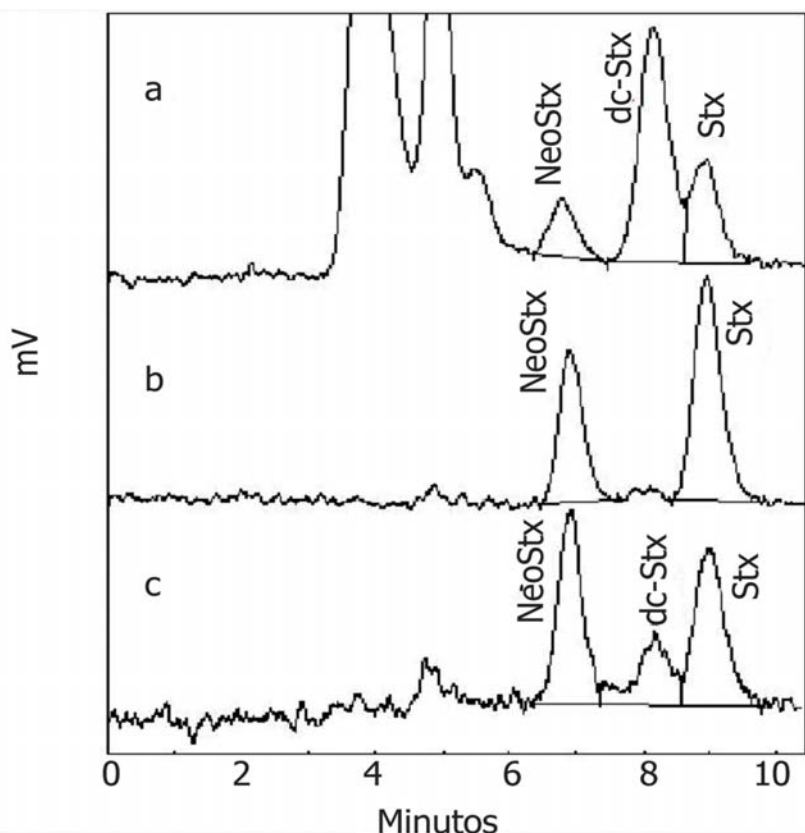


Figura 4. Análise de saxitoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência e derivatização pós-coluna de acordo com método descrito por Oshima (1995). Amostra de 8 de maio de 2002 da floração de *C. raciborskii* do reservatório Tapacurá (a). Foram identificados três picos, cujos tempos de retenção coincidem com os tempos de retenção dos padrões (b e c). Neosaxitoxina (NeoStx), saxitoxina (Stx) e dc-saxitoxina (dc-Stx).

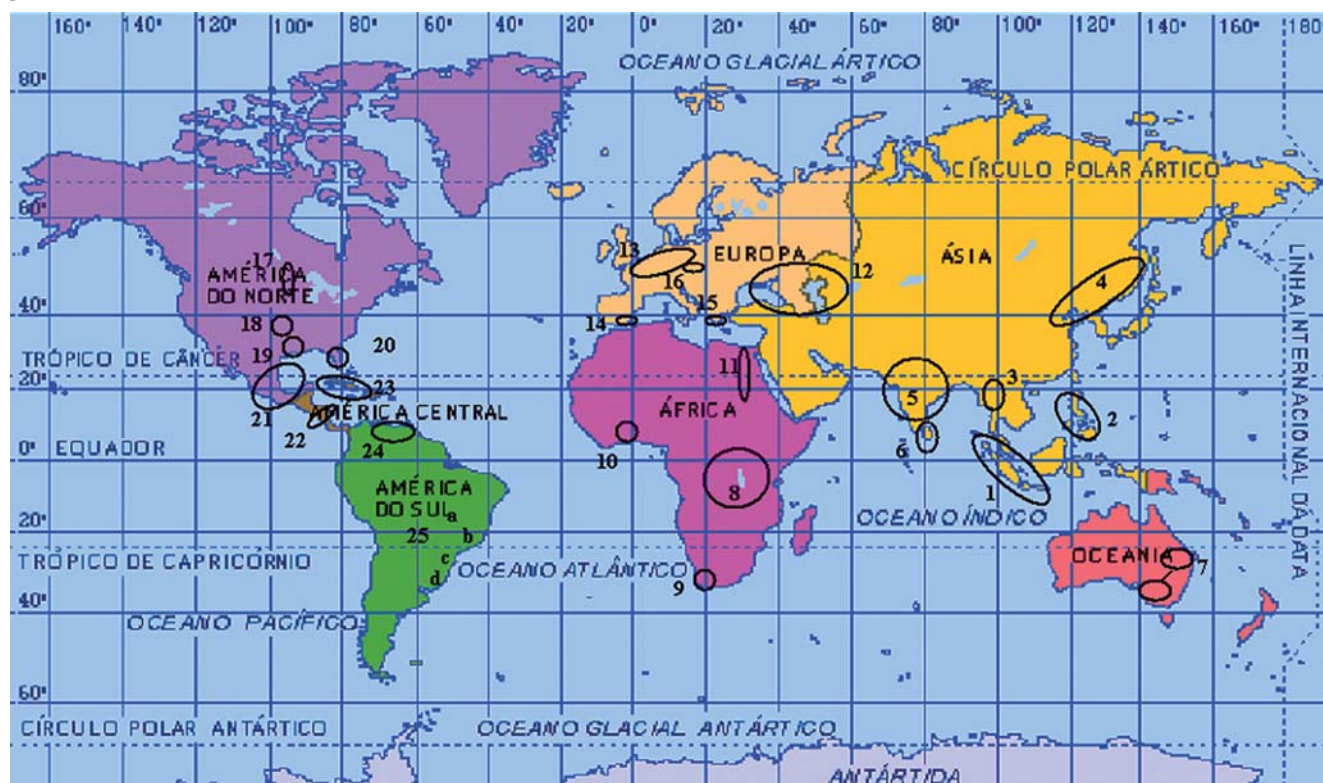


Figura 5: Ocorrência de *C. raciborskii* no mundo segundo Padisák (1997). 1. Indonésia. 2. Filipinas. 3. Bruma. 4. China. 5. Índia. 6. Sri Lanka. 7. Austrália. 8. República Democrática do Congo, Malaui, Quênia, Ruanda, Zâmbia, Zimbábue, Uganda. 9. África do Sul. 10. Nigéria. 11. Rio Nilo. 12. Moldávia, Turquemenistão, Afeganistão, Cazaquistão, Rússia, Usbequistão, Mar Cáspio. 13. Alemanha, Áustria, França. 14. Espanha. 15. Grécia. 16. Hungria. 17. Minnesota, EUA. 18. Kansas, Estados Unidos. 19. Texas, Estados Unidos. 20. Flórida, Estados Unidos. 21. México. 22. Nicarágua. 23. Cuba. 24. Venezuela. 25. Brasil. a. Lago Paranoá, DF; b. Lago da Pampulha, MG; c. Reservatório de Itaipú, PR; d. Lagoa dos Patos, Lago Chinês e Lago Gaúcho, RS.

saxitoxinas em amostra de água bruta (Figura 4).

Cepas brasileiras de *C. raciborskii* isoladas de diferentes regiões do país demonstraram produzir saxitoxinas (Lagos et al. 1999, Molica et al. 2002, Bernard et al. 2003, Pomati et al. 2003). As variantes de saxitoxinas caracterizadas a partir de amostras de cepas brasileiras de *C. raciborskii* até o momento foram: saxitoxina, neosaxitoxina, dc-saxitoxina, dc-neosaxitoxina, GTX-2, GTX-3, GTX-6 e uma nova variante ainda não descrita.

Cepas européias de *C. raciborskii* (alemãs, francesa, húngaras e portuguesas) demonstraram ter efeitos tóxicos quando testadas em bioensaios com camundongos. Dependendo da cepa, observou-se danos causados ao fígado ou efeitos neurotóxicos em neurônios de moluscos (Bernard et al 2003, Saker et al 2003, Kiss et al 2002). Em todos esses casos, entretanto, não se identificou a produção de cilindrospermopsina, nem tampouco de saxitoxinas por essas cepas. Provavelmente trata-se de um novo composto, cuja estrutura química e atividade toxicológica ainda precisam ser determinadas.

Tabela 2 -Ocorrência da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* em reservatórios de diversos Estados do país e no Distrito Federal.

Localização	Referência*
Distrito Federal	Branco & Senna (1991)
Espírito Santo	Fernandes (2003)
Goiás	Bazza <i>et al.</i> (1999)
Minas Gerais	Jardim <i>et al.</i> (2001)
Paraíba	Mendes <i>et al.</i> (2003)
Paraná	Borges <i>et al.</i> (2003)
Pernambuco	Bouvy <i>et al.</i> (2000)
Rio de Janeiro	Huszar <i>et al.</i> (2000)
Rio Grande do Norte	Panosso <i>et al.</i> (2003)
Rio Grande do Sul	Proença <i>et al.</i> (2002)
Santa Catarina	Komáková <i>et al.</i> (1999)
São Paulo	Souza <i>et al.</i> (1998)
Tocantins	Silva <i>et al.</i> (2003)

* Citou-se apenas uma referência por estado, porém a maioria possui mais de um registro.

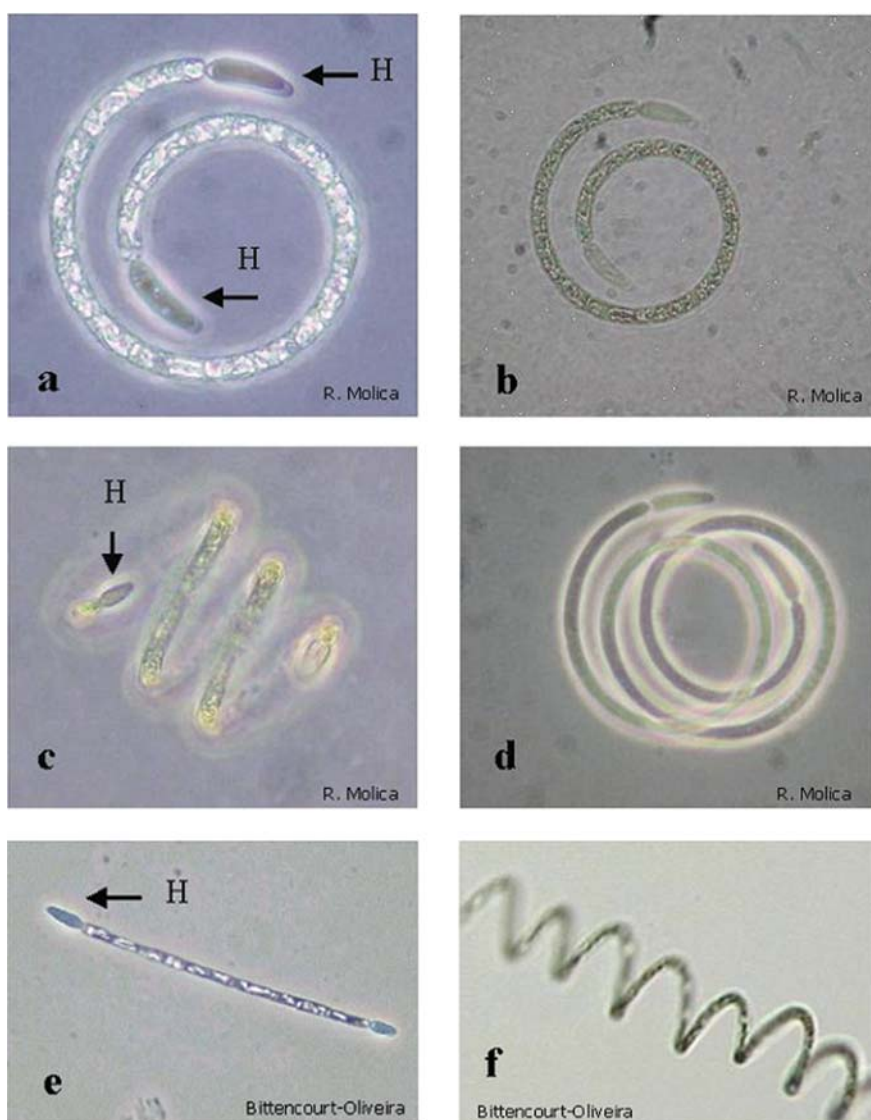


Figura 6. Filamentos retos e espiralados de *C. raciborskii*. a-d) Cepa espiralada Recife/PE-Brazil com heterocitos (célula especializada na fixação do N_2 atmosférico) terminais. a e c. contraste de fase evidenciando os aerótopos que são responsáveis pela flutuação e migração do filamento na coluna d'água. e) Cepa reta Arcoverde/PE-Brazil com heterocitos terminais. f) Material da natureza não cultivado coletado no reservatório de Jucazinho-PE. Fotos dos autores.

A invasão de *Cylindrospermopsis raciborskii*

A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju foi descrita pela primeira vez em Java e adjacências e tornou-se extremamente invasiva, ocorrendo tanto em águas de regiões tropicais e subtropicais como temperadas (Padisák 1997, Bouvy *et al.* 2000) (Figura 5). Apesar de poderem ser dominantes durante o ano todo, são mais comumente encontrados em períodos restritos, geralmente secos e de baixa pluviosidade. Esta cianobactéria possui múltiplas estratégias adaptativas, tais como resistência à herbivoria, tolerância às baixas irradiações, possibilidade de migração na coluna d'água buscando estratos ricos em nutrientes e luz, tolerância às altas concentrações iônicas, armazenamento e utilização de reservas intracelulares de fósforo, alta afinidade ao NH_4^+ que é a forma energeticamente mais acessível de nitrogênio, ou na sua falta, podem fixar o N_2 atmosférico e flexibilidade às grandes variações de condutividade elétrica.

Nas duas últimas décadas documenta-se a frequente ocorrência de *C. raciborskii* nas águas dos reservatórios e açudes em diversos estados do Brasil (Tabela 2). Uma das regiões com intensos registros de sua presença é a Nordeste, mais especificamente o estado de Pernambuco (Bouvy *et al.* 1999, 2000; Huszar *et al.* 2000). Os reservatórios desta região possuem excelentes condições para o desenvolvimento desta espécie, tais como, corpos d'água rasos, estabilidade na coluna d'água devido à pluviosidade baixa, longo tempo de retenção da água (ou ausência de renovação), irradiações e temperatura altas além de valores de pH acima de 8,0 (Bouvy *et al.* 2000). Segundo Bouvy *et al.* (2000), dos 39 reservatórios amostrados por todo estado de Pernambuco, entre setembro e novembro de 1998, 31 apresentaram florações de *C. raciborskii* e, em 17 destes, esta cianobactéria representou 50% da densidade do fitoplâncton total. No mesmo período, situação semelhante foi relatada na Austrália no estado de Queensland entre outubro de 1997 e junho de 1999. Dos 47 reservatórios de água amostrados, 35 apresentaram populações de *C.*

raciborskii (McGregor & Fabbro 2000), sendo que em 15 esta espécie foi dominante sazonalmente e em 1 durante o ano inteiro.

Morfologia de *Cylindrospermopsis raciborskii*

Segundo os critérios morfológicos tradicionais, a forma do filamento é um caráter taxonômico que distingue espécies diferentes. Segundo Komarková (1998), as formas retas são identificadas como *C. raciborskii* e as espiraladas *C. philippinensis* (Taylor) Komárek e *C. catemaco* Komarková-Legnerová et Tavera. No entanto, admite-se atualmente que é próprio de *C. raciborskii* apresentar uma extensa plasticidade fenotípica refletindo-se em filamentos retos, sigmóides ou espiralados que podem ocorrer simultaneamente (Figura 6).

Filamentos espiralados de *C. raciborskii*, apesar de distribuição mais restrita no mundo, são frequentemente relatados para o norte da Austrália, em Queensland (Fabbro et al 1996, McGregor & Fabbro 2000, Saker et al. 1999, Dyble et al. 2002) e sudeste da América do Norte, na Flórida. No Brasil, do nosso conhecimento, populações de *C. raciborskii* com filamentos espiralados apenas foram registrados para a região Nordeste (Bouvy et al. 1999, 2000) (Figura 6).

Populações com filamentos retos e espiralados de um lago na Austrália foram caracterizadas geneticamente através das análises de seqüências do 16SrRNA (Saker et al. 1999). Formas retas e espiraladas apresentaram-se com alta similaridade genética (99,8%) indicando que se tratava de uma única espécie, apesar dos seus comportamentos levemente diferenciados em testes ecofisiológicos (Saker et al. 1999, Saker & Neilan 2001). Wilson et al. (2000), utilizando uma técnica mais discriminatória do que a anterior, encontraram resultados semelhantes através de seqüências do *rpoC1*, que codifica para a subunidade γ da RNA polimerase, obtidas por iniciadores desenhados especificamente para *Cylindrospermopsis*. Entretanto, as cepas com morfologia espiralada foram agrupadas utilizando-se RAPD (random amplified polymorphic DNA) e STRR (short-sequence tandem repeat region)

(Wilson et al. 2000, Neilan et al. 2003).

Apesar de esta espécie ter sido descrita como um táxon de interesse apenas em áreas tropicais, florações têm sido frequentemente registradas em regiões temperadas da Austrália, Europa e nas Américas do Norte e Sul levando pesquisadores de diversas partes do mundo a se dedicarem ao estudo da espécie.

O uso de seqüências de DNA como ferramenta básica no entendimento da dispersão e produção de toxinas

Genes que codificam para a c-ficocianina como o *cpcB* e *cpcA* estão presentes em todas as cianobactérias e ausentes em outras bactérias e microalgas. As regiões espaçadoras entre estes genes têm se tornado uma alternativa para a utilização daquelas altamente conservadas. A região do *locus* da ficocianina possui seqüências com taxas de substituições mais altas do que aquelas do 16S rDNA (Nelissen et al 1996, Ishida et al. 1997, Lyra et al. 2001).

Neste estudo foram utilizadas seqüências inéditas obtidas do espaçador intergênico do operon da ficocianina (*cpcBA*-IGS) de cepas *C. raciborskii* com morfologias reta e espiralada de dois corpos d'água do nordeste do Brasil. Além destas, foram utilizadas seqüências de cepas australianas, européias e americanas disponíveis no GenBank. Número de acesso às seqüências estão na Figura 7.

As 19 cepas analisadas apresentaram-se com alta similaridade genética mostrando tratar-se de uma única espécie (Figura 7). Porém, foram claramente distribuídas em dois grupos: Grupo 1) com cepas australianas, produtoras de cilindrospermopsina, e européias (Alemanha, Hungria e Portugal), não-produtoras de cilindrospermopsina, mas sim de um composto tóxico ainda não caracterizado (Neilan et al. 2003); e Grupo 2) com cepas americanas (EUA e Brasil). No grupo 1 não foram evidenciadas distinções entre regiões geográficas, toxinas produzidas e morfologias reta e espiralada.

O grupo 2 apresentou cepas distribuídas segundo a região geográfica (Flórida e Brasil) e morfologia do filamento (espiralado ou reto). Con-

tudo, a única exceção foi a cepa Arcoverde/PE-Brasil que não se agrupou segundo os critérios acima. Das cepas americanas, apenas as de Billings/SP-Brasil e Amparo/SP-Brasil (Lagos et al. 1999) tiveram suas toxinas analisadas através de CLAE e constatou-se a presença de saxitoxinas. Até o momento, em nenhuma linhagem analisada de *C. raciborskii* foi constatada a presença de cilindrospermopsina (Proença et al. 2000; Molica et al. 2002). Em bioensaios com camundongos a cepa Arcoverde/PE-Brasil produziu efeitos neurotóxicos, enquanto a Recife/PE-Brasil foi tóxica, porém não foi possível determinar a natureza da toxina. Todas as cepas brasileiras de *C. raciborskii* tóxicas analisadas até hoje foram produtoras de saxitoxinas.

Considerações finais

As seqüências do *cpcBA*-IGS possibilitaram, de uma forma geral, a distinção entre regiões geográficas e morfologias espiralada e reta entre as cepas americanas, mas não entre as australianas e européias. Isto poderia indicar que há outros fatores refletidos nas informações moleculares que estariam influenciando na topologia do cladograma. Apesar da necessidade de maior detalhamento e número de isolados de *C. raciborskii* analisados em relação aos seus aspectos moleculares, toxicológicos e ecofisiológicos, há indícios que haja uma ligação entre o composto tóxico produzido e sua distribuição geográfica. Baseado nisto, pode-se propor que populações australianas, européias e americanas evoluíram separadamente após a separação dos continentes, contrariando as especulações de Padisák (1997), segundo as quais, a Austrália e África seriam os centros de radiação de *C. raciborskii* para Europa e América por possuírem ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento destas populações.

Segundo um modelo evolutivo proposto para eucariotos com reprodução sexuada (Brussard 1984), populações geneticamente diversas estão no centro da variação de uma espécie, enquanto que aquelas às margens apresentam-se mais homogêneas. Para Dyble et al. (2002), a grande diversidade genética encontrada entre as cepas americanas quando comparadas com as austra-

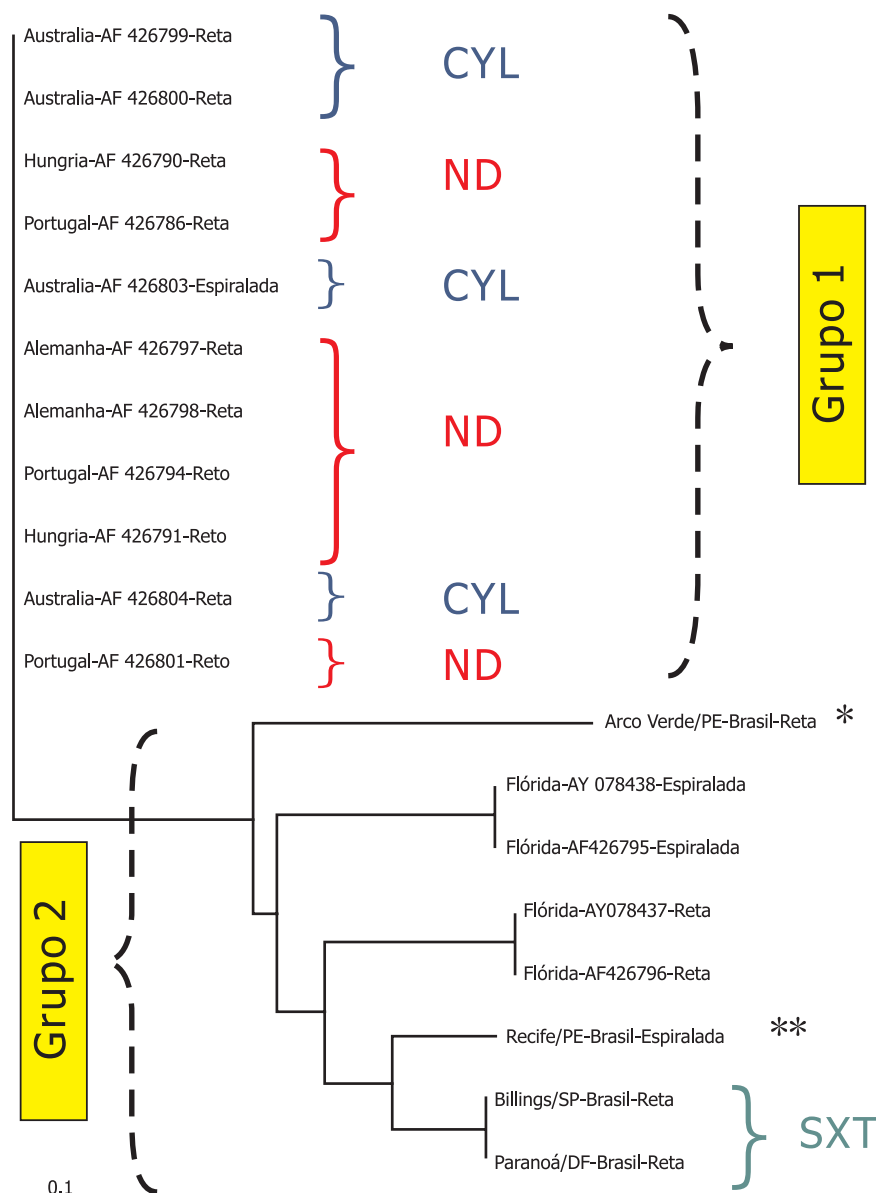


Figura 7. Cladograma obtido através do método de Neighbor-joining utilizando 576 a 600 pares de base do *cpcBA*-IGS de cepas de *C. raciborskii* de diferentes regiões geográficas.

CYL: presença de cilindropermopsina. ND: presença de um composto novo não descrito e ausência de cilindropermopsina. SXT: presença de saxitoxinas. Todas as toxinas confirmadas através de CLAE (segundo Neilan et al. 2003).

* Produziu efeitos neurotóxicos através de bioensaios com camundongos

** Tóxica. Toxina não avaliada.

lianas e européias, pode indicar introdução recente da espécie ou evolução molecular acelerada. A diversidade genética de cianobactérias no Brasil ainda é pouca estudada, mas há dados que evidenciaram a alta variabilidade em cepas de *Microcystis* nas quais genótipos diferentes coexistem em diversos corpos d'água do Brasil, utilizando o *cpcBA*-IGS (Bittencourt-Oliveira et al 2001) e o gene *mcjB*, que codifica para a síntese de microcistina (Bittencourt-Oliveira 2003).

C. raciborskii foi registrada pela primeira vez na América do Norte em 1955 (Prescott & Andrews 1955) e, no Brasil, iniciaram-se os relatos de florações após o enchimento do lago Paranoá-DF em 1960 (Palmer 1969). Comparando-se com os primeiros registros de *C. raciborskii* no mundo (Padisák 1997) a presença desta cianobactéria na América não é um evento recente, porém o aumento das florações parece estar relacionado ao favorecimento das condições ambientais.

As populações presentes em corpos d'água americanos podem ser resultados de uma evolução molecular acelerada favorecida pelas condições ambientais altamente propícias à introdução de novas linhagens e o constante intercâmbio genético promovido por aves migratórias entre América do Norte e Sul. Diversas espécies de maçaricos (Scolopacidae) tais como *Tringa solitaria*, *T. flavipes*, *T. melanoleuca* etc., vindo da América do Norte cruzam o Brasil em direção ao sul com diversas paradas para descanso e alimentação em águas calmas o que possibilitaria agirem como vetores na dispersão de esporos.

A diversidade genética encontrada em determinadas regiões pode ser o resultado de estresse ambiental (Dvornyk & Nevo 2003) causado por diversos fatores naturais (por ex.: El Niño) ou antropogênicos (por ex.: poluição). Além disso, mutações neutras, eventos de recombinação e elementos móveis podem favorecer o estabelecimento de populações geneticamente polimórficas.

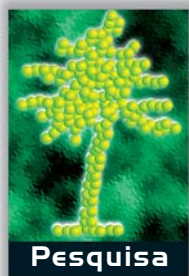
A invasão crescente de *C. raciborskii*, produtora de diversos compostos tóxicos em corpos d'água por todo o mundo, principalmente em regiões onde não havia qualquer registro de sua ocorrência, alerta para a premente necessidade de investigações genéticas em populações de diferentes regiões geográficas para subsidiar o entendimento atual em relação à produção de toxinas, limites ecofisiológicos e dispersão, visando o manejo destas populações na natureza.

Referências

- Bazza, E.L.; Train, S; Thomaz S.M. 1999. Flutuações na estrutura da comunidade fitoplânctônica durante o período de enchimento do reservatório de Corumbá (GO). In: VII Congresso Brasileiro de Limnologia. Florianópolis, p. 502.
- Bernard, C.; Harvey, M.; Briand, J.F.; Biré, R., Krys, S., Fontaine, J.J. 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindropermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. Environ. Toxicol. 18:176-186.
- Bittencourt-Oliveira, M.C.; Oliveira, M.C.; Bolch, C.J.S. 2001. Genetic

- variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpcBA*). J. Phycol. 37:810-818.
- Bittencourt-Oliveira, M.C. 2003.** Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. Harmful Algae 2: 51-60.
- Borges, P.A.F, Train S.; Rodrigues, L.C. 2003.** Flutuações temporais na abundância e estrutura de tamanho das fitocenoses planctônicas de cinco biótopos do alto rio Paraná. IX Congresso Brasileiro de Limnologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Bouvy, M.; Molica R.; Oliveira, S.; Marinho, M., Beker B. 1999.** Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. Aquatic Microb. Ecol. 20:285-297.
- Bouvy, M.; Falcão, D.; Marinho, M.; Pagano, M.; Moura, A. 2000.** Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. Aquatic Microb. Ecol. 23:13-27.
- Branco, C.W.C; Senna, P.A.C. 1991.** The taxonomic elucidation of the Paranoá Lake (Brasília, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. 61:85-91.
- Brasil 2001.** Portaria nº 1469/2000, de 29 de dezembro de 2000: aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 32 p.
- Brussard, P.F. 1984.** Geographic patterns and environmental gradients: the central-marginal model in *Drosophila* revisited. Annu. Ver. Ecol. Syst. 15: 25-64.
- Carmichael, W.W. 1992.** Status report on planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency. 149p.
- Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M.F.O; An., J.S; Molica R.J.R,** Jochimsen, E.M.; Lau, S.; Rinehart, K.L; Shaw, G.R; Eaglesham, G.K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environ. Health Persp. 109:663-668.
- Chorus, I.; Bartram, J. 1999.** Toxic Cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon, London. 416 p.
- Dvornyk, V.; Nevo, E. 2003.** Genetic polymorphism of cyanobacteria under permanent natural stress: a lesson from the "Evolution Canyons". Res. Microbiol. 154: 79-84.
- Dyble, J.; Paerl, H.W.; Neilan, B.A. 2002.** Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA*-IGS nucleotide sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2567-2571.
- Fabbro, L.D.; Kling, H.J; Duivenvoorden, L.J. 1996.** Morphological variation of *Cylindrospermopsis* in natural populations. *Cylindrospermopsis – A New Toxic Algal Bloom Challenge for Australia*. Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, Brisbane, Australia.
- Fernandes, V.O. 2003.** Ecossistemas aquáticos continentais do Espírito Santo: "berços" de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas? IX Congresso Brasileiro de Limnologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Hawkins, P.R.; Runnegar, M.T.C.; Jackson, A.R.B; Falconer, I.R. 1985.** Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. Appl. Environ. Microbiol. 50:1292-1295.
- Huszar, V.L.M., Silva, L.H.S; Marinho, M.; Domingos, P.; Sant'Anna, C.L. 2000.** Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. Hydrobiologia 424:67-77.
- Ishida, T.; Yokota, A; Sugiyama, J. 1997.** Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16SrRNA sequence divergence. J. Gen. Appl. Microbiol. 43: 237-241.
- Jardim, F.A.;Fonseca, Y.M.F;Vianna, L.N.L.; Azevedo, S.M.F.O.; Ciscotto, P.H.C. 2001.** Primeira Ocorrência de cianobactérias tóxicas em um reservatório da COPASA - Minas Gerais - Brasil: Revista Bios - Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas - PUC Minas. 9: 83-91.
- Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; Na, J.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.M.; Antunes, B.C.; Melo Filho, D.A; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.T.; Azevedo, S.M.F.O; Jarvis, W,R. 1998.** Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. New Engl J Med 338: 873-878.
- Kiss, T.; Vehovszky, Á.; Hiripi, L., Kovács, A; Vörös, L. 2002.** Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neuorenes. Comp Biochem Phys C 131:167-176.
- Komárková, J. 1988.** The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In:Azevedo M. T. P. (eds) IV Congr. Latino Americano Ficol., Brazil. Soc. Ficol. América Latina e Caribe, Caribe, Caxambu. p. 327-340.
- Komárkova, J.; Laudaes-Silva, R.; Senna, P.A.C. 1999.** Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. Algological Studies 94: 207-222.
- Lagos, N.; Onodera, H.; Zagatto, P.A; Andrinolo, D.; Azevedo, S.M.F.O.; Oshima, Y. 1999.** The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. Toxicon 37:1359-1373.
- Li, R.; Carmichael, W.W.; Brittain, S.; Eaglesham, G.K.; Shaw, G.R;**

- Mahakhant, A.; Noparatnaraporn, N.; Yongmanitchai, W.; Kaya, K.; Watanabe, W.W. 2001.** Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon* 39:973-980.
- Lyra, C.; Suomalainen, S.; Gugger, M.; Vezie, C.; Sundman, P.; Paulin, L.; Sivonen, K. 2001.** Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:513-26.
- McGregor, G.B.; Fabbro, L.D. 2000.** Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes Reserv. Res Manage* 5:195-205.
- Mendes, J.S.; Barbosa, J.E.L.; Watanabe, T. 2003.** Dinâmica da composição e biomassa fitoplânctônica durante a fase de enchimento da Barragem de Acauã, Itatuba –Paraíba. IX Congresso Brasileiro de Limnologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Molica, R.; Onodera, H.; García, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S.; Lagos, N. 2002.** Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41:606-611.
- Namikoshi, M.; Murakami, T.; Watanabe, M.F.; Oda, T.; Yamada, J.; Tsujimura, S.; Nagai, H.; Oishi, S. 2003.** Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 42: 533-538.
- Neilan, B.A.; Saker, M.L.; Fastner, J.; Torokné, A.; Burns, B.P. 2003.** Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol. Ecol.* 12: 133-140.
- Nelissen, B.; De Baere, R.; Wilmotte, A.; De Wachter, R. 1996.** Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *J. Mol. Evol.* V. 42, p. 194-200.
- Ohtani, I.; Moore, R.E.; Runnegar, M.T.C. 1992.** Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114:7941-7942.
- Oshima Y. 1995.** Postcolumn derivatization liquid chromatographic methods for paralytic shellfish toxins. *J AOAC Int* 78(2):528-532.
- Padisák, J. 1997.** *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch Hydrobiol.* 107(suppl 4):563-593.
- Palmer, C.M. 1969.** Report on the algae in relation water quality of Paranoa Lake, Brasília:1-14- Relatório de Consultoria, Pan American Health Organization/WHO.
- Panosso, R.; Costa, I.A.S.; Souza, S.R.; Morales C.; Azevedo, S.M.F.O. 2003.** Ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas e cianotoxinas em ambientes aquáticos do estado do Rio Grande do Norte. IX Congresso Brasileiro de Limnologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Pomati, F.; Neilan, B.A.; Suzuki, T.; Manarolla, G.; Rossetti, C. 2003.** Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). *J Phycol* 39:535-542.
- Prescott, G.W.; Andrews, T.F. 1955.** A new species of *Anabaenopsis* in a Kansas lake with notes on limnology – *Hydrobiologia* 7: 60-63.
- Proença, L.A.O.; Cunha, N.T.; Yunes J.S. 2002.** Análise da cianotoxina cilindrospermopsina em amostras de reservatórios. Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC. Disponível em: <http://www.cttmar.univali.br/algas/publicacoes/ciano16.pdf>. Acesso em: 23 set. 2003.
- Saker, M.L.; Neilan, B.A.; Griffiths, D.J. 1999.** Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *J. Phycol.* 35: 599-606.
- Saker, M.L.; Neilan, B.A. 2001.** Varied diazotrophies, morphologies and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from northern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1839-1845.
- Saker M.L.; Nogueira, I.C.G.; Vasconcelos, V.M.; Neilan, B.A.; Eaglesham, G.K.; Pereira, P. 2003.** First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:243-250.
- Silva, J.R.L.; Jardim, F.A.; Cunha, I.L.; Souza, F.P.; Wetmann, A. 2003.** Diagnóstico preliminar da ocorrência de cianobactérias tóxicas ou potencialmente tóxicas em captações de estações de tratamento de água e na praia da Graciosa em Palmas-TO. In: 55ª. Reunião Anual da SBPC. Recife, p. 61.
- Sivonen, K.; Jones, G.J. 1999.** Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and management.* London: E & FN Spon. p. 41-111.
- Souza, R.C.R.; Carvalho, M.C.; Truzzi, A.C. 1998.** *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and a contribution of the knowledge of Rio Pequeno arm, Billings Reservoir, Brazil. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13:73-81.
- Wilson, K.M.; Schmbri, M.A.; Baker, P.D.; Saint P.S. 2000.** Molecular characterization of toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 332-338.



Marcadores Moleculares e Geminivírus

Identificação de marcadores moleculares em populações de tomateiro resistentes a geminivírus

Loiva Maria Karnopp, Dra.

Engenheira Agrônoma,

Doutora em Ciências Biológicas.

Laboratório de Genética Molecular - UFPE.

loivamaria@bol.com.br; loiva@pop.com.br

Ilustrações cedidas pela autora

Introdução

O processamento do tomate é um dos segmentos mais importantes da indústria agroalimentar brasileira e vem ganhando mais adeptos, já que a área plantada com tomate rasteiro cresceu bastante na década de 90. Dos 60 mil hectares de tomateiro cultivados, cerca de 40% são destinados à indústria. O valor global de mercado foi de US\$800 milhões na virada do milênio (Filgueira, 2000). As principais áreas de produção encontram-se nas Regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Faria *et al.*, 2000). O tomate é a hortaliça com maior volume de comercialização no Brasil – 3 milhões de toneladas por ano (IBGE, 2000).

No início da década de 90, a agroindústria de tomate expandiu-se para novas regiões, especialmente no Cerrado, compreendendo áreas dos Estados de Goiás e de Minas Gerais. Em 2000, o Cerrado tornou-se a mais importante zona de produção de tomate industrial do país, com 77% da área plantada, seguido de São Paulo, com 14%, e da Região Nordeste, com apenas 9% (Melo, 2001). Naquele período, também houve um incremento extraordinário da produtividade, que, de cerca de 34,6 t/ha, em 1990, foi para 67 t/ha, na safra de 2000.

Um fator limitante no cultivo do tomateiro são as doenças viróticas, principalmente, devido à dificuldade de seu controle. No submédio São Francisco (PE e BA), os principais problemas estão relacionados com a estrutura produtiva, embora as condi-

ções agroecológicas locais sejam favoráveis à obtenção de matéria-prima de elevado padrão de qualidade e a custo mais baixo que nas demais áreas de produção do país, como São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Nessa região, a produção de tomate para indústria está concentrada nas mãos de pequenos e médios produtores que, por utilizarem um sistema de manejo tecnologicamente ineficiente, obtêm uma produtividade muito baixa, em torno de 30 t/ha nas últimas safras; enquanto, no interior de São Paulo, esse índice é de 65 t/ha sob condições climáticas favoráveis.

A produção mundial de tomate para processamento industrial nos últimos dez anos oscilou entre 22,6 e 29,6 milhões de toneladas anuais. Entre os maiores produtores estão os Estados Unidos, a Itália, a Turquia, a Espanha, a Grécia e o Brasil (Silva & Giordano, 2000). A previsão de safra do tomate para consumo e para a indústria, para janeiro de 2003, foi de 3.567,080 toneladas, com um rendimento médio de 58.422 kg/ha e uma área plantada de 61.057 hectares (IBGE, 2003).

A família *Geminiviridae* possui alguns dos fitovírus de maior importância econômica no Brasil e no mundo. Juntamente com os *Tospovirus*, os *Geminivirus* são considerados vírus emergentes, pois a incidência e a severidade das doenças causadas por eles têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas, o que parece estar mais relacionado com a explosão populacional de seus respectivos insetos vetores do que com o vírus propriamente dito.

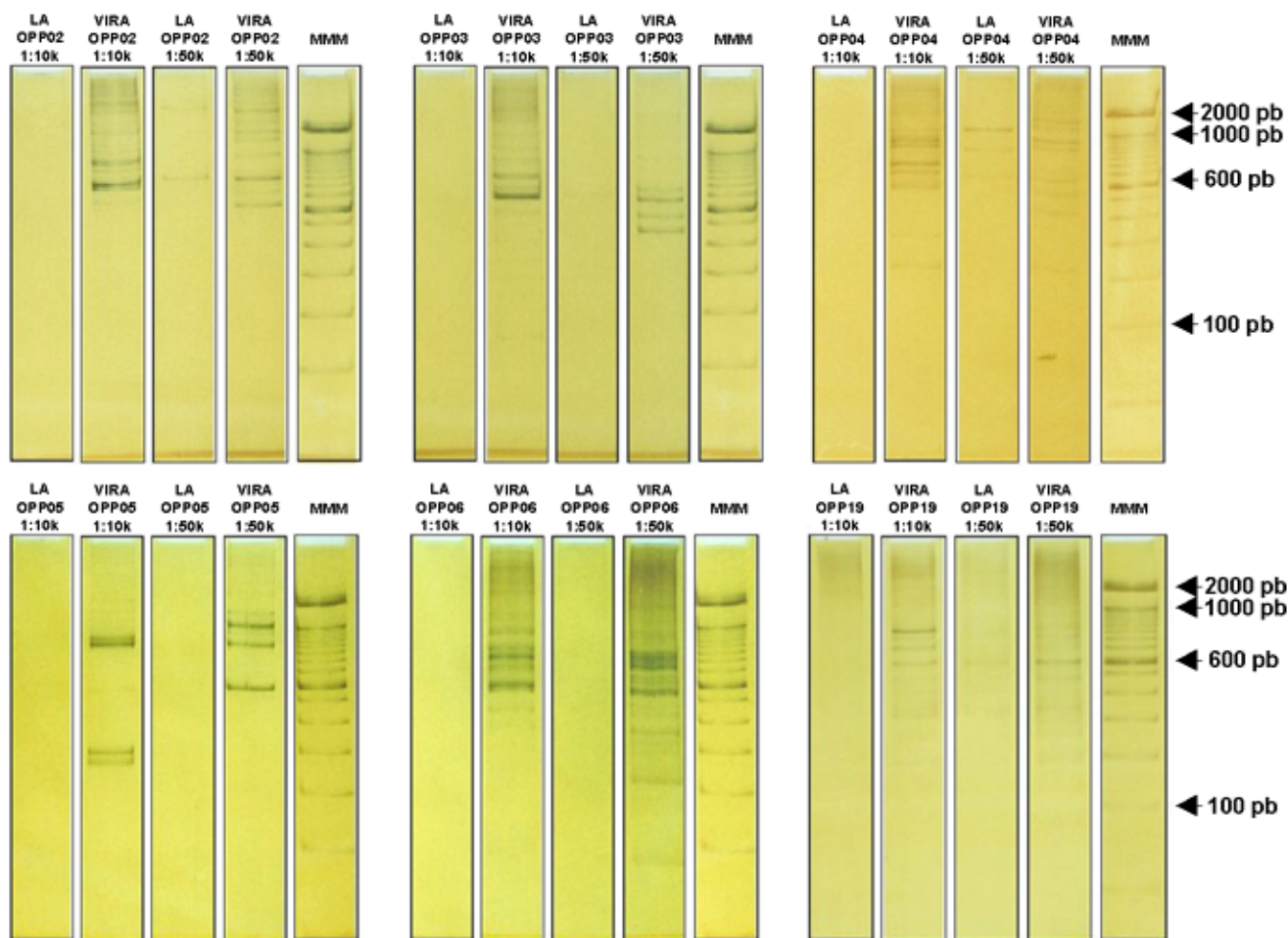


Fig. 1. Padrões de bandas de RAPD produzidos pelos primers OPP02, OPP03, OPP04, OPP05, OPP06 e OPP19. **LA:** linhagem LA3473, resistente a geminivírus, **VIRA:** cultivar Viradoro, suscetível a geminivírus, 1:10 e 1:50: diluições do DNA.

Os geminivírus, assim chamados por estar o seu DNA fita simples disposto em dois componentes circulares, são vírus transmitidos por moscas-brancas do complexo *Bemisia* spp. que infectam dicotiledôneas, e que têm causado severos danos em diversas culturas pelo mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Em muitas áreas, constituem-se o mais grave entrave para a produção de mandioca, feijão, pimenta, tomate e algodão. No Brasil, como em toda a América Latina, os geminivírus causam enormes prejuízos à produção de feijão, infectando-o com a doença conhecida como BGMV ou Mosaico Dourado do Feijoeiro (Hanson & Maxwell, 1999).

A sintomatologia não é parâmetro suficiente para identificar e diferenciar os geminivírus porque os sintomas dependem da época de infecção da planta, do hospedeiro (cultivar), de fatores ambientais, como altas temperaturas e pouca chuva, que

favorecem o aparecimento do vetor e da ocorrência de infecção viral múltipla. As técnicas moleculares têm permitido o desenvolvimento de métodos de detecção universal para toda uma família ou ordem, ou específicos para uma determinada espécie, de forma eficiente, rápida, acurada e de forma otimizada para vírus. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica específica e extremamente sensível e tem sido utilizada para a detecção e o estudo da variabilidade genética de geminivírus, tanto a partir de tecidos de plantas como de DNA extraído de insetos vetores (Mehta *et al.*, 1994, entre outros).

Os insetos do gênero *Bemisia* são polívoros, com, pelo menos, 506 espécies de plantas hospedeiras distribuídas em 74 famílias, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Como hospedeiros preferenciais desse inseto, estão as brássicas (brócolis, couve-flor, repolho), as cucurbitáceas (abobrinha, melão, chuchu, melancia, pe-

pino), as leguminosas (feijão, feijão-de-vagem, soja), as solanáceas (berinjela, fumo, pimenta, tomate, pimentão), o algodão, a uva e algumas ornamentais, como o bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) e o crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Tem sido também relatada a sua ocorrência em plantas daninhas, como, entre outras, o picão (*Bidens pilosa* L.), joá-de-capote (*Nicandra physaloides* (L.) Gaertn.), datura (*Datura stramonium* L.) guaxuma (*Sida rhombifolia* L.), pinhão manso (*Jatropha gossypifolia* L.) e *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. (França *et al.*, 2000).

No Nordeste do Brasil, notadamente no Estado do Piauí, o gênero *Bemisia* ocorre em vários hospedeiros. No entanto, é na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) que esse gênero tem maior importância, pois a espécie *B. tabaci* é citada como vetora do Mosaico Amarelo do Caupi (Santos, 1982).

Os danos causados por *B. argentifolii* podem ser de dois tipos: direto, pela sucção de seiva e ação toxicogênica, além de liberação de secreções açucaradas que favorecem o desenvolvimento da fumagina, e indireto, pela transmissão de vírus, geralmente, pertencentes ao grupo geminivírus. Com a introdução do estilete no tecido vegetal, os insetos (adultos e ninfas) provocam alterações no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta, debilitando-a e reduzindo, conseqüentemente, a produtividade e a qualidade dos frutos. Em altas densidades populacionais, as perdas podem chegar a 50% na produção. As manchas cloróticas nas folhas são causadas pela injeção de saliva das ninfas e adultos durante a sucção. Infestações muito intensas ocasionam murcha, queda de folhas e perda de frutos (França *et al.*, 2000).

Na cultura do tomate, os danos diretos causados pela mosca branca podem ser visualizados externamente através de anomalias ou desordens fitotóxicas caracterizadas pelo amadurecimento irregular dos frutos, causado pela injeção de toxinas durante a alimentação do inseto. Ao mesmo tempo, as excreções açucaradas produzidas pela mosca favorecem o desenvolvimento da fumagina sobre os frutos e folhas, reduzindo a capacidade fotossintética da planta, e afetando a qualidade e a produção dos frutos. A desuniformidade na maturação dos frutos dificulta o reconhecimento do ponto de colheita e reduz, no caso de tomate para indústria, a qualidade da polpa (Haji *et al.*, 1997).

De maneira geral, a ação dos vírus apresenta como sintomas característicos o amarelecimento total da planta, nanismo acentuado e severo enrugamento das folhas terminais das plantas, podendo ocasionar perda total da produção (Haji *et al.*, 1997). Quando o vírus infecta plantas ainda jovens, essas têm o crescimento paralisado e as perdas na produção podem variar de 40% a 70%. Para o tomate industrial, também são relatados sintomas como clorose, nanismo e encrespamento das folhas, pouca floração e amadurecimento irregular dos frutos, causado, provavelmente, por toxinas injetadas

pelo inseto, o que dificulta o reconhecimento do ponto de colheita desses frutos e reduz a produção e a qualidade da pasta, além de reduzir o grau brix. Internamente os frutos são esbranquiçados, com aspecto esponjoso ou “isoporizados” (França *et al.*, 2000).

Geminivírus no Brasil

O primeiro relato de geminivírus em tomateiro, no Brasil, é da década de 70 (Maytis *et al.*, 1975). Seis diferentes vírus transmitidos pela mosca-branca foram observados, sem, entretanto, causarem danos de importância econômica.

Em 1994, no Distrito Federal, foi observada a ocorrência de nova espécie de geminivírus não relatada em outras regiões do mundo (Ribeiro *et al.*, 1994). Em 1995, a virose expandiu-se por toda a Região Centro-Oeste, causando perdas médias de 40% a 100% (Bezerra *et al.*, 1996).

Nos últimos anos, foram observados em tomateiros, em várias regiões do Brasil, danos significativos causados por geminivírus associados à ocorrência de *B. argentifolii* (França *et al.*, 1996). Em Minas Gerais, Rezende *et al.* (1996) e Zerbini *et al.* (1996) observaram perdas superiores a 50% da produção no cinturão verde de Belo Horizonte e no Triângulo Mineiro. A clonagem e o sequenciamento de fragmentos de DNA dos componentes A e B de geminivírus isolados dessas duas regiões indicaram tratar-se de dois geminivírus distintos (Ribeiro *et al.*, 1998b). Em São Paulo, um novo geminivírus em tomateiro foi descrito por Faria *et al.* (1997). O surgimento quase simultâneo de novos geminivírus que infectaram tomateiros na Região Sudeste sugere uma mudança nas populações da mosca-branca, com maior predominância de *B. argentifolii* sobre *B. tabaci*. Esse fato criaria condições para que vírus que infectam plantas selvagens invadam o tomateiro e, uma vez adaptados ao novo hospedeiro, dêem origem a um novo vírus através de recombinação ou reagrupamento de componentes. Ressalte-se que os geminivírus vêm sendo relatados em plantas daninhas amplamente disse-

minadas naquela região (Krause *et al.*, 1998, entre outros).

Na Região Nordeste, o primeiro relato de geminivírus foi em 1996, no município de Seabra, na Bahia. Sintomas de mosaico amarelo foram observados em uma plantação de tomateiro com incidência da doença em 100% da cultura. A análise de tecido de plantas sintomáticas revelou a presença de geminivírus com genoma bipartido (Ribeiro *et al.*, 1996). Naquelas áreas, 100% das plantas com menos de dois meses após o transplante apresentavam-se infectadas (Bezerra *et al.*, 1997). Semelhantemente ao relatado para outras regiões, o aparecimento de geminivíroses naquela área ocorreu após o surgimento e a explosão da população de *B. argentifolii* em 1995 e em 1996, em culturas de importância econômica para a região, como melão, melancia e tomate.

Em 1997, a doença foi relatada no submédio São Francisco, a maior região produtora de tomate para processamento industrial do Brasil (Bezerra *et al.*, 1997). Até o momento, a caracterização molecular de geminivírus coletados no submédio São Francisco mostra a presença de três novas espécies não relatadas em outras regiões do mundo. Foram encontradas infecções mistas em uma planta, sugerindo que a situação é mais complexa que a relatada até o momento em outras regiões (Ribeiro *et al.*, 1998a). De acordo com Faria *et al.*, 1997, ainda naquele ano foi detectada uma nova espécie de geminivírus, denominada risca amarela da nervura do tomateiro (*tomato yellow vein streak virus*, TYVSV). No Estado do Rio de Janeiro, foi também observada a presença de geminivírus em amostras coletadas no município de Campos.

No ano de 1998, foi detectada a presença de geminivíroses em material coletado no Ceará (Bezerra *et al.*, 1998). Considerando-se o alto grau de severidade de doenças causadas por esses vírus, a relativa inexistência de fontes naturais de resistência no Brasil, a ampla gama de hospedeiros (plantas daninhas, silvestres e plantas ornamentais) e a pouca informação referente às espécies encontradas no país, essa é, atualmente, a

principal doença de tomate nas regiões produtoras dessa hortaliça para processamento industrial.

Técnicas diagnósticas de fitovírus

Os vírus de plantas são conhecidos por sua extraordinária diversidade genética, tanto dentro da mesma espécie como entre espécies diferentes. Para o diagnóstico correto de uma doença viral, muitas vezes faz-se necessária a aplicação de dois ou mais métodos para o diagnóstico correto do vírus em estudo. A escolha deve ser função da sensibilidade, exatidão e reprodutibilidade do método, quantidade de amostras processadas em um determinado período de tempo, custo do material utilizado, sofisticação dos aparelhos e adaptabilidade às condições de tempo (Zambolim, 1999). Diversos métodos têm sido empregados para detectar geminivírus em tomate, incluindo técnicas sorológicas e PCR.

O RAPD

O RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") é uma técnica derivada da PCR. Uma das limitações da PCR é a necessidade do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência do DNA de interesse. Para que se conheçam essas seqüências, são necessários a clonagem e o seqüenciamento da região. Por isso, com exceção de alguns genes de seqüência conhecida, a PCR apresentou, inicialmente, uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares. O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária na reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da seqüência. Essa técnica foi desenvolvida, independentemente, por dois grupos nos Estados Unidos. Williams *et al.*, em 1990, patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD, ou seja, DNA polimórfico amplificado ao acaso.

Objetivo

Através da técnica de RAPD, é possível distinguir cultivares resistentes de cultivares suscetíveis a geminivíroses, gerando um padrão de bandas específico para cada grupo. Folhas jovens de plantas da linhagem LA3473 e da cultivar Viradoro foram submetidas à análise por RAPD na tentativa de encontrar marcadores que identificassem resistência ou suscetibilidade.

Material e métodos

Viradoro é uma cultivar destinada ao processamento industrial, resistente ao Viracabeça do tomateiro (Tospovírus), à mancha-de-estenfílio (*Stemphylium solani* Weber), à murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *Lycopersici* (Fol) (Sacc.) raça 1) e ao nematóide das galhas (*Meloidogyne spp.*), porém suscetível a geminivírus. Como características principais dessa cultivar podem ser citados: hábito de crescimento determinado, excelente cobertura dos frutos, sendo estes firmes e de formato quadrado-oblongo, maturação uniforme, com coloração externa vermelho-escuro brilhante. O brix varia de 4,4% a 4,7% e o peso médio dos frutos é de 70 a 80 gramas. Em condições experimentais, Viradoro tem alcançado a produtividade de 90 toneladas por hectare. Essa cultivar foi selecionada a partir de cinco ciclos de autofecundação desenvolvidos após o quarto retrocruzamento sucessivo para a cultivar IPA-5, tendo como progenitor não recorrente a linhagem TSW-10, com resistência a Tospovírus.

A linhagem LA3473, resistente a geminivírus, possui hábito de crescimento determinado médio, porte médio, frutos alongados de tamanho médio, produz aproximadamente 15 frutos por quilo e sua provável origem é Israel. Essa linhagem possui o gene *wilt*, cujos sintomas são muito semelhantes aos sintomas apresentados pelas plantas infectadas com geminivírus (Ednardo Ferraz, comunicação pessoal).

Semeadura do material

Sementes da linhagem LA3473 e da cultivar Viradoro foram semeadas em bandejas de isopor próprias para este fim e colocadas em casa de vegetação. A percentagem de germinação foi geralmente superior a 85%. A coleta do material foi efetuada após emissão da terceira folha do tomateiro, em média, com 29 a 35 dias de idade, guardando-se em sacos plásticos individuais, etiquetados e armazenados em freezer a temperatura de 80°C negativos até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA total

Para a extração de DNA total, utilizou-se o protocolo de Dellaporta *et al.* (1983), com modificações. Uma pequena amostra de tecido foliar jovem (dois discos foliares) foi macerada em nitrogênio líquido e colocada em um tubo eppendorf de 1,5 ml com 700 µl do tampão de extração (100 µM de EDTA, 2,5 M de NH_4Ac , 100 mM de tampão Tris, pH 8,0), sendo incubada em banho-maria a 65°C. Após o resfriamento, adicionaram-se-lhe 600 µl de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1) e a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos e 1/10 do volume de SDS 20% + NaCl 1,4M foi-lhe adicionado. Após a homogeneização da solução, repetiu-se a extração com 600 µl de clorofil. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos. Adicionou-se 2/3 do volume da solução aquosa de isopropanol gelado (-20°C). A seguir, os microtubos foram centrifugados a 7.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente. O pellet foi lavado duas vezes em 1 ml de etanol 70% e uma vez em etanol 95%. O etanol foi descartado e o precipitado ficou a temperatura ambiente para secar e, posteriormente, foi ressuspenso em 100 µl de tampão TE. Diversas diluições do DNA foram testadas, entre elas: 1:10; 1:50; 1:100; 1:200; 1:500 e 1:1000.

RAPD

Foram empregados 20 primers da série OPP (Operon Technologies Inc.) para a amplificação do material, cuja mistura básica continha: 10 ng de DNA/ml, 2.5 µl do tampão de PCR (Amersham Pharmacia) (10X); 1.7 µl de MgCl₂ (25 mM); 1.25 µl da solução de dNTPs (2mM cada); 2.5 µl do primer (4µM) e 0.4 µl de Taq polimerase (5 U/ml); água q.s.p. 25 µl. O material foi submetido às seguintes etapas de amplificação: um ciclo de desnaturação a 94°C por 3 min. seguido por 94°C por 15 seg., 42°C por 30 seg. e 72°C por 1 minuto. As três últimas etapas foram repetidas quarenta e três vezes. A amplificação foi concluída a 72°C por 7 minutos.

Visualização do produto de amplificação

Os amplicons foram separados em gel de poliacrilamida 6%. Os géis foram fixados e digitalizados diretamente em scanner de mesa ou fotografados sob transiluminação com luz branca e película em cores.

Estimativa da quantidade de DNA

A estimativa da quantidade de DNA foi efetuada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, utilizando-se um volume conhecido de solução de DNA (marcador de 100 pares de bases, Gibco) como padrão para inferir a concentração de DNA nas amostras.

Resultados e Discussão

A técnica do RAPD é muito utilizada para o estudo da diversidade genética, construção de mapas genéticos, identificação de marcadores ligados a resistência a bactérias, fungos, vírus, determinação da pureza e identificação de híbridos, entre outros (Weikert-Oliveira *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2002). A velocidade, eficiência e confiabilidade da metodologia RAPD em conjunto com a análise numérica, torna essa técnica particularmente apropriada na formulação de estratégias para um manejo efetivo de coleções de

germoplasma em termos de identificação de duplicatas, estimativa da diversidade, monitoramento da erosão genética e aumento do uso das coleções.

O método de extração usado para obter DNA a partir de discos foliares de tomateiros permitiu a obtenção de DNA com grau de pureza elevado, que pode ser empregado em reações de RAPD, sem inibição da Taq polimerase por componentes vegetais contaminantes. O rendimento do método permitiu obter uma quantidade bastante variável de DNA, tipicamente entre 2 e 20 µg de DNA, para cada 2 discos foliares.

Dos 20 primers constantes do kit OPP empregado, apenas 8 produziram produtos de amplificação com DNA de tomateiro. Ao se compararem os padrões de bandas obtidos pela separação em eletroforese em SDS poliacrilamida dos produtos de amplificação gerados no RAPD (Figura 1), 6 primers mostraram ser discriminativos, produzindo um padrão de bandas para a cultivar Viradoro muito distinto daquele obtido para a linhagem LA3473. Para todos esses primers, não foram obtidas bandas para a linhagem LA3473 quando se empregou 1 µl de DNA de tomate previamente diluído 10⁴ vezes em TE. Ao contrário, um padrão composto por, pelo menos, 3 bandas nítidas foi obtido para a cultivar Viradoro nessas condições. A redução da quantidade de DNA alvo na reação, pela diluição prévia do DNA extraído das plantas em 5 x 10⁴ vezes, resultou no aparecimento de uma a três bandas de pouca intensidade na amplificação do DNA obtido da linhagem LA3473 para 4 primers, conservando o padrão complexo de bandas para a outra cultivar, para os 6 primers selecionados.

Os padrões de bandas obtidos para a cultivar Viradoro não foram idênticos quando foram empregadas duas diluições distintas de DNA alvo: exceto para o primer OPP5, os padrões obtidos tendiam a apresentar bandas de peso molecular mais alto para a quantidade maior de DNA alvo. Fontes e concentrações de primers diferentes influenciam o padrão de bandas e certos primers produzem padrões de bandas mais confiáveis quando usados em concentrações mais altas do que o usual, provavelmente porque o DNA genômico

usado possui uma frequência muito rara de sítios de anelamento para esses primers, de modo que sua concentração efetiva para amplificação é diminuída no tubo da reação. Esse efeito também foi observado no mesmo laboratório quando se utilizou DNA de *Musa* com os mesmos primers. No presente trabalho, foi observado efeito semelhante no padrão de bandas, com diferentes concentrações de DNA genômico, como, por exemplo, para a cultivar Viradoro, à medida que havia um aumento da concentração de DNA genômico, bandas de maior peso molecular podiam ser visualizadas, com qualquer um dos cinco primers empregados, exceto o OPP5. A intensidade do marcador RAPD está associada ao grau de homologia entre o primer e a amostra ou à amplificação de outros fragmentos da amostra, o que pode explicar o aparecimento de bandas de menor intensidade no presente trabalho. O poder discriminatório dos primers aleatórios não depende somente do número de padrões gerados, mas também da frequência dos diferentes padrões.

Conclusão

Pode-se inferir deste trabalho que a metodologia utilizada mostrou-se satisfatória para a discriminação de plantas de tomate resistentes e suscetíveis a geminivírus, visto que foi obtido um padrão reproduzível de bandas para o material suscetível.

Apoio Financeiro:

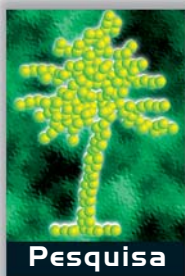
CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Referências Bibliográficas

- Bezerra, I.C.; Lima, M.F.; Ribeiro, S.G.; Giordano, L.B.; Zerbini, F.M.; Ávila, A.C. (1997) **Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submediterranean São Francisco**. Fitopatologia brasileira, v.22, p.331.
- Bezerra, I.C.; Ribeiro, S.G.; Ávila, A.C.; Giordano, L.B. (1996) **Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal**

- District.** Programa e Resumos, 8º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, p.289.
- Bezerra, I.C.; Lima, M.F.; Nunes, M.U.C.; Lopes, E.S.; Ávila, A.C. (1998) **New record of geminivirus occurring in Northeast region of Brazil.** Programa e Resumos, 9º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, p.143.
- Carvalho, G.A.; Sedyama, T.; Alzate-Marin, A.L.; Barros, E.G.; Moreira, M.A. (2002) **Identificação de marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao cancro da haste da soja.** Fitopatologia brasileira, v.27, p.474-478.
- Dellaporta, S.L.; Wood, J.; Hicks, J.B. (1983) **A plant DNA minipreparation: version II.** Plant Molecular Biology Reporter, v.1, p.19-21.
- Faria, J.C.; Bezerra, I.C.; Zerbini, F.M.; Ribeiro, S.G.; Lima, M.F. (2000) **Situação atual das geminiviroses no Brasil.** Fitopatologia brasileira, v.25, p.125-137.
- Faria, J.C.; Souza-Dias, J.A.C.; Slack, S.; Maxwell, D.P. (1997) **A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil.** Plant Disease, v.81, p.423.
- Filgueira, F.A.R. (2000) **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: UFV, 402p., il.
- França, F.H.; Villas Boas, G.L.; Branco, M.C. (1996) **Ocorrência de Bemisia argentifolii Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal.** Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v.25, p.369-372.
- França, F.H.; Villas Boas, G.L.; Branco, M.C.; Medeiros, M.A. (2000) **Manejo integrado de pragas. In: Tomate para processamento industrial,** Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, EMBRAPA Hortaliças, 168p.; il.
- Haji, F.N.P.; Alencar, J.A.; Lima, M.F.; Mattos, M.A.A.; Honda, O.T.; Haji, A.T. (1997) **Avaliação de produtos para o controle da mosca branca (Bemisia spp.) na cultura do tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)** Boletim Técnico EMBRAPA, n.84.
- Hanson, S.F.; Maxwell, D.P. (1999) **trans-dominant inhibition of geminiviral DNA replication by bean golden mosaic geminivirus rep gene mutants.** Phytopathology, v.89, p.480-486.
- IBGE. <http://www.ibge.net/home/estatistica/economia/pam/tabela1pam.shtm.07/2000>.
- IBGE. [http://www.ibge.gov.br/Levantamento Sistematico da Produção Agrícola \(LSPA\). 14/03/2003](http://www.ibge.gov.br/LevantamentoSistematico-da-ProducaoAgricola-(LSPA).14/03/2003).
- Krause, R.; Boari, A.J.; Ambrozevícius, L.P.; Maciel-Zambolim, E.; Zerbini, F.M. (1998) **Salvia splendens, natural host of a new geminivirus.** Fitopatologia brasileira, v.23, p.318.
- Maytis, J.C.; Silva, D.M.; Oliveira, A.R.; Costa, A.S. (1975) **Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro.** Summa Phytopathologica, v.1, p.267-275.
- Mehta, P.; Wyman, J.A.; Nakhla, M.K.; Maxwell, D.P. (1994) **Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl geminivirus by Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae).** Journal of Economic Entomology, v.87, p.1291-1297.
- Melo, P.C.T. (2001) **A cadeia agro-industrial do tomate no Brasil: retrospectiva da década de 90 e cenários para o futuro.** Horticultura brasileira, v.19, suplemento.
- Rezende, E.A.; Filgueira, F.A.R.; Zerbini, F.M.; Maciel-Zambolim, E.; Fernandes, J.J.; Gilbertson, R.L. (1996) **Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil.** Fitopatologia brasileira, v.21, p.424.
- Ribeiro, S.G.; Bezerra, I.C.; Lima, M.F.; De Ávila, A.C.; Giordano, L.B. (1996) **Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia.** Programa e Resumos, 8º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, p.290.
- Ribeiro, S.G.; Bezerra, I.C.; Rezende, R.O.; Lima, M.F.; Resende, L.V.; De Ávila, A.C. (1998a) **Three new geminiviruses in tomato in the state of Pernambuco.** Fitopatologia brasileira, v.23, suplemento.
- Ribeiro, S.G.; De Ávila, A.C.; Bezerra, I.C.; Fernandes, J.J.; Faria, J.C.; Lima, M.F.; Gilbertson, R.L.; Maciel-Zambolim, E.; Zerbini, F.M. (1998b) **Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector.** Plant Disease, v.82, p.830.
- Ribeiro, S.G.; Mello, L.V.; Boiteux, L.S.; Kitajima, E.W.; Faria, J.C. (1994) **Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil.** Fitopatologia brasileira, 19 (suplemento), p. 330.
- Santos, A.A. dos. (1982) **Doenças do caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp) no Estado do Piauí.** In: Reunião Nacional de pesquisa do Caupi. I., 1982, Goiânia. Resumos...Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, p.99. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 4).
- Silva, J.B.C.da; Giordano, L.B. (2000) **Produção mundial e nacional.** In: Tomate para processamento industrial, Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, EMBRAPA Hortaliças, 168p.; il.
- Weikert-Oliveira, R.C.B.; Resende, M.A.; Valério, H.M.; Caligiorne, R.B.; Paiva, E. (2002) **Genetic variation among pathogens causing "Helminthosporium" diseases of rice, maize and wheat.** Fitopatologia brasileira, v.27, p.639-643.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990) **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Research, v.18, p.6531-6535.
- Zambolim, E.M. (1999) **Métodos de diagnose em vírus.** Fitopatologia brasileira, v.24, suplemento, p.236-237.
- Zerbini, F.M.; Maciel-Zambolim, E.; Fernandes, J.J.; Gilbertson, R.L.; Carrijo, I.V. (1996) **Um novo geminivírus isolado de tomateiro (L. esculentum) em Minas Gerais.** Fitopatologia brasileira, v.21, p.430.





Glucanases Fúngicas

Produção e aplicações das β -1,3 e β -1,6 glucanases

Ellen Cristine Giese

Bacharel em Química, Mestranda em Biotecnologia do Programa de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Londrina - PR
ellengiese@bol.com.br

Aneli de Melo Barbosa

Farmacêutica-Bioquímica, Dra. em Bioquímica (UFPR), Pós-doutora em Biotecnologia (Murdoch University, Perth- WA, Austrália), Profa. Associado C do Departamento de Bioquímica - CCE, Universidade Estadual de Londrina - PR
aneli@uel.br

Maria de Lourdes Corradi da Silva

Farmacêutica-Bioquímica, Dra. em Bioquímica (UFPR), Pós-doutora em Bioquímica (Ohio State University, Columbus-OH, USA), Professora Assistente Doutora do Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP/Presidente Prudente - SP
corradi@prudente.unesp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Introdução

Exopolissacarídeos são gomas solúveis em água, produzidos por uma ampla variedade de microrganismos e possuem propriedades físicas peculiares, que favorecem o emprego nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, petrolíferas, entre outras (Margaritis & Pace, 1985). Estes biopolímeros podem ser degradados por hidrolases específicas denominadas polissacaridasas (Sutherland, 1999). Estas enzimas, amplamente distribuídas em fungos, são classificadas como β -glucanases quando hidrolisam ligações β -D-glicosídicas (Manners *et al.*, 1976).

O crescente interesse no estudo das β -glucanases concentra-se no seu potencial de aplicação industrial, considerando a sua ação hidrolítica sobre diversas substâncias naturais (Warren, 1996; Kirk *et al.*, 2002).

A atividade das glucanases ocorre em todos os estágios do ciclo de vida fúngico, incluindo a autólise. A resistência das hifas à lise celular tem sido atribuída ao equilíbrio entre a síntese e a hidrólise de uma variedade de ligações β -glicosídicas (White *et al.*, 2002). As β -glucanases estão localizadas tanto no citoplasma das células fúngicas, como também ligadas à parede celular (Santos *et al.*, 1979).

O papel das β -1,3-glucanases fúngicas na natureza parece estar associado à morfogênese (Rapp, 1992). Em leveduras, estas hidrolases têm sido estudadas devido ao seu papel na germinação, esporulação e crescimento celular, sendo expres-

sas de diferentes maneiras durante o crescimento vegetativo (McLeod *et al.*, 2003).

As β -glucanases fúngicas estão associadas aos processos de sobrevivência, degradação de polissacarídeos (Noronha *et al.*, 2000), patogenicidade (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998), sendo que durante muito tempo se acreditou que a função original destas enzimas estaria relacionada à promoção do crescimento e divisão celular (McLeod *et al.*, 2003).

Alguns fungos, tais como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizomucor* e *Absidia*, são patogênicos para humanos. Algumas drogas antifúngicas agem sobre estes microrganismos, estimulando a ação de enzimas envolvidas no metabolismo de glucanas, como as β -1,3-glucanases, que estão associadas com a diminuição da resistência à fagocitose (Lupetti *et al.*, 2003).

Em 1957, Stone descreveu a complexidade das β -glucanases de *Aspergillus niger*, relatando a presença de β -1,3-glucanases nas preparações de celulasas provenientes deste fungo. Reese e Mandels (1959) selecionaram 140 fungos produtores constitutivos de β -1,3-glucanases e, através da análise por cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos resultantes da hidrólise enzimática de laminarina (β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana), propuseram dois mecanismos de ação para estas enzimas: (a) Endo-, constituindo uma ação randômica no substrato, resultando em oligossacarídeos de maior peso molecular e (b) Exo-, produzindo glucose como único produto de hidrólise.

A cromatografia em camada delgada ainda é utilizada para determinar o modo de ação das β -glucanases. Campbell e colaboradores (2003) analisaram os produtos de hidrólise dos filtrados de meio de cultivo de *Aureobasidium pullulans* incubados com laminarina, escleroglucana e epiglucana e verificaram moléculas de glucose como os maiores produtos de hidrólise. Esta observação sugere que a hidrolase produzida por *Aureobasidium pullulans* é uma β -1,3-glucanase.

Reese e colaboradores (1961) foram os primeiros pesquisadores a estudar as β -1,6-glucanases fúngicas, cuja atividade parece estar associada à atividade de β -1,3-glucanase, em alguns microrganismos (Pitson *et al.*, 1991). Estes pesquisadores observaram que a hidrólise da pustulana (β -1 $\rightarrow$ 6)-glucana através de β -1,6-glucanases resultou em moléculas de gentiotetraose, gentiotriose, gentiobiose e glucose, constatando que estas enzimas são do tipo endo e atuam randomicamente.

A ocorrência de glucanas do tipo β -1 $\rightarrow$ 6 na natureza é rara, sendo que geralmente as ligações glicosídicas deste tipo ocorrem em conjunto com ligações do tipo β -1 $\rightarrow$ 3 em polímeros produzidos por algas, leveduras, fungos e bactérias.

Em 1975, Villa e colaboradores elaboraram uma hipótese sobre a existência de uma β -glucanase não específica, que apresentaria tanto atividade hidrolítica nas ligações do tipo β -1 $\rightarrow$ 3 quanto β -1 $\rightarrow$ 6, em filtrados da levedura *Pichia polymorpha*. Vários estudos foram desenvolvidos sobre polissacaridasas fúngicas com atividade de β -glucanases. A classificação destas enzimas está apresentada na Tabela 1.

Produção e regulação da síntese de β -1,3 e β -1,6-glucanases

A relação entre a atividade das β -glucanases e a síntese e degradação das β -glucanas por seus respectivos fungos produtores ainda não foi estabelecida (Pitson *et al.*, 1991).

O fungo *Sclerotium glucanicum* é produtor de uma β -1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-glucana extracelular denominada escleroglucana. Rapp (1989) analisou a produção desta β -glucana e as respectivas hidrolases deste fungo utilizando glucose 1% (p/v) como única fonte de carbono; observou um decréscimo do EPS e da biomassa no meio de cultivo, acompanhado do aumento da atividade das glucanases no período em que a concentração do substrato diminuiu.

A ocorrência de atividade de β -1,3 e β -1,6-glucanase também foi relatada no fungo *Acremonium persicinum*, o qual é produtor de uma β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana extracelular. Pitson e colaboradores (1991) verificaram a presença destas polissacaridasas nos sobrenadantes do meio de cultivo, assim como no citoplasma e na parede celular fúngica.

O fungo *Acremonium* sp. também é produtor de três β -1,3-glucanases e uma β -1,6-glucanase extracelular somente na presença de indutores como a laminarina, pustulana ou escleroglucana. Jayus e colaboradores (2002) analisaram a produção de β -1,3 e β -1,6-glucanases por *Acremonium* sp.; sugeriram que a atividade de β -1,3-glucanase encontra-se associada ao crescimento fúngico, ao contrário da atividade da β -1,6-glucanase.

Pitson e colaboradores (1997) constataram que existe uma ação sinérgica entre β -glucanases e β -glucosidasas em *Acremonium persicinum*, ou seja, os produtos de hidrólise das β -1,3 e β -1,6-glucanases foram facilmente degradados pelas β -glucosidasas, gerando principalmente glucose e também alguns oligossacarídeos.

Tabela 1. Classificação das polissacaridasas e exemplos de fungos produtores de enzimas capazes de hidrolisar β -(1 $\rightarrow$ 3)- e β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucanas

Polissacaridasas	Microrganismos	Referências
exo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.58)	<i>Sclerotinia libertiana</i>	Manners <i>et al.</i> (1976)
	<i>Penicillium italicum</i>	Santos <i>et al.</i> (1977)
	<i>Neurospora crassa</i>	Del Rey <i>et al.</i> (1979)
	<i>Aspergillus niger</i>	Kéry <i>et al.</i> (1989)
	<i>Penicillium oxalicum</i>	Pitson <i>et al.</i> (1991)
	<i>Sclerotium glucanicum</i>	Rapp (1992)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Noronha <i>et al.</i> (2000)
	<i>Acremonium</i> sp.	Jayus <i>et al.</i> (2002)
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Campbell <i>et al.</i> (2003)
	<i>Trichoderma asperellum</i>	Bara <i>et al.</i> (2003)
endo- α -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39)	<i>Rhizopus arrhizu</i>	Reese & Mendels (1959)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Vásquez-Garcidueñas <i>et al.</i> (1988)
	<i>Sclerotium glucanicum</i>	Rapp (1992)
endo- β -1,6-glucanases (EC 3.2.1.75)	<i>Penicillium italicum</i>	Santos <i>et al.</i> (1977)
	<i>Neurospora crassa</i>	Del Rey <i>et al.</i> (1979)
	<i>Sclerotium glucanicum</i>	Rapp (1989)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	de la Cruz <i>et al.</i> (1993)
	<i>Acremonium</i> sp.	Jayus <i>et al.</i> (2001)
	<i>Verticillium fungicola</i>	Amey <i>et al.</i> (2003)
β -glucosidasas (EC 3.2.1.21)	<i>Sclerotium glucanicum</i>	Rapp (1989)
	<i>Acremonium persicinum</i>	Pitson <i>et al.</i> (1997)
	<i>Trichoderma atroviride</i>	Donzelli <i>et al.</i> (2001)

A produção de β -1,3-glucanases por fungos que não produzem polisacarídeos é geralmente estimulada pela presença de paredes celulares purificadas de outros microrganismos. Noronha e colaboradores (2000) verificaram um aumento significativo destas enzimas pelo *Trichoderma barzianum* quando utilizaram paredes celulares fúngicas purificadas de *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfii* como única fonte de carbono, o que também foi verificado por Bara e colaboradores (2003) para o fungo *Trichoderma asperellum*. Estes resultados sugerem que a regulação da expressão de β -1,3-glucanase nestes fungos pode ser influenciada pela quantidade de β -glucana presente no meio de cultivo, que atua como agente indutor.

O excesso de glucose ou outra fonte de carbono facilmente fermentável reprime a produção de β -glucanases em alguns microrganismos. Rapp (1989) observou que durante o crescimento do *Sclerotium glucanicum*, em excesso de glucose ou xilose, a atividade de β -glucanase não foi detectada. A presença de glucose no meio de cultivo também reprimiu a produção de β -glucanases em *Acremonium persicinum* (Pitson *et al.*, 1991) e em *Trichoderma barzianum* (Noronha *et al.*, 2000). A síntese de β -glucanases nestes microrganismos é regulada por repressão catabólica, sendo que esta forma de controle tem sido observada em outros fungos, incluindo *Neurospora crassa*, *Penicillium italicum*, *Sclerotium rolfii* e *Schizophyllum commune* (Rapp, 1989).

A desrepressão da formação de β -glucanases em *Sclerotium glucanicum* durante o crescimento em concentrações limitadas de glucose envolve extensiva autólise dos micélios fúngicos

e a degradação da β -glucana produzida (Rapp, 1992). Durante a desrepressão, os oligômeros gerados da parede celular, durante a autólise, aumentam a atividade das β -glucanases, devido a seu curto tempo de permanência no meio de cultivo (White *et al.*, 2002).

A regulação exercida pela glucose envolve a repressão da expressão dos genes que codificam estas enzimas. Uma vez consumida a fonte de carbono, ocorre a desrepressão, resultando na síntese das β -1,3-glucanases (Noronha *et al.*, 2000).

A regulação e a síntese das β -glucanases estão sujeitas a diferentes mecanismos de controle, sendo que estas diferenças podem ser explicadas pelo papel metabólico exercido de acordo com cada microrganismo. No fungo *Trichoderma viride*, a síntese de β -1,3-glucanase acompanha seu desenvolvimento celular (Del Rey *et al.*, 1979), enquanto que em *Neurospora crassa* e *Penicillium italicum* a produção destas enzimas ocorre paralelamente à redução do seu crescimento (Santos *et al.*, 1977).

A glucose não reprime a produção de β -glucanases pelo fungo filamentoso *Trichoderma viride* e as enzimas são produzidas durante o crescimento na presença deste monossacarídeo. Neste fungo, as β -glucanases podem estar envolvidas nos processos de formação da parede celular, já que a atividade específica destas enzimas aumenta durante o crescimento exponencial deste microrganismo (Del Rey *et al.*, 1979). A glucose também não exerce repressão na produção de β -1,3-glucanases por leveduras, podendo atuar até como agente indutor em alguns casos (Saligkarias *et al.*, 2002).

Estudos sobre a regulação da síntese de β -1,3-glucanases pela fonte

de nitrogênio também têm sido realizados (Pitson *et al.*, 1996). O conhecimento dos mecanismos controladores da atividade destas polissacaridases é fundamental para se exercer o controle sobre a autólise dos fungos filamentosos, seja para indução, nos casos de controle biológico, como na prevenção, para aumentar a produção de metabólitos de interesse em bioprocessos (White *et al.*, 2002).

Beta glucanases: propriedades, atividade e inibição

Laminarina e pustulana são geralmente usadas como substratos nos ensaios enzimáticos utilizados na determinação das atividades de β -1,3 e β -1,6-glucanases, respectivamente (Rapp, 1989). Os parâmetros cinéticos destas polissacaridases variam de acordo com o microrganismo estudado.

A atividade das β -glucanases pode ser inibida pela presença de compostos como clorofórmio, benzenóides, organofosfatos, quelantes, entre outros, podendo ocorrer inibição devido a concentrações elevadas de substrato e também dos produtos reacionais (Rana *et al.*, 2003). Certos cátions e ânions assim como compostos quelantes e detergentes também podem inibir as β -glucanases em diferentes níveis. A Tabela 2 mostra o efeito de diferentes metais e compostos inibidores de β -glucanases fúngicas.

Notario e colaboradores (1976) verificaram que as β -glucanases são proteínas ácidas, carregadas negativamente. A composição em aminoácidos revelou alta porcentagem em aminoácidos ácidos além de glicina e alanina em grandes proporções.

Tabela 2. Efeito de diferentes metais e compostos sobre a atividade de β -glucanases fúngicas.

Ação	Compostos	Microrganismo	Referências
Alta Inibição	Cu^{2+} , NH_4^+ , EDTA, Hg^{2+} , P_b^+ , SDS	<i>T. barzianum</i> <i>S. glucanicum</i> <i>A. niger</i>	Dubordieu <i>et al.</i> (1985) Singh <i>et al.</i> (1990) Rapp (1992) Noronha & Ulhoa (2000) Rana <i>et al.</i> (2003)
Inibição Moderada	Mn^{2+} , Fe^{2+} , Na^+	<i>T. barzianum</i> <i>A. niger</i>	Singh <i>et al.</i> (1990) Rana <i>et al.</i> (2003)
Não Inibitória	CN^- , PO_4^{3-} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}	<i>T. barzianum</i> <i>A. niger</i>	Dubordieu <i>et al.</i> (1985) Singh <i>et al.</i> (1990) Noronha & Ulhoa (2000)

Através da purificação das β -1,3-glucanases fúngicas, foi verificado que os microrganismos não produzem uma proteína específica, e, sim, um conjunto de proteínas com diferentes massas moleculares, pH e temperatura ótimos, porém, com a mesma especificidade, ou seja, estes fungos produzem β -1,3-glucanases diversas.

Os possíveis motivos da existência desta multiplicidade enzimática inclui a expressão de genes diferentes e as possíveis modificações pós-traducional (Jayus *et al.*, 2001).

O *Trichoderma barzianum*, por exemplo, é descrito na literatura como produtor de um complexo enzimático que contém pelo menos sete β -1,3-glucanases induzidas (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998). Noronha e Ulhoa (2000) purificaram uma β -1,3-glucanase de 29kDa produzida por *Trichoderma barzianum*; compararam os parâmetros cinéticos e de inibição enzimática desta hidrolase com outras previamente purificadas e concluíram que cada enzima produzida por este microrganismo é diferente, e provavelmente, seja codificada por genes diferentes. Bara e colaboradores (2003) também purificaram as β -1,3-glucanases produzidas por *Trichoderma asperellum* e verificaram que este microrganismo é produtor de duas proteínas com esta atividade.

Jayus e colaboradores (2001) purificaram uma β -1,6-glucanase produzida por *Acremonium* sp.; verificaram que o peso molecular,

o pH e temperatura ótimos, eram similares a outras β -1,6-glucanases microbianas estudadas, como as de *Trichoderma barzianum* e *Acremonium persicinum*.

Aplicações biotecnológicas das polissacaridases

As aplicações biotecnológicas dos polissacarídeos são limitadas, devido aos problemas relacionados com as modificações físicas, químicas e enzimáticas, que são necessárias para o desenvolvimento de novos produtos (Ramesh & Tharanathan, 2003).

Técnicas de fermentação e biotecnologia têm sido desenvolvidas com o objetivo de sintetizar e modificar carboidratos, sendo baseadas essencialmente no uso de polissacarídeos. No entanto, há dificuldades em tornar alguns processos economicamente viáveis e também de se obter enzimas específicas para a conversão de determinados substratos (Vandamme & Soetaert, 1995).

A Tabela 3 apresenta algumas das aplicações biotecnológicas das β -glucanases de origem fúngica.

O uso de enzimas pode representar uma via alternativa, devido à sua alta especificidade, na identificação química das β -glucanas fúngicas (Sutherland, 1984).

As β -1,3-glucanases são específicas para substratos contendo seqüências lineares de três ou mais unidades de glucose unidas através por liga-

ções glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) contendo uma extremidade terminal não-redutora. No entanto, um grau de substituição moderado de resíduos de glucose pode ser tolerado, e as β -1,3-glucanases podem atuar sobre β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-glucanas, por exemplo (Manners *et al.*, 1976). Rapp (1992) analisou os produtos de hidrólise de laminarina e escleroglucana, utilizando a enzima parcialmente purificada produzida por *Sclerotium glaucum*. Sob as condições da análise, a glucose foi o único produto resultante da hidrólise da laminarina, enquanto que glucose e gentiobiose foram os produtos formados na hidrólise da escleroglucana.

Kéry e colaboradores (1991) utilizaram uma preparação enzimática contendo β -1,3-glucanases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*, para degradar uma glucana insolúvel de levedura, em fragmentos menores e solúveis em água. A hidrólise da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada no pH ótimo de ação da β -1,3-glucanase utilizada. Os fragmentos obtidos foram separados por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50, sendo que mudanças no peso molecular dos fragmentos de glucana foram observadas de acordo com o tempo de hidrólise.

As β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanas têm sido investigadas por apresentarem uma variedade de respostas biológicas de defesa. Estas moléculas de cadeia linear e elevada massa molecu-

Tabela 3. Aplicações biotecnológicas das β -glucanases de origem fúngica.

Aplicação	Origem	Referências
Controle Biológico	<i>T. barzianum</i>	Benhamou & Chet (1997)
	<i>T. atroviride</i>	Vásquez-Garcidueñas <i>et al.</i> (1998), Donzelli <i>et al.</i> (2001)
	<i>T. asperellum</i>	Bara <i>et al.</i> (2003)
	<i>Verticillium fungicola</i>	Amey <i>et al.</i> (2003)
Dieta Animal	<i>T. longibrachiatum</i>	Bedford (1995), Yin <i>et al.</i> (2001)
	<i>T. reesei</i>	Coenem <i>et al.</i> (1995)
	Complexo Enzimático (Kyowa Hakko Co.)	Li <i>et al.</i> (1996)
	Complexo Enzimático (α -amilase, β -glucanase, xilanase)	Medel <i>et al.</i> (2002)
Obtenção de Protoplastos	β -glucanase (BDH), Novozym 234 (Novo)	Hamlym <i>et al.</i> (1981)
	<i>T. barzianum</i>	Muralidhar <i>et al.</i> (2003)
Extrato de levedura	β -1,3-glucanases fúngicas	Zverlov <i>et al.</i> (1997)
Melhoramento do vinho	<i>T. barzianum</i>	Elving & Pedersen (2003)

lar são insolúveis em soluções aquosas neutras, enquanto seus oligômeros de baixo peso molecular são altamente solúveis (Ramesh & Tharanathan, 2003). A solubilidade exerce influência significativa na eficiência da ligação do polissacarídeo com o receptor, afetando o seu efeito imunológico (Tokunaka *et al.*, 2002). Muitas β -glucanas fúngicas possuem ação imunomoduladora quando administradas de maneira intravenosa ou intraperitoneal. A utilização de β -glucanas insolúveis pode resultar na formação de granulomas, inflamações e dor, quando administradas através da via parental (Sandula *et al.* 1999).

Segundo Colleoni-Sirghie e colaboradores (2003) propriedades físicas das β -glucanas, como a viscosidade e a solubilidade, dependem não somente do grau de polimerização, como também das pequenas diferenças estruturais de cada polissacarídeo. A substituição de resíduos β -(1 $\rightarrow$ 6)-glicosídicos na cadeia polissacarídica favorece a solubilização de β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanas em soluções aquosas. Estudos por RMN e difração de raio-x têm demonstrado que estas substituições conferem às β -glucanas uma conformação em tripla hélice (Ramesh & Tharanathan, 2003).

A aplicação terapêutica dos exopolissacarídeos também depende da conformação espacial e das propriedades reológicas específicas de cada macromolécula. A lentinana, uma β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana produzida por *Lentinus edodes*, aumenta a resistência do organismo contra infecções por parasitas e sua forma sulfatada está sendo estudada por exibir potente ação anti-HIV. A laminarina, produzida pela alga *Laminaria digitata*, também é uma β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana, porém, não exibe atividade biológica significativa (Ramesh & Tharanathan, 2003).

O mecanismo de ação das β -glucanas ainda não é conhecido, mas acredita-se que seja dependente da massa molecular do exopolissacarídeo, dos tipos de ligações glicosídicas e resíduos presentes, além da sua conformação espacial (Freimunda *et al.*, 2003). A atividade antitumoral tem sido atribuída à capacidade de

formação de gel de algumas glucanas, sendo que derivados sulfatados de alguns polissacarídeos possuem aplicação oftalmológica (Ramesh & Tharanathan, 2003).

Estudos sobre sua estrutura e conformação utilizando β -glucanases podem auxiliar no entendimento sobre o seu modo de atuação (Pitson *et al.*, 1993) e também na obtenção de oligossacarídeos que apresentem maior atividade biológica (Miyanishi *et al.*, 2003), visto que algumas glucanas fúngicas apresentam baixa atividade biológica devido à sua baixa solubilidade (Sutherland, 1998).

O basidiomiceto *Schizophyllum commune* é produtor de uma β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-glucana extracelular que, especialmente na forma degradada, pode ser aplicada como agente antitumoral, anti-hepatite, anti-HIV e antiviral (Münzberg *et al.*, 1995).

Diferentes métodos, como hidrólise ácida e alcalina, digestão enzimática e irradiação de ultra-som, têm sido aplicados na despolimerização de biopolímeros, resultando em fragmentos de menor massa molecular (Sandula *et al.*, 1999). Alterações estruturais envolvendo oxidação química das cadeias com periodato e redução com borodreto podem aumentar a atividade imunomoduladora e antitumoral de algumas glucanas por proporcionarem o aumento da solubilidade das mesmas (Sutherland, 1998).

Os carboidratos são usualmente classificados de acordo com o grau de polimerização em açúcares, oligossacarídeos e polissacarídeos. Do ponto de vista fisiológico, a classificação é feita de acordo com a digestibilidade no intestino delgado, sendo que os carboidratos que apresentam menor digestão pelo organismo são divididos em amido resistente, polissacarídeos diferentes de amido e oligossacarídeos não fermentáveis (Voragen, 1998).

Alguns oligossacarídeos não fermentescíveis são denominados de pré-bióticos e podem ser definidos como substâncias não digeríveis que afetam benéficamente o organismo, estimulando seletivamente o crescimento de um número limitado de bactérias do trato intestinal, benefi-

cando a saúde. Estas substâncias, incluindo oligofrutoses, polióis e alguns oligossacarídeos, são fontes de energia para a microflora benéfica do organismo (Przemyslaw & Piotr, 2003).

Estudos têm sido realizados sobre a ação destes compostos na prevenção de infecções intestinais e câncer de cólon, na resposta imunológica e na redução dos níveis de colesterol no soro (Holzapfel & Schillinger, 2002).

Frutooligosacarídeos retardam a homeostase das células da parede intestinal, enquanto oligossacarídeos constituídos por manose podem impedir a adesão de *E. coli* nas paredes do intestino (Przemyslaw & Piotr, 2003).

As inúmeras aplicações dos oligossacarídeos na agroindústria, na cosmetologia e na indústria alimentícia, e, particularmente, suas aplicações na área de saúde, tornam necessário o desenvolvimento de métodos eficientes para a produção destas moléculas em escala industrial (Monsan & Paul, 1995).

Com o advento da glicotecnologia, novas aplicações dos oligossacarídeos têm sido desenvolvidas nas áreas de alimentos, rações animais, fármacos, cosméticos e também como agentes imunomoduladores e pré-bióticos, que requerem a síntese específica de oligossacarídeos através de processos técnica e economicamente viáveis (Remaud-Simeon *et al.*, 2000).

Estudos investigativos sobre a ação catalítica de algumas glicosidases na condensação de monossacarídeos em oligossacarídeos e na transferência de resíduos glicosídicos têm sido relatados (Pitson *et al.*, 1993). Os oligossacarídeos podem ser obtidos através de síntese enzimática por reações de polimerização, policondensação e alongamento da cadeia; através da ação de glicosidases, glicosiltransferases, fosforilases e glicosintases artificiais. O maior problema deste tipo de síntese é a disponibilidade limitada de enzimas específicas (Kobayashi *et al.*, 2001). A incubação de β -glucanases com altas concentrações de glucose podem resultar na produção de trealose, gentiobiose, isomaltose, celobiose e laminaribiose. Heterooligosacarídeos

podem ser obtidos pela incubação de glucose com outros aceptores glucosídicos (Pitson *et al.*, 1993).

Ning e colaboradores (2003) propuseram que a atividade biológica da lentinana, uma β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana produzida por *Lentinus edodes*, depende de sua estrutura em oligossacarídeos. Estudos anteriores relataram que somente frações de alta massa molecular (>16kDa) obtidos através de hidrólise parcial com ácido fórmico, apresentaram atividade antitumoral (Sasaki *appud* Ning *et al.*, 2003). Oligossacarídeos com ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) e β -(1 $\rightarrow$ 6) foram sintetizados a partir de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranose comoceptor glucosídico inicial, sendo que alguns oligossacarídeos sintetizados inibiram tumores em ratos, efetivamente. Sharp e colaboradores (*appud* Ning *et al.*, 2003) relataram que hexa- e heptassacarídeos derivados de β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-glucanas apresentaram maior atividade biológica do que o próprio exopolissacarídeo.

A conversão enzimática dos polissacarídeos em seus respectivos monômeros e/ou oligômeros pode ser realizada pelo uso de hidrolases e transferases de origem microbiana. Enzimas como xilanases, inulinases, alginases, levanases e glucanases hidrolisam seus respectivos polímeros de maneira específica (Vandamme & Soetaert, 1995).

Myanishi e colaboradores (2003) compararam o efeito de polímeros de β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana de *Laminaria digitata* e de seus oligômeros obtidos pela ação de β -1,3-glucanases de *Bacillus clausii* NM-1, em mielomas humanos. Os resultados sugeriram que a atividade citotóxica detectada foi derivada dos monócitos estimulados pelos oligossacarídeos, uma vez que a despolimerização enzimática parece ter sido essencial para a estimulação dos monócitos pela β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana.

De acordo com esta revisão da literatura, foi possível constatar que este campo da biotecnologia tem futuro promissor, considerando que o desenvolvimento das pesquisas sobre as polissacaridases irão vencer as barreiras determinadas pela insolubilidade dos polímeros que apresen-

tam atividade biológica, gerando moléculas de pequena massa molecular, solúveis, mas que preservam esta atividade.

Portanto, além dos estudos para compreender a atividade das glucanases, que são de extrema importância em todos os estágios do ciclo da vida fúngica, novos conhecimentos sobre a produção, síntese e regulação, por via fermentativa dos microrganismos produtores, são também de interesse biotecnológico, visto que estes poderão gerar novas tecnologias para a obtenção de fármacos, alimentos nutracêuticos e produtos que favoreçam o bem-estar da população.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo auxílio financeiro ao Programa de Mestrado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica-CCE, da Universidade Estadual de Londrina. Ellen Cristine Giese também agradece ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

Referências Bibliográficas

AMEY, R. C.; MILLS, P. R.; BAILEY, A.; FOSTER, G. D. Investigating the role of a β -1,6-glucanase *Verticillium fungicola* during infection of *Agaricus bisporus* using targeted gene disruption. **Fungal Genetics and Biology**, v.39, p.264-275, 2003.

BARA, M. T. F.; LIMA, A. L.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.219, p.81-85, 2003.

BEDFORD, M. R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, v.53, p.145-155, 1995.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.5, p.2095-2099, 1997.

BRAND, T.; WOHANKA, W.; ALSANIUS, B. W. Enzyme activity assays for nutrient solutions from closed irrigation systems. **Scientia Horticulturae**, v.92, p.329-338, 2002.

CAMPBELL, B. S.; MCDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Why do exopolysaccharide yields from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation? **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.104-112, 2003.

COENEN, T. M. M.; SCHOENMAKERS, A. C. M.; VERHAGEN, H. Safety evaluation of β -glucanase derived from *Trichoderma reesei*: Summary of toxicological data. **Food Chemistry**, v.95, p.859-866, 1995.

COLLEONI-SIRGHIE, M.; FULTON, D. B.; WHITE, P. J. Structural features of water soluble (1,3) (1,4)- β -D-glucans from high- β -glucan and traditional oat lines. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p.237-249, 2003.

DE LA CRUZ, J.; REY, M.; LORA, J. M.; HIDALGO-GALLEGO, A.; DOMÍNGUEZ, F.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A.; BENÍTEZ, T. Carbon source control on β -glucanases, chitinase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Archives of Microbiology**, v.159, p.316-322, 1993.

DEL REY, F.; GARCÍA-ACHA, I.; NOMBELA, C. The regulation of β -glucanase synthesis in fungi and yeast. **Journal of General Microbiology**, v.110, p.83-89, 1979.

DONZELLI, B. G. G.; LORITO, M.; SCALA, F.; HARMAN, G. E. Cloning, sequence and structure of a gene encoding an antifungal glucan 1,3- β -glucosidase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*). **Gene**, v.277, p.199-208, 2001.

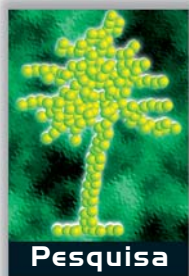
DUBOURDIEU, D.; DESPLANQUES, C.; VILLETIAZ, J.; RIBEREAU-GAYON, P. Investigations of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Carbohydrate Research**, v.144, p.277-287, 1985.

ELVIG, S. G.; PEDERSEN, P. B. Safety

- evaluation of a glucanase preparation intended for use in food including a subchronic study in rats and mutagenicity studies. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v.37, p.11-19, 2003.
- FREIMUNDA, S.; SAUTERA, M.; KAPPELIB, O.; DUTLERA, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p.159-171, 2003.
- HAMLYN, P. F.; BRADSHAW, R. E.; MELLON, F. M.; SANTIAGO, C. M.; WILSON, J. M.; PEBERDY, J. F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.3, p.321-325, 1981.
- HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v.35, p.109-116, 2002.
- JAYUS; MCDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Purification and properties of (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucanase from *Acremonium* sp. IMI 383068. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.194-200, 2001.
- JAYUS; MCDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Factors affecting the synthesis of (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucanases by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068 grown in batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.289-299, 2002.
- KÉRY, V.; KOGAN, G.; ZAJACOVÁ, K.; MASLER, L.; ALFÖLDI, J. Hydrolysis of yeast cell-wall glucan by extracellular (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucanases from *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.87-90, 1991.
- KIRK, O.; BORCHET, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v.13, p.345-351, 2002.
- KOBAYASHI, S.; SAKAMOTO, J.; KIMURA, S. *In vitro* synthesis of cellulose and related polysaccharides. **Progress in Polymers Science**, v.26, p.1525-1560, 2001.
- LI, S.; SAUER, W. C.; MOSENTHIN, R.; KERR, B. Effect of β -glucanase supplementation of cereal-based diets for starter pigs on the apparent digestibilities of dry matter, crude protein and energy. **Animal Feed Science and Technology**, v.59, p.223-231, 1996.
- LUPETTI, A.; NIBBERING, P. H.; CAMPA, M.; TACCA, M. D.; DANESI, R. Molecular targeted treatments for fungal infections: the role of drug combinations. **TRENDS Molecular Medicine**, v.9, n.6, p.269-276, 2003.
- MANNERS, D. J.; STARK, J. R.; WILSON, G.; BRODIE, J. Y. Some properties of a fungal β -D-glucanase preparation. **Carbohydrate Research**, v.49, p.383-388, 1976.
- MARGARITIS, A.; PACE, G. W. Microbial Polysaccharides. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology: The principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Pergamon Press, 1985. v.3, p.1005-1044.
- MCLEOD, A.; SMART, C. D.; FRY, W. E. Characterization of 1,3- α -glucanase and 1,3;1,4- β -glucanase genes from *Phytophthora infestans*. **Fungal Genetics and Biology**, v.38, p.250-263, 2003.
- MEDEL, P.; BAUCCELLS, F.; GRACIA, M. I.; BLAS, C.; MATEOS, G. G. Processing of barley and enzyme supplementation in diets for young pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.95, p.113-122, 2002.
- MIYANISHI, N.; IWAMOTO, Y.; WATANABE, E.; ODA, T. Induction of TNG- α production from human peripheral blood monocytes with β -1,3-glucan oligomer prepared from laminarin with β -1,3-glucanase from *Bacillus clausii* NM-1. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v.95, n.2, p.192-195, 2003.
- MONSAN, P.; PAUL, F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology Reviews**, v.16, p.187-192, 1995.
- MÜNZBERG, J.; RAU, U.; WAGNER, F. Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched β -1,3-glucan. **Carbohydrate Polymers**, v.27, p.271-276, 1995.
- MURALIDHAR, R.; GUMMADI, S. N.; DASU, V. V.; PANDA, T. Statistical analysis on some critical parameters affecting the formation of protoplasts from the mycelium of *Penicillium griseofulvum*. **Biochemistry Engineering Journal**, in press, 2003.
- NING, J.; ZHANG, W.; YI, Y.; YANG, G.; WU, Z.; YI, J.; KONG, F. Synthesis of β -(1 $\rightarrow$ 6)-branched β -(1 $\rightarrow$ 3) glucohexaose and its analogue containing an α -(1 $\rightarrow$ 3) linked bond with antitumor activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p.2193-2203, 2003.
- NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.183, p.119-123, 2000.
- NORONHA, E. F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; ULHOA, C. J. Regulation of 36-kDa β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.188, p.19-22, 2000.
- NOTARIO, V.; VILLA, T. G.; VILLANUEVA, J. R. Purification of na exo- β -D-glucanase from cell-free extracts of *Candida utilis*. **Biochemistry Journal**, v.159, p.555-562, 1976.
- PITSON, S.; SEVIOUR, R. J.; BOTT, J.; STASINOPOULOS, S. J. Production and regulation of β -glucanases in *Acremonium* and *Cephalosporium* species. **Mycology Research**, v.95, n.3, p.352-356, 1991.
- PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDOUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal β -glucanases: Their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p.178-192, 1993.
- PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDOUGALL, B. M. Proteolytic inactivation of an extracellular (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucanase from the fungus *Acremonium persicinum* is associated with growth at

- neutral or alkaline medium pH. **FEMS Microbiology Letters**, v.145, p.287-293, 1996.
- PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDUGALL, B. M. Purification and characterization of an extracellular α -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role β -glucan degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.182-190, 1997.
- PRZEMYSŁAW, J. T.; PIOTR, T. Probiotics and Prebiotics. **Cereal Chemistry**, n.80, v.2, p.113-117, 2003.
- RAMESH, H. P.; THARANATHAN, R. N. Carbohydrates – The renewable raw materials of high biotechnological value. **Critical Review Biotechnology**, v.23, p.149-173, 2003.
- RANA, D. S.; THÉODORE, K.; NAIDU, S. N.; PANDA, T. Stability and kinetics of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, in press, 2003.
- RAPP, P. 1,3- β -glucanase, 1,6- β -glucanase and β -glucosidase activities of *Sclerotium glaucum*: Synthesis and Properties. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.2847-2858, 1989.
- RAPP, P. Formation, separation and characterization of three β -1,3-glucanases from *Sclerotium glaucum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1117, p.7-14, 1992.
- REESE, E. T.; MANDELS, M. α -D-1,3 glucanases in fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.159-185, 1959.
- REESE, E. T.; PARRISH, F. W.; MANDELS, M. β -D-1,6 glucanases in fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.8, p.327-334, 1962.
- REMAUD-SIMEON, M.; WILLEMONT, R. M.; SARÇABAL, P.; MONTALK, G. P.; MONSAN, P. Glucanases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.10, p.117-128, 2000.
- SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTON, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182:II. A study on mode of action. **Biological Control**, v.25, p.151-161, 2002.
- SANDULA, J.; KOGAN, G.; KACURÁKOVÁ, M.; MACHOVÁ, E. Microbial (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v.38, p.247-253, 1999.
- SANTOS, T.; VILLANUEVA, R.; NOMBELA, N. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* β -glucanases. **Journal of Bacteriology**, v.129, n.1, p.52-58, 1977.
- SANTOS, T.; SANCHEZ, M.; VILLANUEVA, R.; NOMBELA, N. Derepression of β -1,3-glucanases in *Penicillium italicum*: Localisation of the various enzymes and correlation with cell wall mobilization an autolysis. **Journal of Bacteriology**, v.137, p.6-12, 1979.
- SINGH, A.; AGRAWAL, A. K.; ABIDI, A. B.; DARMWAL, N. S. Properties of exoglucanase from *Aspergillus niger*. **Journal of Genetic Applied Microbiology**, v.36, p.245-253, 1990.
- STONE, B. A. Complexity of β -glucanases from *Aspergillus niger*. In: Meeting of the Biochemical Society, 360, 1957, London. **Proceedings of the Biochemical Society**, 1957.
- SUTHERLAND, I. W. Enzymes in the assay of microbial polysaccharides. **Process Biochemistry**, p.19-24, 1984.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**, v.16, p.41-47, 1998.
- SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.38, p.319-328, 1999.
- TOKUNAKA, K.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; MIURA, N. N.; YADOMAE, T. Application of *Candida* solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. **International Immunopharmacology**, v.2, p.59-67, 2002.
- VANDAMME, E. J.; SOETAERT, W. Biotechnical modification of carbohydrates. **FEMS Microbiology Reviews**, v.16, p.163-186, 1995.
- VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, S.; LEAL-MORALES, C. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.98, p.1442-1446, 1998.
- VILLA, T. G.; NOTARIO, V.; VILLANUEVA, J. R. β -glucanases of the yeast *Pichia polymorpha*. **Archives of Microbiology**, v.104, p.201-206, 1975.
- VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends Food Science & Technology**, v.9, p.328-335, 1998.
- WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual Reviews in Microbiology**, v.50, p.183-212, 1996.
- WHITE, S.; MCINTYRE, M.; BERRY, D. R.; MCNEIL, B. The autolysis of industrial filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.1, p.1-14, 2002.
- YIN, Y.-L.; BAIDOO, S. K.; SCHULZE, H.; SIMMINS, P. H. Effects of supplementing diets containing hulls barley varieties having different levels of non-starch polysaccharides with β -glucanase and xylanase on the physiological status of the gastrointestinal tract and nutrient digestibility of weaned pigs. **Livestock Production Science**, v.71, p.97-107, 2001.
- ZVERLOV, V. V.; VOLKOV, I. Y.; VELIKODVORSKAYA, T. V.; SCHWARZ, W. H. Highly thermostable endo-1,3- β -glucanase (laminarinase) LamA from *Thermotoga neapolitana*: nucleotide sequence of the gene and characterization of the recombinant gene product. **Microbiology**, v.143, p.1701-1708, 1997.





Biossegurança em Biotérios

Alergia: um risco sempre presente

Joel Majerowicz

Médico Veterinário; Chefe do Laboratório de Experimentação Animal do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz; Vice-Presidente do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal / Cobeia.

joel@bio.fiocruz.br

Ilustrações cedidas pelo autor

As respostas alérgicas vão desde espirros até anafilaxia sistêmica e morte. Aproximadamente 33% das pessoas que desenvolvem alguma atividade em biotérios apresentam reações de hipersensibilidade e isto constitui um sério problema de saúde ocupacional (Chan-Yeung & Malo, 1994). Esse percentual é três vezes maior que em qualquer outra atividade.

Descamação da pele, pêlo, saliva, soro, urina e tecidos animais são as principais fontes produtoras de alérgenos. O contato ocorre durante as atividades de alimentação, limpeza de ambientes e de materiais, inoculação, sacrifício, cirurgia, coleta de tecidos e fluídos corpóreos e no transporte de animais (Harries & Cromwell, 1982). Roedores possuem proteinúria persistente e a urina é a maior fonte de produção de alérgenos das espécies desta *Ordem*.

Os alérgenos são proteínas específicas e, em sua maioria, já estão identificadas e caracterizadas.

No camundongo (*Mus musculus*) foram identificados três alérgenos relevantes:

- Mus m1, uma pré-albumina encontrada na urina, folículos pilosos e descamação da pele. Essa proteína é produzida nas células do fígado e sua concentração no sangue e na urina é em torno de quatro vezes maior nos machos que nas fêmeas, devido ao gene responsável pela

sua produção ser testosterona dependente.

- Mus m2, uma glicoproteína originada nos folículos pilosos e na descamação da pele, porém não encontrada na urina.
- Mus m3, uma albumina que tem sido demonstrada em 30% dos pacientes alérgicos a camundongo.

No rato (*Rattus norvegicus*), dois alérgenos foram identificados na urina, saliva e pele:

- Rat n 1A, uma pré-albumina produzida no fígado;
- Rat n 1B, uma globulina também produzida no fígado.

Alérgenos da cobaia (*Cavia porcellus*) não estão bem caracterizados, embora tenham sido identificados dois fragmentos antigênicos Cav p 1 e Cav p 2. Ambos são encontrados na urina, no pêlo e na descamação da pele. No coelho (*Oryctolagus cuniculus*), dois alérgenos estão bem identificados, Ory c 1 é encontrado no pêlo, na descamação da pele e na saliva; e o Ory c 2, que é encontrado no pêlo, na descamação da pele e na urina (Bush *et al.*, 1998).

Em geral, os alérgenos são carregados por pequenas partículas, que podem permanecer em suspensão no ar por extensos períodos e serem facilmente respiráveis. A inalação é o meio mais comum de

sensibilização. O contato com membranas, mucosas e pele também são vias de sensibilização, porém menos comuns. Após um período de tempo, que pode ser de meses a anos, ou quando se inalam quantidades suficientes de alérgeno, desenvolve-se a sensibilização do organismo. Quando exposto novamente a um alérgeno específico, os sintomas da alergia aparecem (Bardana, 1992). Os sintomas variam de brandos, como coriza e espirro (rinite alérgica); irritação ocular e lacrimejamento (conjuntivite alérgica); vermelhidão, prurido e erupção na pele (dermatite de contato); congestão nasal; resfriado prolongado e repetitivo, a graves, que caracterizam a asma alérgica, cujos sintomas podem ser distinguidos por dificuldade respiratória, tosse e estertores pulmonares. Os sintomas, muitas vezes, aparecem rapidamente após a exposição ao alérgeno, mas, normalmente, ocorrem de duas a oito horas após essa exposição.

Todas as pessoas que manuseiam animais estão propensas a desenvolverem sintomas alérgicos, porém aquelas que já demonstravam sinais ou sintomas alérgicos, antes de atividades com animais, estão mais propensas a desenvolverem alergias ou mesmo a asma. Pessoas que desenvolvem sintomas de asma, proveniente de alérgeno animal, frequentemente melhoram ou se recuperam completamente se param de se expor ao contaminante.

Os fatores de risco estão relacionados com a susceptibilidade individual e à exposição aos alérgenos no ambiente de trabalho. A susceptibilidade é basicamente genética. A exposição aos alérgenos no ambiente de trabalho está diretamente relacionada com o tipo de atividade desenvolvida e com o tempo de contato direto com o animal ou com seus subprodutos. Não só as pessoas diretamente envolvidas com os animais estão propensas a esse risco. Secretárias e pessoal da administração, que trabalham em ambientes no mesmo prédio do biotério, estão sujeitos ao contato com alérgenos carregados por diversos meios.

A prevenção se baseia em evitar o contato com os alérgenos, uma vez que eles são constantemente produzidos pelos animais e estão sempre presentes no ambiente de trabalho.

No entanto, já estão definidos e disponíveis, procedimentos e equipamentos que podem reduzir, ou mesmo eliminar, a exposição ao risco de sensibilização. São eles:

Uso de roupa apropriada e de uso exclusivo no biotério, as quais não devem ser utilizadas fora dessas instalações, com vistas a não carrear alérgenos para outras áreas. Não devem ser lavadas em casa para evitar a exposição dos familiares a esse risco. O ideal é que sejam higienizadas por firmas especializadas, as quais possuem métodos apropriados para manuseio e higienização de uniformes.

A superfície do corpo deve ser protegida para que se evite o contato de alérgenos com a pele; recomenda-se, portanto, além do uniforme, o uso de luvas, máscara e gorro sempre que houver manipulação de animais ou de seus subprodutos.



Vestimenta
Bio-Manguinhos / Fiocruz

Manter sempre limpo ambientes, móveis e gaiolas de animais: O pó da ração e da forração das gaiolas são veículos transportadores de alérgenos. Manter o ambiente limpo é diminuir a concentração de alérgenos, minimizando, conseqüentemente, o risco. Durante a limpeza, devem ser tomados cuidados especiais para evitar a exposição aos alérgenos.



Higienização de ambiente
Bio-Manguinhos / Fiocruz

Na manipulação de animais e de seus derivados, fazer uso, sempre que possível, de cabines de contenção biológica ou de cabines de fluxo laminar. A cabine de contenção biológica garante a segurança do operador pela contenção de partículas e micro-organismos na área interna de trabalho e filtra o ar de exaustão através de filtros de alto desempenho, o mesmo acontecendo com modelos de cabine



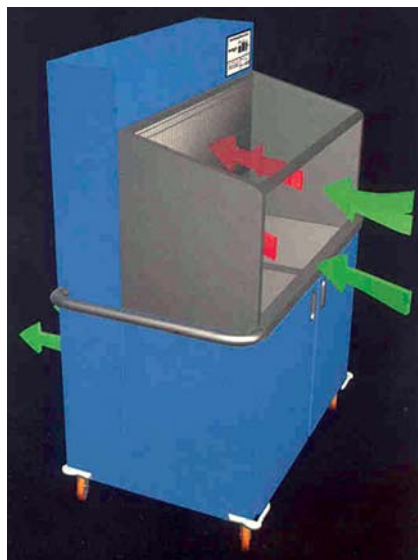
Manejo animal sob cabine de contenção
biológica - IPEN/CNEN/SP

de fluxo laminar. Esses equipamentos devem ser certificados a cada 12 meses se o propósito é somente a contenção de particulados.

Adequar, se necessário, o sistema de ventilação e exaustão mecânica. A exposição aos alérgenos em suspensão no ar é afetada pelo modelo de fluxo de ar, filtração, tipo de material usado na forração das gaiolas ("cama") e umidade relativa. O recomendado para se manter um nível aceitável de alérgenos no ambiente é de 15 a 20 trocas de ar (volume do ambiente por hora). A elevação da



Cabine para descarte de rejeitos
Bio-Manguinhos / Fiocruz



Microisolador Centro de Biologia
Molecular – IPEN/CNEN/SP



Estantes ventiladas
Bio-Manguinhos/Fiocruz



Microisoladores dentro de Estantes
Ventiladas - IPEN/CNEN/SP

umidade relativa diminui o nível de alérgenos em suspensão no ar, porém, para a adoção dessa medida, deve-se considerar que a faixa de umidade relativa recomendada para roedores é de 55% +/- 5%. O sistema de ventilação e exaustão das áreas de animais deve ser independente de outras áreas do biotério.

O direcionamento do ar deve ser, sempre que possível, do operador para a gaiola de animais.

O uso de microisolador (gaiola com filtro), estante ventilada ou sistema de módulos para microisolador diminui substancialmente a presença de alérgenos no ambiente. O princípio sobre o qual se baseia o microisolador é muito similar à placa de Petri usada em bacteriologia. Métodos físicos e/ou químicos são utilizados para a esterilização da superfície interna da gaiola, as quais são manipuladas posteriormente em sistemas assépticos. Da mesma forma que o filtro impede a entrada de contaminantes na gaiola, também impede a saída, para o ambiente, de partículas que carregam alérgenos. A utilização de cabine de fluxo laminar ou de cabine de contenção biológica na manipulação dos microisoladores deve garantir que a contaminação não ocorra nesse momento, ou seja, esses equipamentos devem estar certificados e com seus instrumentos calibrados. A utilização de estante

ventilada com sistema de filtração de ar permite o uso de gaiolas abertas.

Existem vários modelos de estantes para alojamento de animais e algumas com portas. Esses equipamentos promovem um fluxo de ar filtrado nos compartimentos internos que renovam o ar do interior das gaiolas e possuem filtros de exaustão, garantindo a contenção dos alérgenos. Esse sistema não garante a contenção de partículas para o ambiente quando as portas são abertas. O uso de microisoladores em conjunto com estantes ventiladas permite um controle mais efetivo da contaminação do ambiente por alérgenos, bem como propiciam um microambiente mais favorável aos animais, uma vez que a ventilação forçada favorece a troca de ar, diminui a umidade relativa e os odores no interior da gaiola. Sistemas para microisoladores baseiam-se em injetar e exaurir o ar diretamente dos microisoladores e de forma individual. Dessa forma, o microambiente é individualizado, sendo que o sistema fechado garante a condição microbiológica interna da gaiola e não permite a exteriorização dos contaminantes no ambiente. Tanto as estantes ventiladas como o sistema para microisoladores se torna mais efetivos no controle de alérgenos quando o sistema de exaustão é direcionado para fora da edificação.

Outras práticas ou procedimentos que auxiliam no controle de alérgenos são:

- Diminuir a densidade animal (animal/m³).
- Fazer uso de material absorvente e não gerador de partículas na forração das gaiolas a fim de diminuir consideravelmente a concentração de alérgenos em suspensão no ar. O sabugo de milho é preferível à maravalha



Sistema de microisoladores (*Racks ventilados*)
IPEN/CNEN/SP

de madeira devido a sua maior capacidade de absorção e seu menor percentual de pó.

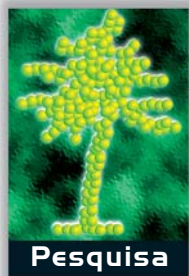
- Trabalhar, se possível, com espécies animais que produzam menos alérgenos, incluindo os de sexo que também produzam menos alérgenos.
- Providenciar e colocar à disposição todos os equipamentos de proteção individual. O uso de protetores respiratórios pode ser uma solução para certas situações, porém não substitui as recomendações anteriormente citadas.
- Treinar e educar todos os envolvidos com animais ou com derivados de animais, bem como com atividades correlacionadas para esse tipo de risco.
- Providenciar monitoramento de saúde de forma regular para todos e apropriado aconselhamento médico para os que desenvolvem

rem sintomas alérgicos. Essas duas ações auxiliam na redução de efeitos adversos à saúde.

Finalmente, há casos em que somente a mudança de atividade é a solução para o problema de saúde.

Referências Bibliográficas

- Bardana EJ Jr. 1992. *What characterizes allergic asthma?* Ann Allergy; 68(5):371-3.
- Bush, R K., Wood, R A. and Eggleston, P A. 1998. *Laboratory Animal Allergy*. J. Allergy Clin Immunol. 102, 99-108.
- Chan-Yeung M. Malo JL. 1995. *Occupational asthma*. N Engl J Med. 13;333(2):107- 12.
- Edwards, R G., Beeson, M F. and Dewdney, J M. 1983. *Laboratory Animal Allergy: The Measurement of Airborne Urinary Allergens and the effects of Different Environmental Conditions*. Laboratory Animals. 17, 235-239.
- Guest editorial. Laboratory Animal Allergy. Volume 58, april 1987. Preventing Asthma in Animal Handlers, DHHS (HIOSH), Publication nº 97 – 116, 1998.
- Harries MG., Cromwell 1982. O. *Occupational asthma caused by allergy to pigs' urine*. Br Med J (Clin Res Ed). 20;284(6319):867
- Olfert, E D., Cross B M., y McWilliam A A. Manual Sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación. Consejo Canadiense de Protección de los Animales, 1998; volume 1
- Reeb-Whitaker, C K., Harrison, D J., Jones R B., Kacergis, J B., Myers, D D. and Paigen B. 1999. *Control Strategies for Aeroallergens in an Animal Facility*. J. Allergy Clin Immunol. 139-146.



A Biotecnologia e a Extinção de Espécies

Crise da modernidade

João de Deus Medeiros, Dr

*Biólogo, Doutor em Botânica,
Professor do Depto. de Botânica,
Diretor do Centro de Ciências Biológicas da UFSC
jdeus@ccb.ufsc.br*

Ilustrações cedidas pelo autor

O fantasma da extinção de espécies biológicas torna-se cada vez mais presente e ameaçador. A drástica redução das florestas tropicais elevou as taxas estimadas de extinção de espécies biológicas a cifras significativamente altas. Ainda que esses números sejam imprecisos e mesmo considerando os processos naturais de extinção de espécies, aventa-se que o homem tenha elevado essa taxa de extinção para algo em torno de 100 a 1.000 vezes. Tomando-se por base uma taxa anual da ordem de uma espécie para cada milhão de espécies, valor médio para todos os grupos, cuja taxa de extinção esteja bem documentada pelo registro fóssil (WILSON, 1997; WILSON, 2002), SANDES e DI BLASI (2000), estimam-se que mil espécies sejam extintas por ano no planeta, o correspondente a 3 espécies por dia. Afirmam ainda que, se a destruição continuar no ritmo atual, até o ano 2015, de 4% e 8% de todas as espécies vivas presentes nas florestas tropicais podem desaparecer; algumas sem nem mesmo terem sido descritas, catalogadas ou estudadas.

Os danos acumulados pela onda crescente de extinção de espécies e de ecossistemas não podem ser reparados dentro de uma escala de tempo tangível. A paleontologia revela que novas faunas e floras levam milhões de anos para atingir a diversidade que possuíam na época em que o homem apareceu no planeta. Quanto mais permitirmos que as perdas se acumulem, maiores serão os prejuízos das futuras gerações, tanto os já conhecidos quanto daqueles que serão certamente descobertos mais tarde.

Portanto, não restam dúvidas quanto à gravidade do quadro imposto pelas interferências perpetradas pelo homem nos ambientes naturais. A hecatombe de extinções de espécies da fauna e da flora, fenômeno sem precedente histórico, atinge hoje entre 70.000 a 240.000 espécies. O impacto maior, sem dúvida, é sentido nas florestas tropicais, que, cobrindo cerca de 7% da superfície terrestre do planeta, abrigam, pelo menos, 50% de todas as espécies. Dados da FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, e o PNUMA – Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, já indicavam, no início da década de 80, que, a cada ano, entre 76.000 e 92.000 quilômetros quadrados de florestas tropicais eram destruídos. Outros 100.000 quilômetros quadrados grandemente perturbados. O mais inquietante é constatar que nas décadas seguintes essas médias continuaram aumentando.

As “Listas Vermelhas” da União Mundial para a Conservação da Natureza (IUCN), atualizadas ano a ano, mostram a progressividade do problema. A lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, editada em 1989, relacionava 218 espécies. A lista atual, concluída em 2002, revela que 627 espécies estão ameaçadas, 2 extintas na natureza e 9 definitivamente extintas. Na lista atual, encontramos 69 mamíferos, 153 aves, 20 répteis, 15 anfíbios, 165 peixes, 93 insetos, 21 invertebrados terrestres e 91 invertebrados aquáticos. Considerando a grandiosidade da biodiversidade brasileira e os escassos investimentos aplicados no

seu estudo, fica evidente que os números apresentados mostram apenas uma débil aproximação do problema. A lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçada de extinção, editada em 1992 (Portaria IBAMA 037-N), por sua vez, relaciona um total de 107 espécies. O grau de precisão dessas listas é freqüentemente questionado, o que ilustra mais uma vez a carência de conhecimento sobre a nossa biodiversidade. Por exemplo, no início da década de 90, período em que se editou a lista oficial da flora, foi relacionado um número superior a 1.000 espécies raras e/ou ameaçadas de extinção, somente no Estado de Santa Catarina (KLEIN, 1990).

O Brasil é considerado o país que apresenta a maior diversidade genética vegetal do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (SANDES e DI BLASI, 2000). É interessante salientar que, como em outras partes do planeta, no Brasil também, a expansão agrícola e a urbanização, com a consequente eliminação dos habitats, são as principais causas da elevação nas taxas de extinção das espécies.

Ainda que pareça paradoxal, uma das críticas que se fazem ao atual modelo de proteção das espécies da fauna ameaçada é a falta de uma política de regulamentação da caça amadora e esportiva. Os argumentos utilizados em defesa da tese de que a caça amadora possa ser uma estratégia de proteção às espécies ameaçadas de extinção baseiam-se no fato de os Estados Unidos da América manterem estável, há mais de duas décadas, o número de espécies de aves e mamíferos ameaçados, com o uso de um modelo de proteção baseado na caça amadora. Segundo seus defensores, esse modelo funciona porque a caça amadora exige grandes investimentos e somente se sustenta com abundância de caça durante décadas seguidas; ou seja, os investidores do setor passam a ser os principais interessados em que se mantenham populações viáveis, a fim de garantir o sucesso de seus empreendimentos.

O mesmo modelo é empregado na pesca esportiva, mesmo no Brasil, onde regiões como a do Médio Amazonas e a do Pantanal já vêm se destacando como pólos de atração de turistas provenientes das mais variadas partes do mundo. Não podemos esquecer, contudo, que essa estratégia normalmente direciona seus esforços apenas para a proteção de algumas poucas espécies, não contemplando uma abordagem ecossistêmica. Novamente o modelo norte-americano pode ser resgatado a título de exemplo. O próprio U.S. Fish and Wildlife Service, órgão do Departamento do Interior responsável pela proteção das espécies ameaçadas, já em 1995 concluía que menos de 10% das espécies legalmente protegidas estavam aumentando, 40% estavam diminuindo e as espécies restantes permaneciam na mesma ou sua situação era desconhecida.

É inquestionável que o problema da extinção crescente de espécies biológicas esteja ainda muito longe de uma solução adequada e satisfatória. É certo também que, considerando os danos já perpetrados, nunca teremos uma forma efetiva de remediação desse impasse criado pela espécie humana. Essa constatação, ainda que verdadeira, jamais deverá constituir um alibi para a acomodação e o descaso, notadamente dos responsáveis pela formulação e operação de políticas públicas setoriais.

O Brasil ainda é considerado um país ecologicamente vulnerável. No balanço de 2002, o país mostrou recordes nada invejáveis. Naquele ano registrou-se a maior apreensão de madeira de toda a história, na sua maior parte mogno (*Swietenia macrophylla*), uma das espécies madeiras mais visadas e ameaçadas. As queimadas também cresceram vertiginosamente naquele ano, algo em torno de 136%, considerando-se a média dos últimos cinco anos. Por causa dos desmatamentos e das queimadas na Amazônia, o Brasil está rapidamente se aproximando dos líderes na emissão dos gases de efeito estufa, como nos mostram os

dados revelados no Inventário Brasileiro de Emissões, elaborado pelo IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Na Mata Atlântica, um dos biomas mais ameaçados do planeta, as pressões não cessaram, mesmo depois de cinco séculos seguidos de exploração predatória e irracional, conforme relata detalhadamente DEAN (1998). Ainda que o ritmo de desmatamento nas áreas de florestas originais tenha diminuído nos últimos anos, considerando-se os pequenos fragmentos de florestas e as áreas mais alteradas, esse ritmo ainda é o mesmo registrado há 15 anos atrás. Segundo dados do Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica, publicação da Fundação SOS Mata Atlântica e do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), no período de 1995 a 2000, a extensão da Mata Atlântica, nos seus remanescentes florestais bem conservados, foi reduzida para 7,1% da sua área original. Esse quadro é bastante grave e nos mostra que, a despeito da propalada conscientização pública frente à fragilidade desse bioma, o desmatamento se mantém; ou seja, nossas práticas aparentemente pouco se alteraram.

Como prenúncio de novos tempos, o século XXI é saudado com o CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente- estabelecendo, com a Resolução nº 278/2001, regras e diretrizes para o trato com espécies da flora brasileira ameaçada de extinção. Posteriormente, com a Resolução nº 317/2002, o CONAMA complementou essas diretrizes, determinando a realização de Planos Estaduais de Conservação e Uso das Espécies da Flora Ameaçada de Extinção na Mata Atlântica. É importante lembrar que essa intervenção do CONAMA numa questão, a rigor tão preocupante, somente se deu após inúmeras e insistentes provocações do movimento ambientalista. A absurda situação criada com a exploração florestal indiscriminada no sul da Bahia e em Santa Catarina, principalmente, foi a indutora dessa postura do CONAMA. A prévia interferência do judiciário, com uma de-



Foto 1: Regeneração *in vitro* de plântulas de cedro (*Cedrela fissilis*) a partir da cultura de segmentos nodais.



Foto 2: Tronco de árvore antiga de pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia*). Exemplares como esse, encontrado nas florestas de Campos Novos (SC), são cada vez mais raros.

cisão favorável ao pleito dos ambientalistas no caso da exploração madeireira das espécies ameaçadas de extinção no Estado de Santa Catarina, teve um efeito bastante decisivo, forçando objetivamente o CONAMA a se posicionar com a agilidade que o caso exigia. A legalização do processo de exploração madeireira de espécies ameaçadas de extinção, dentro dos escassos remanescentes de Mata Atlântica, concedida pelo próprio IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, órgão executivo do SISNAMA – Sistema Nacional do Meio Ambiente, conferiu conotação verdadeiramente escandalosa ao processo.

Em Santa Catarina, um dos últimos Estados a promover a instalação do Comitê da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, as apreensões de carregamento de madeira e as notificações de desmatamentos, infelizmente são ainda quase rotineiras. Basta uma rápida consulta aos jornais locais para se constatar a preocupante frequência com que são apreendidos carregamentos de pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia*), canela-preta (*Ocotea catharinensis*), imbuia (*Ocotea porosa*), sassafrás (*Ocotea odorifera*), entre outras. São recorrentes também os casos de desmatamentos sem qualquer autorização, em geral para “limpar” áreas que serão usadas para receber o plantio de *Pinus elliottii*.

A extensiva progressão dos plantios de essências florestais exóticas tem sido um dos fatores de maior pressão sobre os remanescentes florestais nativos. Por um lado, argumenta-se que o mercado de madeira força uma ampliação da área plantada com espécies de rápido crescimento; por outro, sem qualquer base técnica ou científica consistente, apregoa-se a viabilidade de um pretensão manejo florestal sustentável nas áreas de remanescentes naturais. Tanto de um lado quanto de outro, a ampliação das áreas de risco das espécies ameaçadas torna-se a única garantia.

DOUROJEANNI (1987) relata, com base em uma revisão da situação do manejo florestal no continente latino-americano até 1986, que não existia nenhum exemplo de manejo florestal tecnicamente consistente. Mesmo que em alguns casos o sucesso inicial se mostrasse animador, normalmente isso não perdurava. Quase todos os ensaios falharam ou foram abortados depois de uma ou duas décadas, no máximo. Em geral, essas florestas manejadas foram convertidas em pastagens ou destinadas à agricultura migratória.

Também no Estado de Santa Catarina, recentemente se explicitou uma situação que bem retrata a insuficiência de informações sobre a biodiversidade, a precária divulgação dessas informações e o completo descompasso entre os discursos e a

prática. No processo de licenciamento para a construção de uma pequena hidrelétrica no Rio Itajaí-açu, foi negligenciada a citação de ocorrência ali de uma espécie endêmica, no caso uma planta arbustiva que explora as margens pedregosas do rio, descrita em 1961 e denominada *Raulinoa echinata* (COWAN e SMITH, 1973). Não fosse a mobilização dos ambientalistas locais, a espécie poderia estar hoje engrossando a lista daquelas definitivamente extintas. O episódio mostra a amplitude do problema, quando não se inclui na análise as chamadas espécies endêmicas. Isso porque muitos desses endemismos são ilustrados por populações extremamente restritas e, portanto, altamente susceptíveis. Registra-se que a América Latina é a região com a maior diversidade biológica e também com o maior número de endemismos do planeta, ficando o Brasil com o quarto lugar na lista dos países detentores dos maiores números de espécies endêmicas.

É necessário entender que o conhecimento por si só nada garante. Desde 1990, o Estado de Santa Catarina dispõe de uma listagem bastante abrangente de espécies raras ou ameaçadas de extinção (KLEIN, 1990; KLEIN, 1996; KLEIN, 1997), onde se constata, com certa dose de indignação e surpresa, no item “medidas conservacionistas tomadas”, uma avassaladora repetição do termo *Nenhum*.

Num cenário tão inquietante, com certa frequência nos questionamos: Como prever o valor que uma espécie de animal, planta ou microorganismo terá no futuro? As possibilidades estão distribuídas por um largo espectro de necessidades humanas, algumas já conhecidas e muitas outras ainda desconhecidas. Nosso conhecimento com relação às próprias espécies é ainda por demais insatisfatório. Menos de dois milhões estão catalogadas nos registros científicos, com um nome formal, enquanto um número estimado entre cinco a cem milhões de espécies – ou mais – esperam para ser descobertas. Das espécies conhecidas, menos de 1% foi submetido a não mais que um exame sumário. No tocante às flores-



Foto 3: Fruto de canela-preta (*Ocotea catharinensis*)

tas tropicais, segundo KAGEYAMA e LEPSCH-CUNHA (2001), os estudos genéticos em populações de espécies arbóreas tropicais são recentes e foram realizados com amostragem de espécies pouco representativas das comunidades, servindo mais para orientar os futuros trabalhos na área do que para conclusões e orientações de como utilizar esses dados, por exemplo, para programas de conservação.

Confirmada a manutenção da pressão antrópica sobre as espécies e os ecossistemas, pode parecer ilógica a pretensão de se justificar esforços na busca de alternativas tecnológicas inovadoras para se conterem as taxas atuais de extinção. No entanto, assumindo-se o valor intrínseco que cada ser vivo possui, essa lógica torna-se aceitável. Não é, contudo, generalizada a aceitação e o reconhecimento desse valor pela sociedade moderna. Por essa razão, na maioria dos casos, os estudos biotecnológicos, mesmo quando têm

por objeto espécies ameaçadas de extinção, procuram agregar justificativas adicionais de ordem econômica, buscando, assim, tanto maior facilidade de financiamento quanto de aceitação, e, por conseguinte, maior disseminação de seus resultados e potencialidades. Trabalhos com *Swietenia macrophylla* (LEE e RAO, 1988), *Cedrela odorata* (MARUYAMA et. al., 1989; MARUYAMA et. al., 1997), e *C. fissilis* (foto 1) (NUNES et. al., 2002), mostram-nos alguns exemplos, largamente enfatizados, com potencial para implantar reflorestamentos comerciais, dinamizar programas de melhoramento genético, desenvolver técnicas de controle silvicultural ou de obtenção de insumos fitoquímicos e/ou farmacológicos. KAGEYAMA e LEPSCH-CUNHA (2001) afirmam que o fator econômico é determinante no interesse pelas florestas tropicais, notadamente pelo uso potencial da biodiversidade pela indústria farmacêutica e química, através da biotecnologia.

A rigor, a valorização da biodiversidade, por si só, pouca melhoria tem trazido para as espécies ameaçadas de extinção. Mesmo para espécies emblemáticas, como é o caso do pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia*) (foto 2), a ampliação do seu valor econômico, que foi impulsionado exatamente pela sua escassez crescente, só fez com que suas derradeiras reservas naturais fossem ainda mais dizimadas. KLEIN (1990), já alertava que o valor econômico, industrial, alimentar ou medicinal, de um número considerável de espécies pode condicionar o seu desaparecimento. Entre essas espécies KLEIN destaca o próprio pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia*), a imbuia (*Ocotea porosa*), a canela-preta (*Ocotea catharinensis*) (foto 3), a canela sassafrás (*Ocotea odorifera*), o palmitheiro (*Euterpe edulis*) e a erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Mesmo com a concorrência de uma legislação protetora, a pressão econômica, aliando-se a uma fiscalização deficitária e inerte, complementada com uma intrincada rede de corrupção, têm sido geradas poucas perspectivas positivas para

as espécies ameaçadas de extinção, mesmo para aquelas oficialmente reconhecidas nessa condição. LIMA (2001), numa avaliação minuciosa da tutela jurídica das espécies da flora ameaçada de extinção na Mata Atlântica, afirma que, ao continuar com a exploração econômica de tais espécies, sem qualquer estudo de viabilidade ecológica e genética, certamente estaremos, todos nós, inclusive o próprio IBAMA, assistindo à exclusão dessas espécies da lista oficial, pois estarão extintas em breve.

Mesmo considerando que os avanços tecnológicos possam melhorar o problema da crise de extinção, ou ainda que tecnologias inovadoras venham suprir serviços ambientais outrora fornecidos por ecossistemas, seria um erro de cálculo, na visão de WILSON (1997), acreditar que a resposta esteja na tecnologia.

Na preservação da biodiversidade, o uso da tecnologia é o último recurso. Em situações cada vez mais freqüentes, passa a ser o único. A fragmentação e o isolamento dos remanescentes florestais podem determinar a inviabilidade da manutenção de populações inteiras de plantas e de animais. Em casos assim, tecnologias de intervenção são indispensáveis para que se restabeleça um fluxo gênico minimamente satisfatório. O problema maior é que grande parte das perdas de biodiversidade e de serviços ambientais que já provocamos, estão muito além da capacidade humana de recuperá-las. Adicionalmente, não podemos negligenciar o custo da utilização da alta tecnologia e o fato de que os recursos hoje disponíveis se encontram quase sempre nos países ricos do norte, enquanto as grandes perdas de biodiversidade ocorrem majoritariamente nos países pobres dos trópicos. Assim, notadamente para esses países megadiversos e pobres, a preservação de habitat é vista como a estratégia viável e realística.

A clonagem de espécies criticamente ameaçadas, quando os demais métodos falharem, por exemplo, tem sido indicada como estratégia de conservação. Da mesma forma, a expan-

são de bancos de sementes e esporos, a manutenção de estoques de tecidos e de embriões congelados em nitrogênio líquido (-196 C) ou em seu vapor (-150 a -180 C). Pode-se também criopreservar ápices, embriões somáticos encapsulados em alginato de sódio, técnica conhecida como *encapsulação* (VIEIRA, 2000). Esses métodos, contudo, são dispendiosos e de eficácia relativa, notadamente para bactérias, arqueanos, protistas, fungos, insetos e outros invertebrados que formam a base da biosfera. A única forma segura de salvar espécies, além de ser a mais barata e sensata, é preservar os ecossistemas naturais em que vivem atualmente essas espécies. Como afirmam DOUROJEANNI e PÁDUA (2001), lamentavelmente, até agora, o gênio humano não descobriu outra forma mais eficiente que as Unidades de Conservação para preservar a biodiversidade.

Dizer que a conservação *in situ* é hoje a melhor estratégia para a proteção de espécies ameaçadas, não significa dizer que outros esforços não sejam técnica e eticamente defensáveis e necessários. Precisamos implementar e reforçar uma ética conservacionista, calcada em o homem admitir sua responsabilidade na criação de uma crise planetária e de perceber inequivocamente que a moral vigente não a tem admitido. Frente a esses pressupostos, torna-se absolutamente necessário rever nossos modos de produção e consumo, fazendo com que, com esse novo paradigma humano, se reflitam sobre as demais espécies biológicas, e que, paralelamente, se eliminem os antropocêntricos questionamentos referentes aos investimentos direcionados para a proteção das espécies. O fato concreto é que, até o momento, muito pouco se fez para frear essa onda de extinções que a modernidade humana promoveu. Investimentos feitos, tanto pelos países ricos quanto pelos pobres, empresas públicas ou privadas, são limitados e instáveis. Quase sempre insuficientes e mal aplicados.

A tecnologia não deve ser entendida e propagada como uma panacéia para o mal da extinção. Ainda

que como paliativo, deve ser perseguida e aprimorada. Mesmo que, como ferramenta, se desenvolva a partir de nossos interesses de base econômica, suas possibilidades de uso na minimização do impacto da extinção de espécies biológicas precisa ser cada vez mais considerado. Por outro lado, direcionar nossos esforços unicamente em torno dos interesses econômicos da biodiversidade seria um grande equívoco. Primeiramente, porque nosso escasso conhecimento acerca da biodiversidade, fez, na prática, com que a sociedade não identifique qualquer valor na imensa maioria das espécies de plantas e animais vivos, e, adicionalmente, porque a lógica econômica é essencialmente excludente, não mostrando a menor habilidade sequer de repartir seus benefícios entre diferentes núcleos de populações humanas.

Referências Bibliográficas

- COWAN, R.S.; SMITH, L.B. Rutáceas. Itajaí. **Flora Ilustrada Catarinense**. 1973. 89p.
- DEAN, W. **A Ferro e Fogo**: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira. São Paulo. Companhia das Letras, 2 reimpressão. 1998. 484p.
- DOUROJEANNI, M.J.; PÁDUA, M.T.J. **Biodiversidade**: A Hora Decisiva. Curitiba, Edit. UFPR – Fundação O Boticário de Proteção à Natureza. 2001. 307p.
- DOUROJEANNI, M.J. Manejo de bosques naturales em el tropico americano: situación y perspectivas. **VER. FOR. del PERÚ** v.14. n.1. pp. 91 – 108. 1987.
- KAGEYAMA, P.; LEPSCH-CUNHA, .N.M. Singularidade da Biodiversidade nos Trópicos. In: GARAY, I; DIAS, B.(org.). **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis. Edit. Vozes. 2001. 430p.
- KLEIN, R.M. **Espécies Raras ou Ameaçadas de Extinção**: Estado de Santa Catarina. Rio de Janeiro, IBGE. v.1 – Mirtáceas e Bromeliáceas. 1990. 287p.
- KLEIN, R.M. **Espécies Raras ou Ameaçadas de Extinção**: Estado de Santa Catarina. Rio de Janeiro, IBGE. v.2. 1996. 170p.
- KLEIN, R.M. **Espécies Raras ou Ameaçadas de Extinção**: Estado de Santa Catarina. Rio de Janeiro, IBGE, v.3 – Solanáceas, Begoniáceas, Leguminosas/Mimosóideas e Gramíneas. 1997. 283p.
- LEE, S.K.; RAO, N.A. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* King through tissue culture. **Gard. Bul1 Sing.** n. 41. pp.11-18. 1988.
- LIMA, A. Tutela Jurídica das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção na Mata Atlântica. In: LIMA, A. (org.). **Aspectos jurídicos da proteção da Mata Atlântica**. São Paulo, Instituto Socioambiental. Documentos ISA 7. 2001. 311p.
- MARUYAMA, E.; ISHII, K.; SAITO, A.; MIGITA, K. Micropopagation of cedro (*Cedrela odorata* L.) by shoot-tip culture. **J. Jpn. For. Soc.** n.71. pp.329-331. 1989.
- MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; OHBA, K. Germplasm conservation of the tropical Forest trees *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart. and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12 -25? **C. Plant Cell Rep.** n.16. pp. 393-396. 1997.
- NUNES, E.C.; CASTILHO, C.V.; MORENO, F.N.; VIANA, A.M *In Vitro* Culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. n. 70. pp. 259-268. 2002.
- SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotechnologia** n.13. pp. 28 – 32. 2000.
- WILSON, E.O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro, Edit. Nova Fronteira. 1997. 657p.
- WILSON, E.O. **O Futuro da Vida**: um estudo da biosfera para a proteção de todas as espécies, inclusive a humana. Rio de Janeiro, Edit. Campus. 2002. 242p.
- VIEIRA, M.L.C. Conservação de Germoplasma *in vitro*. **Biotechnologia** n.14. pp. 18 – 20. 2000. 🌿