
BIOCATÁLISE APLICADA E ENGENHARIA GENÉTICA SÃO UMA PARTE DA BIOTECNOLOGIA... O QUE É A BIOTECNOLOGIA?

**CARLA G. MOUTINHO
CRISTINA V. ALMEIDA
VICTOR M. BALCÃO**

RESUMO

O termo Biotecnologia abrange um vasto conjunto de técnicas que envolvem a utilização de sistemas biológicos tanto para a obtenção de produtos com interesse económico como na saúde. A Biotecnologia garante as ferramentas necessárias ao progresso cientificamente sustentado dos sectores em que os seres vivos integram processos produtivos. É por esta razão que desenvolvimentos na Biotecnologia resultam em progresso científico em áreas aparentemente não relacionadas, tais como a Medicina e a Agricultura, a Alimentação e o Ambiente. Foi utilizando a Microbiologia que o Homem descobriu, e depois produziu em larga escala, compostos tão diferentes como os antibióticos e enzimas, esteróides, aromatizantes, entre outros. Os conhecimentos gerados pela Biotecnologia permitiram dar um passo em frente no diagnóstico e cura de doenças, no desenvolvimento de novos alimentos etiquetados de "naturais" e na melhoria da qualidade dos existentes, e até no tratamento e aproveitamento de resíduos.

ABSTRACT

The word Biotechnology encompasses a large set of techniques involving the use of biological systems in the production of commodities with economical interest. Biotechnology provides the tools necessary to the scientifically sustained progress of the sectors in which alive beings integrate production processes. That is why developments in Biotechnology result in scientific progress in areas apparently non-related, such as Medicine and Agriculture, Food industry and Environment. It was through Microbiology that man has discovered and then produced in large scale compounds as different as antibiotics and enzymes, steroids, flavourings, amongst others. The knowledge generated by Biotechnology allowed man to make a step forward in the diagnostic and treatment of diseases, in the development of new food products labelled as "natural" and in improving the quality of existing ones, and even in the treatment and recovery of wastes.

BIOCATÁLISE APLICADA E ENGENHARIA GENÉTICA...

1. Introdução

412

Biotechnology, ou simplesmente a técnica da vida. Qualquer técnica que utilize um organismo vivo para sintetizar um produto útil ou obter uma reacção química desejável é um exemplo de Biotechnology. Desde tempos imemoriais que o homem tem feito uso de processos biológicos para a obtenção de diversos produtos que, pela sua importância, têm influenciado o balanço económico das sociedades (Schmidt-Kastner, 1984). Mas a compreensão científica destes processos só começou no século XIX com a demonstração que a fermentação dependia da actividade de organismos vivos, e somente a partir desta descoberta se pode aplicar o prefixo *bio* à palavra tecnologia, criando assim um novo vocábulo que designava algo que na realidade já existia há milhares de anos. Deste modo, aquilo que parece ser a novidade do mundo da tecnologia e da indústria dos nossos dias, e que é geralmente referido como uma das mais recentes e prometedoras áreas da tecnologia, é já uma antiquíssima actividade. Mas a verdade é que durante todo este tempo, esses processos a que podemos chamar agora de biotecnológicos foram sempre os mesmos e pouca ou nenhuma evolução sofreram, sendo que só nas últimas décadas, devido ao desenvolvimento e diversificação da Biologia apoiada em ciências como a Química, a Física, a Matemática e a Farmacologia, surgiu verdadeiramente a Biotechnology, impondo-se como um campo vastíssimo de múltiplas aplicações e de perspectivas por vezes extraordinárias (Tanaka, 1993). Actualmente, a Biotechnology tem sido amplamente expandida por meio da exploração da tecnologia do ADN (ácido desoxirribonucléico) recombinante, para "construir" microorganismos que sintetizam novos produtos valiosos. Os microorganismos, alterados geneticamente ou não, são utilizados comercialmente porque são capazes de transformar materiais em substâncias novas e com maior valor acrescentado, ou porque podem transformar resíduos poluentes em substâncias inofensivas e, em algumas vezes, úteis. As células microbianas ou os seus produtos são utilizadas para a produção de vacinas, e alguns microorganismos são também utilizados como insecticidas biológicos. Existem milhares de produtos comercialmente importantes, sintetizados pela manipulação de microorganismos, desde os alimentos básicos até às vacinas ainda em fase experimental contra a SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida) e agentes terapêuticos anti-tumorais. Os vários processos industriais utilizados para a síntese desses produtos microbianos podem ser divididos em quatro grandes categorias, com base nas aplicações futuras dos produtos finais: [i] *produção de substâncias químicas farmacêuticas* – os antibióticos e os fármacos esteróides são os representantes mais proeminentes deste grupo. Outros produtos farmacêuticos úteis, tais como a insulina e o interferon, são agora produzidos por bactérias geneticamente construídas, e muitos outros novos produtos estão-se a tornar disponíveis por meio da engenharia genética; [ii] *produção de substâncias químicas de*

valor comercial – esta categoria inclui solventes e enzimas, bem como vários compostos utilizados como matéria-prima para a síntese industrial de outras substâncias; [iii] *produção de suplementos alimentares* – a produção em massa de leveduras, bactérias e algas, a partir de meios de baixo custo que contêm sais de azoto inorgânico e outros nutrientes imediatamente disponíveis, pode fornecer uma ótima fonte de proteínas e outras substâncias que são úteis como suplemento alimentar para o homem e para os animais; [iv] *produção de vacinas* – as células microbianas no seu todo, partes delas ou produtos por elas produzidos, são obtidos em grande quantidade e utilizados para a produção de vacinas. As técnicas de Biologia Molecular e Engenharia Genética têm tornado possível a transferência de genes específicos de uma célula para outra. Este aspecto da Biotecnologia tem revolucionado a Microbiologia industrial. Não somente é possível transferir genes de um microorganismo para outro, como também é possível transferir genes de células de plantas ou de animais para uma bactéria ou uma levedura. Estas técnicas têm gerado potencial quase ilimitado para a produção microbiana de compostos úteis. A promessa comercial da Engenharia Genética tem gerado centenas de companhias *biotec*, as quais já estão a produzir várias substâncias com interesse terapêutico. O avanço recente e já referido da Biologia, que por aplicação da Química e da Física levou a um conhecimento profundo dos processos que ocorrem na célula e no núcleo, permitiu novos desenvolvimentos nos processos de fermentação, na tecnologia enzimática e, mais recentemente, na engenharia enzimática, desenvolvimentos esses que introduziram novas e excitantes dimensões na área biotecnológica. As principais actividades afectadas pelos avanços nesta área foram, e continuarão a ser, a produção alimentar, as indústrias farmacêutica e química, a reciclagem de materiais residuais e controlo da poluição, a agricultura e a utilização de fontes de energia alternativa. Os processos biotecnológicos funcionam a baixa temperatura, consomem pouca energia e baseiam-se em substratos económicos para a biossíntese. As indústrias biotecnológicas tiram partido de materiais renováveis e recicláveis podendo, por isso, adaptar-se às necessidades de uma sociedade em que a energia é cada vez mais escassa e cara e em que se vive a ameaça do esgotamento de muitos recursos naturais não renováveis. Estes processos prendem-se essencialmente com as fermentações efectuadas por micro-organismos e que vão desde as mais antigas e tradicionais fermentações como o fabrico de cerveja, pão e vinho, até à produção mais recente de antibióticos e de outros produtos químico-farmacêuticos, simples ou complexos, como ácidos orgânicos, polissacarídeos, enzimas, vacinas e hormonas. Os efeitos da Biotecnologia avançada serão eventualmente sentidos por todo o mundo. Produtos agrícolas e alimentícios, monitorização de produtos de excreção e qualidade ambiental, matérias primas para a indústria química, novos produtos farmacêuticos e controlo de doenças infecciosas são as áreas nas quais certamente poderemos esperar a ocorrência de novas descobertas.

2. Aplicações da Biotecnologia na Indústria Alimentar

414

Desde a antiguidade que os alimentos têm vindo a ser transformados por via biotecnológica, de forma a prolongar o seu período de preservação e a melhorar as suas qualidades sensoriais. As enzimas são hoje em dia utilizadas na indústria alimentar para acelerar determinadas reacções químicas específicas. Todas as enzimas em aplicações na indústria alimentar têm como origem seres vivos, *i.e.* plantas, animais e microorganismos, estando a escolha da fonte enzimática relacionada com a sua disponibilidade (muitas enzimas só se encontram em células animais), a sua aplicabilidade (existem enzimas resistentes a temperaturas elevadas), o seu custo (derivado da relativa morosidade e fraco rendimento do processo de extracção) e as leis do mercado (procura de carne de vitelo). Hoje em dia, com o desenvolvimento da engenharia genética, muitas das enzimas são produzidas por via recombinante, usando microorganismos como hospedeiros. Os recentes desenvolvimentos na tecnologia do ADN recombinante criaram possibilidades, não apenas no sentido da melhoria do controlo dos processos alimentares existentes e da criação de novas abordagens ao controlo de qualidade, mas também a nível do próprio desenvolvimento de novos produtos alimentares. As potencialidades daquela tecnologia em termos da introdução de benefícios no processamento industrial de alimentos e na sua qualidade (p.ex. aparência, textura, tempo de vida útil, e valor nutritivo) são enormes, mas o seu impacto económico é ainda difícil de quantificar sendo certo que, independentemente da situação geográfica ou da orientação política, a Biotecnologia oferece ferramentas muito válidas para ajudar a resolver as deficiências alimentares mundiais.

2.1. Engenharia Enzimática

As transformações biotecnológicas de alimentos repartem-se basicamente por três grandes tipos: transformação por catálise enzimática (a qual requer enzimas), transformação por catálise microbiana (a qual requer organismos viáveis) e a transformação genética (a qual requer alterações deliberadas do ADN das células do próprio alimento, ou de microorganismos a adicionar ao alimento). A catálise enzimática como ferramenta para a transformação de alimentos apresenta várias vantagens para a indústria alimentar, sendo de destacar a possibilidade de produção em grande escala, a constância na qualidade final do produto, a possibilidade de realizar alterações nas características sensoriais de acordo com exigências do mercado, a aceleração do processo produtivo sem afectar as qualidades finais dos produtos, e por fim a constituição de um conjunto de tecnologias "amigas" do ambiente (meio aquoso, temperatura ambiente, pH neutro, pressão atmosférica, e níveis reduzidos de produtos residuais). Seguidamente, apresentar-se-ão (Balcão *et al.*, 2001a) de forma sistemática algumas transformações de alimentos por catálise enzimática, na óptica de raciocínio de que as enzimas são *soluções em busca de problemas*.

Transformação enzimática de ovos... O problema reside na reacção entre o grupo aldeído da glucose e o grupo amina da albumina, aquando da produção de ovos desidratados em pó, originando o escurecimento do produto (reacção de Maillard). Tal coloração é obviamente indesejável se o produto tiver como finalidade o fabrico de doces, maioneses e molhos. A solução consiste então em adicionar a enzima glucose oxidase (oxidoreductase proveniente, por exemplo, do fungo *Aspergillus niger*) ao produto, a qual catalisa a oxidação da glucose a ácido glucónico.

Transformação enzimática de pescado... O problema reside na crescente procura, pelos consumidores, de filetes de peixe com pele, a aceitação dos quais depende muito do aspecto visual, o que obviamente exige uma descamação eficiente (ou seja, remoção de todas as escamas deixando a pele intacta e perfeita). Este objectivo é extremamente difícil de conseguir por métodos manuais ou mecânicos. A solução encontrada (Svenning *et al.*, 1993) e que actualmente é utilizada na Noruega e no Japão consiste em utilizar a enzima pepsina (hidrolase de origem marinha, extraída por exemplo do bacalhau), a qual ataca o colagénio do tecido conjuntivo que faz a ligação das escamas à pele. Este tecido tende a ser menos estável em peixes pequenos ou peixes de água fria, do que em peixes de maiores dimensões ou de águas mais quentes. Assim, as condições de incubação enzimática são ajustadas consoante o tamanho e o tipo de peixe. As escamas são removidas por tratamento com Hyzym™ (preparado enzimático comercial à base de pepsina de bacalhau), dissolvido numa solução de ácido acético a 0.5%, seguido de enxaguamento, de peixe inteiro ou eviscerado pouco antes da filetagem. Um efeito secundário positivo deste tratamento pode ser uma melhor higiene do produto final do ponto de vista microbiano, devido à exposição do pescado ao ácido acético diluído durante a incubação enzimática.

Transformação enzimática de carne... O problema reside no facto de que após o abate dos animais o pH atinge um valor próximo de seis, conduzindo ao estado de *rigor mortis* (perda de integridade celular, com sobreposição e combinação dos filamentos de actina e miosina). Quanto menor for este grau de interacção, mais tenra será a carne, pelo que esta deverá repousar durante algum tempo após o abate (processo de condicionamento) para que as proteases endógenas do músculo da carne possam actuar espontaneamente sobre as proteínas e tornar a carne mais tenra, provavelmente o qualificativo da carne mais procurado pelo consumidor. A solução encontrada consiste em acelerar o processo de condicionamento da carne, adicionando-lhe deliberadamente proteases tais como a papaína (protease de origem vegetal, extraída da *Carica papaya*) ou a bromelaína (protease de origem vegetal, extraída do *Ananas comosus*), sendo a papaína a protease mais utilizada para tenrificar a carne devido ao seu menor custo. As proteases de origem microbiana são as menos utilizadas

comercialmente. Um dos processos de tenrificação da carne consiste em injectar o animal vivo com uma dose de papaína oxidada (forma inactiva) poucas horas antes do abate. A enzima só é reactivada durante o periodo *post-mortem*, possuindo a vantagem de estar uniformemente distribuída por toda a carne. A alternativa consiste em pulverizar uma solução de enzima sobre peças pequenas de carne.

416

Transformação enzimática de horto-frutícolas... O problema reside no facto de que, sendo as pectinas polissacarídeos, são os principais constituintes da parede celular do fruto. Estas macromoléculas são libertadas aquando do fabrico do sumo, sendo mais tarde as responsáveis pela deposição indesejável de partículas. A solução consiste em utilizar pectinases (hidrolases, obtidas, por exemplo, do fungo *Aspergillus flavus*). Estas hidrolases são utilizadas no fabrico de sumos (tomate, citrinos, etc.) para proceder à hidrólise parcial de pectina de forma a obterem-se produtos que fluam livremente, mas capazes de manter o nível de viscosidade suficiente para prevenir deposição indesejável de partículas suspensas. No caso do sumo de maçã, provoca-se uma hidrólise mais intensa para que haja precipitação da maior parte das partículas. No caso da produção de vinho, a adição de pectinases às uvas esmagadas permite aumentar o rendimento de produção de sumo e de extracção dos corantes da casca. Após a fermentação do mosto, as pectinases desempenham ainda um papel importante na clarificação, tornando mais fácil a filtração posterior do vinho.

Transformação enzimática de cereais... Um dos problemas existentes nesta área resulta do facto de que a indústria alimentar utiliza largamente xaropes de glucose, os quais seriam muitíssimo dispendiosos se fossem produzidos a partir da sacarose. As amilases até agora estudadas não conseguem hidrolisar rapidamente o amido tal como este se encontra nas plantas, pelo que para que este fique acessível ao ataque enzimático é necessário provocar uma gelatinização prévia ($T > 60^{\circ}\text{C}$, $< 30\%$ m/m), em que ocorre um rebenamento dos grânulos de amido. Contudo, este processo provoca um aumento significativo da viscosidade. O amido é um polissacarídeo natural com duas componentes: a α -amilose (não ramificada, com ligações glicosídicas α -1,4) e a amilopectina (muito ramificada, com ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 nos pontos de ramificação). A solução encontrada consiste em utilizar a enzima α -amilase (hidrolase, obtida por exemplo da bactéria *Bacillus subtilis*), a qual ataca ao acaso as ligações glicosídicas α -1,4 do polissacarídeo, libertando oligossacarídeos e por fim unidades de glucose (processo designado por sacarificação). Este processo é acompanhado pela diminuição da viscosidade da solução inicial de amido (liquefação). Um outro problema resulta do facto de que o substrato para a fermentação alcoólica no fabrico da cerveja é a maltose. A maltose só se consegue obter em quantidades industriais se se fizer uma hidrólise específica do amido. A solução encontrada consiste em utilizar a enzima

β -amilase (hidrolase, obtida por exemplo da bactéria *Bacillus subtilis*), a qual ataca as ligações glicosídicas α -1,4 nas extremidades não redutoras do polissacarídeo, libertando sempre maltose. Xaropes com elevados teores de maltose exibem propriedades diferentes daqueles com elevados teores de glucose. Logo, a proporção relativa a utilizar destas duas enzimas depende do resultado pretendido. Um último problema resulta do facto de que o amido pode ser hidrolisado a unidades de glucose, mas no entanto a glucose não pode substituir directamente a sacarose porque é menos doce. A solução encontrada consiste em utilizar a enzima glucose isomerase (isomerase, obtida, por exemplo, da bactéria *Lactobacillus brevis*). Esta enzima catalisa a isomerização parcial da glucose (aldose) a frutose (cetose), obtendo-se no equilíbrio uma mistura equimolar de ambas. Esta mistura exhibe uma doçura superior à da glucose sozinha e é um bom substituto da sacarose. A produção de um xarope com elevado teor de frutose é comercialmente muito mais vantajosa do que a extracção da sacarose de cana do açúcar, e por isso hoje em dia muito procurado para o fabrico industrial de bebidas, pastelaria, chocolataria, etc.

Transformação enzimática de leite... O problema resulta do facto de que a ordenha provoca uma contaminação microbiana do leite, uma vez que este saiu do ambiente mamário naturalmente esterilizado. Como por vezes não é possível a refrigeração do leite, ou não existe equipamento para a sua pasteurização, os produtores adicionam peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ao leite (processo designado por pasteurização fria) de forma a reduzir e controlar o crescimento microbiano. Contudo, este agente químico permanece no leite, pelo que a solução encontrada consiste em utilizar a enzima catalase (oxidoreductase, obtida, por exemplo, do fungo *Aspergillus niger*). Esta enzima é adicionada ao leite para eliminar o excesso de H_2O_2 , hidrolisando duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de H_2O e uma molécula de O_2 . Um outro problema reside no facto de que, quando o leite é ingerido, a lactose (o açúcar constituinte do leite) é hidrolisada a galactose e glucose por uma enzima que se encontra no intestino dos jovens. Com o envelhecimento, ou falta de ingestão diária de leite, o indivíduo perde a capacidade de sintetizar esta enzima, o que provoca a não degradação da lactose. A má absorção da lactose no tracto intestinal leva a problemas gastro-intestinais (dores abdominais, vómitos, diarreias). A solução encontrada consiste em utilizar a enzima β -galactosidase (hidrolase, obtida por exemplo do fungo *Kluyveromyces fragilis*). Esta hidrolase catalisa a quebra da lactose a galactose e glucose e pode ser adicionada ao leite (existindo já no mercado leite com lactose hidrolisada, tratado em reactores contendo β -galactosidase imobilizada em membranas de triacetato de celulose), ou tomada em comprimidos aquando da ingestão do leite.

Transformação enzimática de soro... O problema tem origem no facto de que o soro de leite é, numã das suas aplicações mais frequentes, utilizado

em formulações lácteas para bebês. A alergia ao leite de vaca em algumas crianças está relacionada com a heterogeneidade dos constituintes proteicos, embora ela seja atribuída essencialmente à presença de β -lactoglobulina (β -Lg) uma vez que esta proteína não se encontra no leite materno. Vários processos têm sido tentados para desenvolver um leite hipoalergénico, contudo sem grande êxito: aquecimento (sem efeito, ainda potencia mais o efeito alergénico da β -Lg), e precipitação com FeCl_3 (com efeito, mas a um custo económico muito elevado). A solução encontrada consiste em utilizar a enzima tripsina (hidrolase, extraída, por exemplo, de pâncreas animal). Esta hidrolase (ou pepsina ou quimotripsina) pode ser imobilizada para quebrar as caseínas do soro em peptídeos. Provou-se que os hidrolisados provocavam menos reacções alergénicas, sem contudo as eliminarem completamente. A combinação do aumento do tempo de hidrólise com separação por ultrafiltração permitirá eliminar as proteínas do soro que nele permaneceram intactas. Estes hidrolisados serão um bom complemento proteico hipoalergénico para a produção de alimentos para crianças.

Transformação enzimática de queijo... O problema, se é que o podemos encarar como tal, iniciou-se com o sedentarismo: o homem rapidamente reconheceu o valor nutritivo do leite dos animais que criava, pelo que o excesso de leite recolhido levou à necessidade de o guardar para posterior consumo (em potes de barro ou sacos de estômago). Contudo, o leite também é um meio altamente nutritivo para alguns microorganismos, o que leva à sua rápida acidificação e conseqüente coagulação. Ou, quando guardado em sacos de estômago, havia formação de um gel, o qual, após devidamente salgado e seco ao ar, produzia um alimento nutritivo de longa duração (nascendo assim o fabrico do queijo). A solução, por assim dizer, para despoletar o fabrico do queijo consiste em fazer uso da acção de hidrolases (proteases) específicas que hidrolisam a ligação peptídica $\text{Phe}_{105}\text{-Met}_{106}$ da κ -caseína libertando dois peptídeos: a para- κ -caseína (insolúvel em água) e que na presença de cálcio (Ca^{2+}) forma uma rede proteica designada por coágulo; e o glicomacropéptideo (solúvel em água) que é eliminado aquando da remoção do soro. O coagulante residual no queijo também hidrolisa as α_s - e β -caseínas dando origem a macropéptídeos; estes são depois hidrolisados pelas peptidases microbianas libertando peptídeos mais pequenos e aminoácidos, os quais são essenciais à formação de sabor e aroma no queijo. As proteases adequadas ao fabrico do queijo foram inicialmente de origem animal (quimosina, obtida do estômago de vitelo jovem, ou renina, obtida do estômago de animal adulto) ou vegetal (cardosinas, hidrolases de origem vegetal obtidas a partir da flor do cardo, *Cynara cardunculus* L.). O coagulante mais utilizado é o de origem animal (quimosina), mas a sua crescente escassez resultou ultimamente num elevado custo, o que associado a problemas éticos ou de comportamento dietético tem levado à sua substituição por coagulantes microbianos (produzidos, por exemplo, pelo fungo *Aspergillus niger*). O coagulante

vegetal é utilizado em muito menor escala a nível mundial, estando praticamente restrito a queijos ibéricos de fabrico tradicional.

Transformação enzimática de manteiga... O problema tem por base as gorduras, componentes essenciais da dieta humana que fornecem um elevado nível de palatabilidade, sabor e saciedade, bem como a textura ou sensação na boca a que a maior parte das pessoas dificilmente consegue resistir. A gordura do leite tem sido identificada como hipercolesterolémica porque contém colesterol e é essencialmente saturada, pelo que um excesso crescente de gordura do leite pode ser esperado no futuro devido à cada vez maior procura por parte do consumidor de alimentos com baixo teor de gordura saturada e colesterol. A solução encontrada consiste em tirar partido da não-especificidade (lipase proveniente de pâncreas animal ou da levedura *Candida cylindracea*) ou especificidade-1,3 (lipase proveniente do fungo *Mucor circinelloides*) de algumas lipases para retirar dos triacilglicéridos nativos da manteiga aqueles ácidos gordos identificados como hipercolesterolémicos (nomeadamente o láurico, o mirístico e o palmítico) e introduzir em seu lugar ácidos gordos (mono- ou poli-) insaturados identificados como benéficos para a saúde (tais como o ácido oleico, o ácido eicosapentaenóico - EPA, ou o ácido docosahexaenóico - DHA). Esta última hidrolase catalisa reacções de interesterificação entre os triacilglicéridos e ácidos gordos livres deliberadamente adicionados à manteiga. O ponto de fusão da manteiga modificada fica mais alargado, o que permite o seu melhor espalhamento após sair do frigorífico. A manteiga modificada enzimaticamente apresenta ainda propriedades funcionais (abaixamento do ponto de fusão) e nutricionais (o teor de ácido oleico aumenta em 27%, o de ácido láurico diminui em 7.5%, o de ácido mirístico diminui em 5.7%, o de ácido palmítico diminui em 6.1%; o teor de triacilglicéridos saturados diminui em 26.6%, o de triacilglicéridos mono-insaturados aumenta em 20.5% e o de triacilglicéridos poli-insaturados aumenta em 16.6%) melhoradas (Balcão e Malcata, 1997, 1998a,b, 2001; Balcão *et al.*, 1998 a,b).

2.2. Engenharia Genética

O que a Biotecnologia já fez e o que ainda pode fazer... A manipulação genética de plantas e animais não é um conceito novo. Antes pelo contrário, a selecção de cultivares é praticada desde tempos ancestrais ainda que de forma empírica, muito antes de ser conhecido o mecanismo que está na sua base molecular. O processo de selecção, que resultou na formulação das clássicas leis Mendelianas, está limitado ao cruzamento das características inerentes a uma espécie entre indivíduos da mesma espécie (p.ex. uma tulipa negra não pode ser obtida por técnicas de cruzamento, uma vez que o gene que codifica esta característica não é inerente a essa espécie de planta). Mas um gene oriundo de outra planta e capaz de codificar esta cor pode ser introduzido para que se crie uma tulipa negra. Duas razões

principais diferenciam a nova tecnologia do ADN recombinante dos processos clássicos de selecção, uma vez que esta acelera o processo natural aleatório de mutação, permitindo assim alcançar os resultados desejados de uma forma mais rápida e previsível, e permite ultrapassar a barreira entre espécies (por ex. de um animal para um microrganismo, ou de um microrganismo para uma planta).

420

A grande maioria dos alimentos sujeitos a manipulação genética são de origem vegetal, sendo normalmente utilizado como vector um plasmídeo da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (patogénica para as plantas) desde que a sua capacidade para as infectar tenha sido previamente eliminada. Esta bactéria dissolve a parede celular da planta e insere o seu plasmídeo (contendo o gene pretendido) no genoma da planta. A partir desta célula transformada cresce uma nova planta, designada correntemente como transgénica ou geneticamente manipulada. As colheitas alimentares modernas são híbridas de espécies diferentes, resultado de manipulação genética por parte da Natureza ao longo de milhares de anos. Como já se disse, quando um gene de uma espécie é transferido para outra espécie, o organismo modificado é chamado de "transgénico". E surge então a questão: o que podem os alimentos transgénicos fazer para melhorar a nossa qualidade de vida? Empresas de Biotecnologia agrícola tais como a Calgene (agora parte da Monsanto), DuPont, Union Carbide, e DNA Plant Technology Corp., estão a usar a Biotecnologia para [i] aumentar o valor nutritivo dos alimentos provenientes das colheitas, [ii] modificar plantas geneticamente para controlar infestações por pragas e [iii] desenvolver plantas cujos frutos possam ser colhidos sem estarem maduros para assim sobreviverem ao transporte, mas que possuam o sabor e aroma de frutos colhidos maduros.

Aumento do valor nutritivo dos alimentos... A primeira aplicação da Biotecnologia em alimentos e produtos alimentares foi a produção da enzima quimosina, produzida por bactérias transgénicas. A quimosina funciona exactamente como a renina, uma enzima necessária à produção de queijo que era tradicionalmente obtida a partir do estômago da vaca (Weinberg, 1996). Mais de 800 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem o efeito da fome ou estão com malnutrição crónica. Para poder fazer face às necessidades crescentes de alimentos, os agricultores têm de aumentar a sua produção em cerca de 40% até ao ano 2020 (Tangley, 2000). Mesmo em países com as terras mais férteis, a produção de colheitas atingiu um patamar. A Engenharia Genética possui o potencial para produzir plantas transgénicas que poderiam aumentar o rendimento da produção, resistir às pragas e aumentar a qualidade nutricional dos alimentos. No México, os cientistas desenvolveram já milho transgénico e plantas de arroz que toleram níveis tóxicos de alumínio, problema comum em solos tropicais (Tangley, 2000). Cientistas do Instituto Federal de Tecnologia em Zurique criaram já "arroz dourado" contendo β -caroteno, o qual é convertido em

vitamina A. A deficiência nesta vitamina torna 230 milhões de crianças em todo o mundo mais vulneráveis às infecções. Contrastando com a maior parte das plantas transgênicas, a equipa científica deste Instituto de investigação inseriu três genes na variedade nativa do arroz, dois de um narciso e um de uma bactéria. Ao mesmo tempo, investigadores Filipinos esperam cruzar “arroz dourado” com outra variedade que seja consumida na Ásia. A equipa do Instituto Suíço inseriu outros dois genes adicionais no arroz, que duplicam o teor de ferro e aumentam a sua absorção. Desta forma, combate-se a anemia por deficiência em ferro, a desordem nutricional mais comum a nível mundial. Um outro exemplo de sucesso comercial de um horto-frutícola geneticamente modificado prende-se com a introdução na batata de genes previamente obtidos a partir de um genoma bacteriano, destinados a aumentar a quantidade de amido do tubérculo e, assim, diminuir a absorção de óleo pela batata durante a operação de fritura. Obviamente, as cadeias de fast food preferem este tipo de batata nas suas aquisições de matéria prima (Nottingham, 1998). Genes codificando a sub-unidade de glúten de elevado peso molecular têm ainda sido incluídos em centeio, com o objectivo de permitir às massas produzidas a partir deste cereal reter maiores quantidades de água e de dióxido de carbono produzido pelo agente levedante, traduzindo-se globalmente num amaciamento da referida massa.

Resistência às pestes... O uso de pesticidas tem criado problemas ambientais e de saúde. A Biotecnologia possui a capacidade de reduzir a quantidade e os tipos de pesticidas através do desenvolvimento de plantas modificadas por bioengenharia que sejam resistentes às pestes e a organismos causadores de doenças e vírus (Verberne, 2000). Vejamos alguns exemplos: cientistas Nigerianos trabalham num projecto para mapear o genoma da mandioca. A mandioca constitui um alimento base em toda a África. A informação resultante deste projecto ajudará os investigadores a introduzir genes que tornarão a mandioca resistente aos insectos e às doenças (Verberne, 2000). Na Venezuela, cientistas produziram já com sucesso uma planta de arroz transgênica que é resistente ao vírus “hoja blanca”, o qual reduz o rendimento das colheitas a metade. Investigadores em Cornell desenvolveram uma árvore da papaia geneticamente alterada que é resistente ao vírus “mancha em anel”, mortal em papaias cultivadas no solo vulcânico do Hawaii, e apresentaram já uma petição à United States Drug Administration (USDA) para que esta permita a utilização comercial da planta. O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria do solo que produz um composto químico natural tóxico para os insectos. Elevadas quantidades de biopesticidas à base de Bt têm sido usados nos últimos anos mas, devido à sua fraca estabilidade química e elevado custo de produção, estes pesticidas não atingiram a quota de mercado pretendida. Com o intuito de se tentar ultrapassar esta limitação, alguns genes codificando proteínas de Bt foram transferidos para plantas, permitindo assim um aumento *in vivo* da sua resistência a pragas. Em finais do século passado, algumas variedades

de milho produzindo proteínas Bt, designadamente contra a *broca do milho*, começaram a ser testadas em campos experimentais (incluindo Portugal), tendo o primeiro milho transgénico sido comercializado em 1996 após ter recebido autorização das autoridades competentes da UE, EUA, Japão, e Canadá (Nottingham, 1998; Roller e Harlander, 1992). Milho, batatas e plantas do algodão foram já alterados geneticamente para conter o gene Bt (Verberne, 2000). A folhagem das plantas produz a sua própria toxina para manter as pestes afastadas. Quando as plantas são invadidas por agentes patogénicos, produzem grandes quantidades de ácido salicílico, o que leva a uma resistência sistémica adquirida a infecções secundárias por um grande número de agentes patogénicos. Os cloroplastos de uma planta do tabaco foram transformados usando dois genes bacterianos que codificam a produção de ácido salicílico. O fenótipo da planta não foi alterado, mas esta reagiu a infecções bacterianas e virais com uma resistência semelhante à resistência sistémica adquirida em plantas não transgénicas. Outras plantas modificadas geneticamente aprovadas para venda incluem milho resistente a destruidores de cereais, batatas resistentes ao escaravelho, abóboras resistentes a vírus, e feijões de soja resistentes ao herbicida glifosato, vendido comercialmente com o nome Roundup™ (Weinberg, 1996). Este herbicida pode ser usado em campos com colheitas sem matar as plantas de soja.

Amadurecimento retardado e transportabilidade... O transporte dos alimentos constitui um problema importante, especialmente devido às distâncias que estes produtos têm que ser transportados, a flutuações de temperatura durante o acondicionamento e expedição, e a custos de expedição. Para que os alimentos cheguem ao consumidor antes de se deteriorarem, têm de ser colhidos antes de amadurecerem, expedidos, e depois induzidos a amadurecer em armazéns. Bioengenheiros em todo o mundo têm trabalhado para desenvolver plantas cujos produtos atinjam o tamanho desejado mas que amadurecem muito mais lentamente (Unger, 1992). A empresa Calgene desenvolveu um tomate que pode permanecer no campo durante mais tempo para desenvolver mais aroma e textura, e que permanece firme e fresco durante 7 a 10 dias mais do que os outros tomates (Unger, 1992). O tomate Flavr Savr™ foi desenvolvido alterando um gene para a produção da hormona etileno. O gene alterado foi um dos próprios genes do tomate mas introduzido no genoma ao contrário (chamado gene anti-senso). O etileno é um gás que amadurece os frutos. Alterando o gene, o tomate não produz a quantidade normal de etileno e então pode permanecer durante mais tempo no campo. No entanto, problemas com o tomate Flavr Savr™ original (a sua pele era demasiado fina) levaram a que a Calgene o retirasse do mercado até que um tomate de qualidade melhorada pudesse ser desenvolvido (Unger, 1992).

Alergias alimentares... As alergias alimentares estão na base das preocupações quando se avaliam organismos modificados geneticamente.

As alergias podem desenvolver-se em adultos sem qualquer história prévia de alergias. Os alérgenos são proteínas que estimulam uma resposta alérgica. Evitar o alimento é a única forma de prevenir a alergia a esse alimento. Colheitas geneticamente manipuladas podem desenvolver novas proteínas, ou o contexto do padrão genético pode ser alterado de tal forma que os produtos genéticos são misturados de formas novas.

Introdução de novos produtos alimentares... Introduzir novos produtos alimentares numa população pode despoletar o aparecimento de alergias entre os membros da população. Por exemplo, a alergia aos amendoins é relativamente rara em populações Africanas, as quais usaram os amendoins como alimento base durante gerações. No entanto, em populações Europeias a alergia aos amendoins é uma realidade. Alergias alimentares comuns são causadas por amendoins, feijão de soja, trigo, nozes, crustáceos, peixe, leite e ovos. Incorporar genes de alimentos alérgicos como estes pode causar uma reacção alérgica (Weinberg, 1996; Cummins, 1997).

Os nossos receios... Uma das questões mais controversas associada à introdução em plantas de mecanismos de resistência a herbicidas reside na possibilidade de a planta se vir a tornar ela própria daninha, passando a destruir outros cultivares ou plantas nativas. Porém, as características de uma planta daninha são geralmente controladas por mais de um gene, formando no seu conjunto um sistema complexo, o qual torna altamente improvável a possibilidade de a alteração genética (introdução de um gene) num cultivar propiciar a sua propagação incontrolável no ambiente. Mais preocupante, embora meramente no campo das probabilidades, é o risco de o gene que confere a resistência ao herbicida se disseminar através do pólen do cultivar transgénico para plantas que já são daninhas. Apesar de os inúmeros estudos de campo realizados até à data mostrarem que o pólen raramente é transferido a grandes distâncias, tal probabilidade existe, sendo comprovada pela existência de alguns casos históricos conhecidos, relativos a genes transferidos entre organismos, por mecanismos desconhecidos, nos últimos milhões de anos. No entanto, as referidas ocorrências são tão raras que se torna impossível acompanhá-las na escala de tempo de apenas uma, ou algumas, gerações. No caso da planta do milho, não existem mecanismos naturais para a dispersão de sementes, uma vez que estas se encontram retidas no interior de uma espiga; portanto, o risco de transferência de genes entre esta planta e outras é menor que no caso de outras plantas (p.ex. o centeio ou a planta do algodão). Por outro lado, nos EUA, principal produtor mundial de milho, não existem plantas selvagens nativas parentes do milho, pelo que o risco de transferência de genes é ainda menor. Em contrapartida, no México e noutros países da América Central, de onde a planta do milho é originária, existem cultivares selvagens desta planta, pelo que a introdução de milho transgénico nestas regiões é mais arriscada, devendo ser rodeada de grandes cuidados. Novamente

se conclui que, antes de se proceder à cultura sem restrições de plantas transgênicas, devem ser realizadas análises minuciosas dos riscos envolvidos.

3. Aplicações da Biotecnologia em Medicina e Farmacologia

424

Actualmente, a ciência encontra-se no limiar de uma nova era, uma era que irá mudar o mundo. Está a iniciar-se uma nova revolução no conhecimento humano, sendo possível efectuar pesquisas antes impossíveis de imaginar. Os recentes desenvolvimentos na Biotecnologia têm levado à emergência de tecnologias inovadoras usadas na terapêutica. Algumas delas têm repercussões significativas na prevenção, diagnóstico e tratamento de patologias humanas e animais. A terapia celular, a terapia gênica, a engenharia de tecidos e o xenotransplante são exemplos destas tecnologias emergentes, as bases da terapêutica do presente e do futuro próximo. A descoberta da sequência do genoma humano e os avanços da Biologia Molecular contribuem para a rápida identificação e desenvolvimento de produtos que permitem potenciais benefícios clínicos. Alguns bons arquétipos de trabalhos já em andamento são, por exemplo, a detecção automatizada do cancro de mama e lesões intracranianas, as próteses vivas de pele humana, a utilização de vacina viva para combater, controlar e atenuar a SIDA, os biomateriais para fixação de proteínas, e as microesferas biodegradáveis, entre diversas outras pesquisas em desenvolvimento. A produção de compostos farmacêuticos tais como antibióticos, eritropoietina, esteróides, hormonas e vacinas, quer por via enzimática quer por via genética, são outros exemplos simples da aplicação industrial da Biotecnologia no domínio da medicina e da farmacologia.

3.1. Engenharia Enzimática

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza proteica que intervêm em todas as reacções metabólicas energeticamente possíveis, acelerando-as de forma específica. Elas permitem atingir rapidamente o estado de equilíbrio sem modificá-lo, e constituem assim as verdadeiras ferramentas-chave da Biotecnologia e da indústria farmacêutica (Davies, 1989; Tanaka, 1993). As enzimas estão presentes em todas as células vivas onde desempenham uma função vital, controlando os processos catabólicos/anabólicos mediante os quais os nutrientes são convertidos em energia e em novo material celular. Algumas das enzimas mais conhecidas são encontradas no tracto gastrointestinal, onde a pepsina, a tripsina e as peptidases hidrolisam as proteínas em aminoácidos, as lipases hidrolisam as gorduras em glicerol e ácidos gordos livres, e as amilases hidrolisam o amido em açúcares mais simples.

A engenharia enzimática... tem tido um grande desenvolvimento associado às áreas de farmacologia e toxicologia. Os estudos de interacções enzimático-inibidor não só permitiram a identificação de muitos centros activos, mas

tornaram igualmente a produção de medicamentos mais eficaz e de menor custo. O avanço da enzimologia tornou possível o diagnóstico e monitorização de patologias por deficiência (ou, em alguns casos, por excesso) de certas enzimas, e a eliminação (recorrendo-se à administração de enzimas específicas) de produtos tóxicos tais como os radicais livres. Neste contexto, podem citar-se como exemplos, o caso mais usual das enzimas digestivas utilizadas em situações de remoção cirúrgica pancreática ou estomacal, ou a administração de anti-inflamatórios com funções similares às enzimas superóxido dismutase ou catalase, ou ainda a uroquinase e a estreptoquinase, utilizadas principalmente na destruição de coágulos sanguíneos responsáveis por sérias complicações cardiovasculares. Obtém-se, ainda, uma acção fibrinolítica directa utilizando-se a enzima sérica plasmina.

Numa perspectiva de Química Clínica... certas enzimas proteolíticas (proteases) são utilizadas nos testes de identificação e doseamento de fármacos, ou seus metabolitos, em amostras biológicas de tecidos e sangue. A razão desta aplicação baseia-se no facto daqueles compostos se ligarem às proteínas plasmáticas estando, portanto, somente uma pequena fracção livre para ser doseada através de uma análise química directa. O tratamento prévio de uma amostra com enzimas proteolíticas dissolve a proteína do complexo e liberta o fármaco ou o seu metabolito, os quais podem, então, ser facilmente extraídos e analisados (Walsh, 1994).

A nível da indústria farmacêutica... a penicilina, quimicamente um antibiótico β -lactâmico, foi o primeiro antibiótico a ser produzido e comercializado em grande escala. Desde meados dos anos 40 do século passado foram descobertos muitos outros antibióticos com estruturas químicas diferentes, mas as penicilinas ainda são os mais amplamente utilizados (Sousa, 1988). Os antibióticos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) constituem o grupo de antibióticos mais importante, dada a sua eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade para o Homem. Para além do núcleo fundamental das penicilinas e cefalosporinas, pode observar-se ainda a existência de radicais diversos, cuja composição modifica o espectro antibacteriano e pode tornar resistente, ou não, ao succ gástrico ou pode conferir uma farmacocinética diferente. As únicas penicilinas produzidas em grandes quantidades por fermentação são a penicilina G (benzilpenicilina) e a penicilina V (fenoximetilpenicilina), sendo a cadeia lateral do anel β -lactâmico a única diferença entre elas. Em consequência do aparecimento de bactérias mutantes resistentes a estes antibióticos, e com o objectivo de se ampliar os seus espectros de acção, procedeu-se à remoção e/ou substituição das cadeias laterais. As penicilinas semi-sintéticas resultantes, nomeadamente as isoxazolilpenicilinas, têm-se mostrado eficazes principalmente contra as bactérias produtoras de β -lactamases. Para além disso, as novas penicilinas exibem propriedades farmacocinéticas distintas das evidenciadas pelas penicilinas G e V. É o caso da fenitilina e da propicilina,

as primeiras penicilinas semi-sintéticas que apresentam uma melhor absorção oral. O núcleo base da maioria das penicilinas semi-sintéticas é o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Para se obter o 6-APA, a cadeia lateral V pode ser removida da penicilina V através de um processo enzimático, utilizando-se a acilase da penicilina V (Avendaño, 2000; Legoy, 1989; Sousa, 1988). Da mesma forma, a penicilina G pode ser convertida em 6-APA por hidrólise enzimática da cadeia lateral na posição 6-amino, por uma penicilinamidase (Avendaño, 2000). Processos químicos alternativos, mais complexos, para a produção do 6-APA, envolvem a aplicação de solventes, mas, actualmente, a conversão enzimática é, sem dúvida, a técnica mais utilizada. Outro núcleo básico dos β -lactâmicos semi-sintéticos é designado por ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) (Avendaño, 2000; Garrett, 1982; Sousa, 1988). É um intermediário para a produção de um grupo de cefalosporinas semi-sintéticas, dado que é possível a modificação do 7-ACA em C₃ e C₇ e na cadeia lateral acilo. Uma via de produção do 7-ACA é através da modificação química da penicilina V para V-ACA e, posteriormente, hidrolisar este último composto recorrendo-se a uma semicilase. Comparativamente com os métodos químicos convencionais, a solução enzimática é um procedimento mais simples e muito mais barato para a síntese de 7-ACA.

Os aminoácidos... ocupam um lugar importante na química de síntese. As sínteses assimétricas permitem seleccionar a sua estereoquímica e têm sido objecto de trabalhos de pesquisa no plano industrial como, por exemplo, a obtenção de D-L-metionina e de L-Dopa. As fontes tradicionais de aminoácidos, como a extracção a partir de elementos protéicos, estão a ser suplantados pelas técnicas de fermentação. Resta à química de síntese uma possibilidade de ganhar o terreno perdido que consiste em explorar a bioconversão de substratos obtidos em massa a baixo preço e valorizados graças à utilização das reacções enzimáticas em contínuo, com o uso de enzimas imobilizadas capazes de biotransformar esses substratos (Davies, 1989; Tanaka, 1993). A especificidade das enzimas e a sua capacidade de catalisar, à temperatura ambiente e pressão atmosférica, reacções que exigiriam uma elevada energia de activação, explicam o desenvolvimento recente de investigações com vista à aplicação na indústria farmacêutica. A utilização de enzimas na síntese de aminoácidos é particularmente interessante, designadamente para aminoácidos que são difíceis de produzir por fermentação (L-alanina) ou para aminoácidos racémicos (L-fenilalanina, L-metionina, L-valina, L-triptofano) produzidos por síntese com o objectivo de se obter, através da enzima aminoacilase, o L-aminoácido opticamente puro (a forma natural e fisiologicamente activa dos aminoácidos com interesse em medicina e na alimentação).

Os esteróides... são compostos que contam na sua constituição uma estrutura de quatro anéis, o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno.

Compreende esta estrutura, além dos corticosteróides, o colesterol, os estrogéneos, a testosterona, os ácidos biliares e ainda substâncias vegetais como os glicosídeos digitálicos e a diosgenina. São várias as enzimas necessárias na biossíntese dos corticosteróides (Avendaño, 2000; Garrett, 1982). A sua deficiência, tanto de origem congénita como adquirida tem, como seria de prever, consequências importantes. Uma vez descrita a constituição dos corticosteróides naturais, a investigação farmacológica sobretudo ligada à grande indústria lançou-se no estudo sistemático de modificações dos corticosteróides de forma a produzir análogos sintéticos. Sintetizaram-se centenas de compostos, o que permitiu um bom estudo da relação estrutura-acção terapêutica. Destes compostos apenas cerca de uma dúzia têm interesse simultaneamente terapêutico e económico, referenciando-se principalmente a cortisona, um potente anti-inflamatório utilizado na terapêutica da artrite reumatóide, para além de poder ser usada como terapêutica substitutiva em patologia endócrina, ou como fármaco estimulador da maturação pulmonar fetal, ou ainda em diversos estados alérgicos. A síntese química da cortisona exige numerosas e complexas etapas coordenadas. Contudo, através de sistemas enzimáticos, alguns dos quais presentes em certos microorganismos, pode substituir-se vantajosamente esses métodos químicos e, por vezes, realizar o processo num só passo. De facto, a cortisona pode ser obtida quimicamente em trinta e sete etapas a partir do ácido desoxicólico. São necessários 635 g deste ácido biliar para se obter 1 g de cortisona com um rendimento de 0.16%. O microorganismo *Rhizopus arrhizus* pode converter a progesterona (esteróide fabricado a partir da diosgenina, extraída de uma Dioscoreácea existente no México), em 11- α -hidroxiprogesterona, um precursor da cortisona (Roberts, 1998). Com a descoberta deste catalisador microbiológico, foi possível o desenvolvimento de uma nova tecnologia que ganhou maior relevo devido à relação de proporcionalidade inversa estabelecida entre o preço de venda dos produtos e a sua produtividade.

O problema da estabilidade enzimática do ponto de vista estrutural...

adquire uma proeminência especial quando os complexos enzimáticos (tais como as proteínas multiméricas) são utilizados, dado que estas proteínas são constituídas por diversas subunidades que devem estar adequadamente juntas para exibirem uma determinada actividade catalítica. A estabilização funcional e estrutural de enzimas multiméricas tem, por conseguinte, um grande interesse em muitas situações, especialmente na prevenção da inactivação enzimática resultante da dissociação das subunidades. Este facto toma uma relevância significativa no caso das enzimas utilizadas em aplicações biomédicas, onde a libertação de subunidades pode promover não só a inactivação enzimática mas também o desenvolvimento de reacções alérgicas indesejáveis. A L-asparaginase é uma enzima tetramérica que hidrolisa a L-asparagina em ácido L-aspártico e amónia, uma reacção que, em condições fisiológicas, é essencialmente irreversível. Esta enzima é, de

um ponto de vista clínico, amplamente utilizada como agente anti-tumoral no tratamento da leucemia aguda e do linfossarcoma. A L-asparaginase é, igualmente, eficaz contra neoplasias que consomem a asparagina existente nas reservas plasmáticas circulantes, provavelmente em consequência da diminuição da expressão da asparagina sintetase por parte das células cancerígenas. A actual terapia recorre à administração endovenosa da enzima solúvel, mas é eficaz somente em certo grau devido a duas principais deficiências: a L-asparaginase possui um tempo de semivida curto dentro do corpo humano (devido à acção do sistema imunitário) e a sua hidrólise desencadeia efeitos laterais imunológicos adversos, como resultado da presença de uma proteína alienígena no interior do corpo humano. A gravidade destas respostas pode classificar-se desde uma reacção alérgica média até ao choque anafilático. Estudos efectuados por Balcão *et al.* (2001b) basearam-se no desenvolvimento de estratégias que permitissem a estabilização da estrutura quaternária da L-asparaginase através da imobilização da enzima em suportes de agarose altamente activados, seguido do intercruzamento inter-subunidades em fase sólida (por ligações covalentes cruzadas) com polialdeídos obtidos de dextranos de elevado peso molecular. Tais derivados tinham como objectivo uma possível utilização em dispositivos extracorporais para o tratamento da leucemia. Estes permitem a eliminação da asparagina plasmática, exibindo claramente duas vantagens: por um lado, a estabilização estrutural impede a libertação das subunidades da enzima na corrente sanguínea, com a subsequente diminuição das reacções alérgicas e, por outro lado, a estabilização funcional aumenta o tempo útil do dispositivo extracorporal, diminuindo desta forma os custos operacionais. No contexto da co-imobilização, estão igualmente descritos na literatura (Balcão *et al.*, 2001c) trabalhos efectuados com a glutamato desidrogenase, uma enzima que catalisa a desaminação oxidativa reversível do glutamato em amónia e α -cetoglutarato. A regulação enzimática do glutamato possui uma importância única a nível cerebral, uma vez que aquele composto é um potente neurotransmissor.

3.2. Engenharia Genética

A engenharia genética inclui a análise, produção e aplicação de organismos geneticamente modificados, oferecendo novas possibilidades para a produção industrial de enzimas ou proteínas terapêuticas, para a produção transgénica de plantas e animais e constitui ainda um novo meio de intervenção contra a doença.

A revolução pela qual a Biotecnologia passou na última década com o crescente desenvolvimento da tecnologia genética, causou um grande impacto na indústria farmacêutica. A tecnologia dos genes permite a manipulação destes como entidades bioquímicas, possibilitando a introdução de segmentos de ADN específicos em organismos procariotas ou eucariotas

e correspondente replicação, ou seja, possibilitando a clonagem a genes. A engenharia genética e a experiência adquirida com quatro tipos de microorganismos, nomeadamente *Bacillus* e *Escherichia* (bactérias), *Aspergillus* (fungo) e *Saccharomyces* (levedura), mudaram significativamente a natureza de produção de proteínas, com ou sem actividade catalítica. Estes microorganismos estão bem estudados e ficou, desde há muito, comprovado que são de manipulação segura, de crescimento rápido e com elevada capacidade de produção de proteínas com altos rendimentos, frequentemente expelindo-as no meio de fermentação. Uma vantagem adicional daqueles microorganismos reside no facto de que o meio em que crescem já é bem conhecido, o que diminui a necessidade de se realizar dispendiosas experiências com a finalidade de se otimizar as condições de fermentação. Desta forma, torna-se à partida possível a produção de proteínas com interesse terapêutico, transferindo-se para tal o material do código genético da sua estrutura para um dos microorganismos hospedeiros adequados.

Para levar a cabo estes procedimentos de clonagem é necessário que, em primeiro lugar, a sequência de ADN a clonar esteja disponível, recorrendo-se a endonucleases de restrição para se proceder ao corte específico e ao subsequente isolamento do ADN para clonagem. Em segundo lugar, a sequência de ADN tem de ser incorporada, através de enzimas de restrição, num vector, designadamente num plasmídeo ou fago. Finalmente, o vector escolhido com o ADN inserido terá de ser introduzido por transformação numa célula hospedeira, onde o vector consiga replicar o "material inserido" de uma forma estável. O uso crescente da tecnologia de cultivo de células animais culminou no desenvolvimento e comercialização com sucesso de uma variedade de agentes terapêuticos para uso em seres humanos. Por forma a poder utilizar culturas celulares para produzir grandes quantidades de um produto, o processo inicia-se com uma pequena quantidade de "células trabalhadoras", as chamadas culturas de arranque, as quais são utilizadas para inocular algumas centenas de mililitros de meio. Após o seu crescimento, esta cultura de arranque à escala laboratorial é utilizada para inocular o biorreactor à escala de produção, o qual contém normalmente vários milhares de litros de meio. Algumas empresas estão a utilizar a tecnologia de cultura de células para produzir anticorpos monoclonais. Estes anticorpos podem ser usados em procedimentos de diagnóstico ou no tratamento de doenças. Uma empresa de Biotecnologia sediada na Califórnia, a Immunex, utiliza células dos ovários de ratos Chineses para produzir um tratamento para a artrite reumatóide, de nome comercial Enbrel™. Existem mais de nove medicamentos à base de anticorpos monoclonais aprovados para comercialização hoje em dia. Estes incluem a Herceptin™ (comercializado pela Roche e pela Genentech Inc.) para o tratamento do cancro da mama, o Rituxan™ (Genentech Inc. e Idec Pharmaceuticals Corporation) para o tratamento do linfoma, e o Remicade™ (Johnson & Johnson) para o

tratamento da doença de Crohn e da artrite reumatóide. Existem, no entanto, mais de 70 fármacos baseados em anticorpos monoclonais em testes clínicos. Estão ainda em desenvolvimento anticorpos para a asma, a psoríase, deterioração da visão, infecções bacterianas, ataques cardíacos e rejeição de órgãos transplantados. As novas técnicas de produção de anticorpos incluem o desenvolvimento de ratos alterados geneticamente que podem produzir anticorpos completamente humanos, e a utilização de técnicas fágicas. Os genes humanos do anticorpo são inseridos no fago, que os exhibe na sua superfície. Cada fago produz um anticorpo diferente. A utilização de tecido regenerado para substituir estruturas doentes ou danificadas tornou-se uma possibilidade com a tecnologia da célula-pluripotencial. O tecido da córnea pode ser crescido em placas de laboratório e transplantado com sucesso para os olhos danificados de alguns pacientes. Este procedimento usa as células-pluripotenciais da córnea para reabastecer células gastas. A utilização de tecnologia de ADN recombinante tornou possível a produção de substâncias em quantidades apreciáveis, como por exemplo o caso de insulina para o tratamento da *Diabetes Mellitus*, ou o interferon α -2b indicado para o aumento da resposta imunitária, no tratamento de doentes com tricoleucemia, leucemia mielóide crónica, hepatite B crónica ou Sarcoma de Kaposi associado à SIDA, entre outras situações de carcinoma e condiloma (Garrett, 1982). Também foram desenvolvidas por esta técnica vacinas, hormona de crescimento e anticorpos monoclonais. O tratamento da diabetes era feito normalmente com insulina suína ou bovina. No entanto, verificou-se que um grande número de doentes não tolerava a hormona sintetizada por estes animais e desenvolviam graves problemas alérgicos. Para eles, a única alternativa residia no uso de insulina sintetizada via engenharia genética. Em 1982, o gene que produz a insulina humana foi isolado e transferido para uma bactéria, a *Escherichia coli*. Enquanto essas bactérias crescem e vivem em tanques de fermentação, elas produzem a proteína insulina que é, então, isolada e purificada para o tratamento da diabetes. Desta forma, este processo de tecnologia recombinante de ADN permite combinar características únicas de células tão diferentes como uma célula bacteriana e uma célula humana. Um outro exemplo de projecto que visa a produção microbiana de biomoléculas de elevado valor acrescentado com aplicação nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica, prende-se com a produção de carotenóides, antioxidantes naturais apontados como estando envolvidos na prevenção de doenças cardiovasculares e tumorais. Os carotenóides são actualmente produzidos por via química ou extraídos de plantas ou algas. O conhecimento do material genético levou os investigadores a procurarem saber se ele podia ser alterado, de modo a constituir um novo meio de intervenção contra a doença. É possível que, entre as várias estratégias em investigação, a terapêutica génica (Stollerman, 2001) seja a de maior relevo e a mais fácil de compreender. A ideia fundamental consiste em administrar um gene funcional, de modo a fornecer a determinadas células alvo uma nova capacidade para produzirem proteínas.

Em determinadas situações, esta capacidade deveria estar presente, mas ou não existe ou tem um defeito, e noutras situações não existe em condições normais. No primeiro caso, o tratamento dirige-se a doenças monogénicas ou Mendelianas; no segundo, torna-se aplicável sobretudo a doenças adquiridas, onde se incluem as doenças cardíacas e cancerígenas, situações em que, em última análise, a terapêutica génica tem um maior impacto na saúde pública. Independentemente da situação, o sucesso terapêutico avalia-se através do desempenho do gene adicionado. Os maiores problemas residem na entrega do gene no seu destino correcto e em mantê-lo em função durante um período útil, produzindo quantidades suficientes da proteína desejada. Os primeiros estudos incidiram sobre a deficiência na enzima adenosina desaminase (ADA), uma situação rara de transmissão autossómica recessiva, em que a inexistência no organismo de uma determinada enzima tem efeitos particularmente nocivos a nível do sistema imunitário. A ausência de ADA provoca a morte prematura dos linfócitos T, conduzindo a uma situação de imunodeficiência. Investigadores do National Institute of Health (Estados Unidos) transferiram um gene normal da ADA para os linfócitos de uma criança que nasceu com a doença. Em ensaios clínicos posteriores, o gene foi transferido para células da medula óssea. Ambas as estratégias utilizaram uma manipulação *ex vivo* – isolaram-se as células de um doente, expuseram-se essas células a um retrovírus que transportava o gene terapêutico e, posteriormente, reintroduziram-se as células no doente. As várias experiências realizadas proporcionaram nítida evidência que esta técnica era praticável e segura, apesar de não terem sido avaliados os benefícios clínicos. Em geral, as mutações que alteram a actividade de uma determinada enzima podem conduzir à acumulação de substratos tóxicos ou à redução de compostos vitais à manutenção e à vida celular. É sabido que as mutações em genes que codificam para proteínas estruturais estão na base de anomalias da arquitectura tecidual. Contudo, como já se disse, estas deficiências são passíveis de correcção pela terapia génica, que consiste, basicamente, na introdução no organismo do gene não mutado para a produção da enzima funcionalmente activa, ou alternativamente, substituir a base mutada pela base normal, de modo a evitar a produção de proteínas funcionalmente deficientes ou tóxicas para as células e/ou tecidos. Um outro exemplo de sucesso desta terapia é o tratamento de doentes homocigóticos com hipercolesterolemia familiar, situação patológica caracterizada pela ausência de receptores hepáticos para as lipoproteínas de baixa densidade (LDL - Low Density Lipoproteins) e, conseqüentemente, pela acumulação de colesterol na corrente sanguínea. Neste caso, cerca de 15% do fígado de um doente foi removido, os hepatócitos isolados e transfectados com o gene do receptor das LDLs e, subseqüentemente, reintroduzidos no fígado do doente. Verificou-se uma melhoria na condição geral do doente, com uma diminuição do perigo de rejeição imunológica, por se recorrer à utilização de células autólogas do próprio doente. Para além da hipercolesterolemia familiar,

outras patologias resultantes de deficiências monogénicas (como a doença de Gaucher, a hemofilia B, a fibrose quística, entre outras) ou multi-génicas adquiridas (carcinoma, rectal, melanomas e o cancro colo-rectal) têm igualmente sido objecto de ensaios clínicos recorrendo à terapia génica (Simões, 1999). Apesar de existirem, certamente, aplicações para a terapêutica génica *ex vivo*, a tendência mais recente tem consistido na utilização de métodos *in vivo*. A grande vantagem deste tipo de estratégia reside no facto de não exigir a infra-estrutura elaborada e as técnicas especiais necessárias para a remoção, manipulação e restituição das células ao doente. Em vez disso, o gene terapêutico é simplesmente administrado através de um processo muito semelhante ao utilizado com os fármacos; a captação do gene/reagente por parte das células-alvo condiciona o sucesso desta via de administração de produtos génicos, bem como o transporte do produto na sua forma não degradada. Uma das primeiras tentativas levada a cabo em muitos centros de investigação, consistiu na entrega do CFTR (gene dos canais dos cloretos) às vias aéreas de doentes com fibrose quística, uma doença autossómica recessiva que tem origem numa mutação do CFTR. Apesar de ficar demonstrado, mais uma vez, que esta terapêutica génica era praticável e segura, o nível de expressão do gene foi de curta duração e o benefício terapêutico não foi evidente. Se fosse possível entregar a proteína não seria necessário utilizar o gene. Na maioria das situações, o problema reside no facto de não ser possível colocar a proteína onde é necessário. Por exemplo, é óbvio que a insulina injectada não consegue controlar a glicemia suficientemente bem de modo a evitar todas as crises diabéticas. Como não é possível fazer uma entrega satisfatória da proteína necessária, procuramos como alternativa entregar o gene. As próprias células produzirão depois a proteína e controlá-la-ão. Na actual fase do desenvolvimento da terapêutica génica, ainda se tem que obter o controlo fisiológico da expressão génica. No outro grande tipo de terapêutica génica, pretende-se que o gene entregue tenha uma função que normalmente não teria – por exemplo, destruição de células tumorais através de processos originais. Actualmente, a pesquisa na área desta última estratégia assume um papel predominante. Por um lado devido ao facto de que, de uma maneira geral, as terapêuticas convencionais não são, muitas vezes, efectivas na obtenção da cura e porque uma expressão do gene de curta duração não constitui qualquer inconveniente. Na substituição do gene, pelo contrário, é necessário que a terapêutica tenha uma duração significativa. Outra importante vantagem é que o objectivo consiste em destruir células tumorais, logo, desde que a proteína que o gene expressa conduza à morte da célula cancerosa sem sacrificar indiscriminadamente outras células, um investigador pode seleccionar qualquer gene e não unicamente os que se sabe que estão associados ao cancro. A maioria das estratégias sob investigação são de carácter imunológico (genes das citoquinas, os das células estimuladoras, como a B7, entre outros exemplos). Uma estratégia anti-tumoral que praticamente não se

baseia na biologia natural do tumor denomina-se terapêutica génica suicida. Nesta terapia tenta-se que o próprio tumor seja induzido a produzir um fármaco (por exemplo, a timidina quinase), activado unicamente nestas células, ficando estas expostas a doses elevadas e prolongadas desse fármaco, o que eventualmente culminará na eliminação da massa tumoral. A Biotecnologia será ainda muito útil na área da manipulação genética do RNA (ácido ribonucléico), de forma a torná-lo apto à destruição de vírus, e no combate às doenças hereditárias.

REFERÊNCIAS

Avendaño. Introducción a la Química Farmacéutica. McGraw-Hill, 2000.

Balcão, V. M., Macedo, A. C., Malcata, F. X., Utilização de enzimas como ferramentas na Biotecnologia alimentar (comunicação oral convidada), II Jornadas de Engenharia Biotecnológica, Bragança, Portugal, 8 a 9 de Maio de 2001a.

Balcão, V. M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Malcata, F. X., Guisán, J. M. (2001b) Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multi-subunit immobilization onto highly activated supports, *Biotechnology Progress*, Vol. 17, pp.537-542.

Balcão, V. M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Malcata, F. X., Guisán, J. M. (2001c) Coimmobilization of L-asparaginase and glutamate dehydrogenase onto highly activated supports, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 28, pp. 696-704.

Balcão, V. M., Malcata, F. X., (2001) Enzyme-mediated modification of milkfat. In T. M. Kuo (Ed.) *Lipid Biotechnology*, Marcel Dekker [no prelo].

Balcão, V. M., Malcata, F. X. (1997) Lipase-catalyzed modification of butterfat via acidolysis with oleic acid, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 3, nº 1-4, pp. 161-169.

Balcão, V. M., Malcata, F. X. (1998a) Lipase catalyzed modification of milkfat, *Biotechnology Advances*, Vol. 16, pp. 309-341.

Balcão, V. M., Malcata, F. X. (1998b) Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes in the pool of fatty acid residues, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 22, pp. 511-519.

Balcão, V. M., Kemppinen, A., Malcata, F. X., Kalo, P. (1998a) Lipase-catalyzed acidolysis of butterfat with oleic acid: characterization of process and product, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 23, pp. 118-128.

Balcão, V. M., Kemppinen, A., Malcata, F. X., Kalo, P. (1998b) Modification of butterfat by selective hydrolysis and interesterification by lipase: process and product characterization, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 75, pp. 1347-1358.

Cummins, J. (1997) Gene tinkering blues, *Science* 2.

Davies, H. G., Green, R. H., Kelly, D. R., Roberts, S. M. *Biotransformations in preparative organic chemistry. The use of isolated enzymes and whole-cell systems in synthesis.* Academic Press, London, 1989.

Garrett J., Osswald, W. *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. – Manual de farmacologia e farmacoterapia.* Porto Editora, 1982.

Stollerman, G. H. *Hospital Practice - Perspectivas da Terapêutica Génica.* Medfarma, Edições médicas, Lda., 2001.

Legoy, M. D. *Applications des Biotechnologies en chimie fine, pharmacology et cosmétologie.* Centre National d'Enseignement a distance de Rennes, 1989.

Nottingham S. *Eat your genes.* Zed Books, London, 1998.

Roberts, S. M., Turner, N. J., Willets, A. J., Turner, M. K. Introduction to Biocatalysis using enzymes and microorganisms. Cambridge Univ. Press, NY, 1995.

Roller S., Hartlander S. Genetic Modification in the Food Industry. Chapman & Hall, London, 1992.

Schmidt-Kastner, G., Egere, P. Biotechnology. Verlag Chemie weinheim, 1984.

Simões S. (1999) Current opinion in molecular therapeutics, *Science* **1**, pp.147-157.

Sousa, J. C. F., Prista, L. V. N. Antibióticos Inibidores da Biossíntese do Peptidoglicano. Ordem dos Farmacêuticos, 1988.

Svenning, R., Stenberg, E., Gildberg, A., Nilsen, K. (1993) Biotechnological descaling of fish, *INFOFISH INTERNATIONAL* **6**, pp. 30-31.

Tanaka, A. Tosa, T., Kobayashi, T. Industrial Applications of immobilized Biocatalysts. Marcel Dekker, Inc., 1993.

434 Tangley, L. (2000) Engineering the harvest, *U.S. News and World Report*, March 13, pp. 46-47.

Unger, M. (1992) In the age of gene-altered foods... watch your peas and cukes, *Newsday* (Long Island, NY), July 26, p. 5.

Verberne, M. C. (2000) Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance, *Nature Biotechnology* **18**, pp. 779-783.

Walsh, Gary and Headon. Protein Biotechnology. John Wiley & Sons, 1994.

Weinberg, L. (1996) Biotechnology and genetically engineered foods: the future is now, *Environmental Nutrition*, Oct., pp. 9-12.