



**Nayara Araújo Cardoso
Renan Rhonalty Rocha
Maria Vitória Laurindo
(Organizadores)**

**As Ciências Biológicas e da
Saúde na Contemporaneidade 2**

Atena
Editora
Ano 2019

Nayara Araújo Cardoso
Renan Rhonaly Rocha
Maria Vitória Laurindo
(Organizadores)

As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade 2

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Natália Sandrini e Lorena Prestes

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

C569 As ciências biológicas e da saúde na contemporaneidade 2 [recurso eletrônico] / Organizadores Nayara Araújo Cardoso, Renan Rhonalty Rocha, Maria Vitória Laurindo. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. – (As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade; v. 2)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-216-6

DOI 10.22533/at.ed.166192803

1. Ciências biológicas. 2. Biologia – Pesquisa – Brasil. 3. Saúde – Brasil. I. Cardoso, Nayara Araújo. II. Rocha, Renan Rhonalty. III. Laurindo, Maria Vitória. IV. Série.

CDD 574

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

APRESENTAÇÃO

A obra “As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade” consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora, em seus 22 capítulos do volume II, apresenta a importância do desenvolvimento de novas pesquisas nos âmbitos da saúde e da natureza e ainda a relevância da busca de novas terapias para o tratamento de variadas patologias.

O desenvolvimento de pesquisas no campo da saúde representa uma ferramenta importante para a busca de novas estratégias para o diagnóstico, acompanhamento do curso e tratamento de doenças. É na área da saúde que a biotecnologia encontra algumas de suas aplicações mais benéficas e abrangentes. Por meio de diferentes vertentes biotecnológicas, como a produção e atuação de organismos geneticamente modificados; a engenharia genética, que permite qualquer tipo de alteração em nível de DNA e experimentos empregando espécies vegetais e/ou compostos isolados para o desenvolvimento de terapias alternativas e aprimoramento das terapias convencionais.

Atualmente a busca por novos compostos com atividade terapêutica é feita majoritariamente através da experimentação de produtos naturais, uma vez que muitos destes têm comprovadas cientificamente suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antineoplásicas, analgésicas, entre outras.

Desse modo, este volume II apresenta artigos que tratam: das propriedades antioxidantes de espécies vegetais como o alecrim e o chá verde; estudos microbiológicos e de toxicidade de espécies vegetais e animais; caracterização de ácidos nucleicos e proteínas; emprego da engenharia genética para elucidação de mecanismos de ação e desenvolvimento e experimentação de alimentos funcionais. Assim, esta obra é dedicada aos pesquisadores da área de saúde, que buscam reciclar seus conhecimentos por meio de pesquisas relevantes e se atualizar perante às novas tecnologias e descobertas científicas e biotecnológicas aplicadas às áreas da saúde.

Portanto, esperamos que este livro possa estimular outros estudantes e profissionais de saúde ao desenvolvimento de pesquisas e estudos a fim de incorporar à literatura referências atualizadas e possibilitar a aplicabilidade dos resultados dessas pesquisas às práticas profissionais diárias.

Nayara Araújo Cardoso
Renan Rhonalty Rocha
Maria Vitória Laurindo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
A BIOLOGIA SINTÉTICA E ENGENHARIA METABÓLICA PARA DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÕES EM BIOTECNOLOGIA	
Mauricio Schiavo Gabriel Dall'Alba Mauricio Moura da Silveira Sergio Echeverrigaray	
DOI 10.22533/at.ed.1661928031	
CAPÍTULO 2	18
A CONSTRUÇÃO DE MODELOS DIDÁTICOS DA ESTRUTURA DO DNA COM MATERIAIS ALTERNATIVOS: CRIANDO E APRENDENDO	
Maria da Conceição dos Reis Leal João Gabriel Rangel Gonçalves	
DOI 10.22533/at.ed.1661928032	
CAPÍTULO 3	28
ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.): EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA NO CONTROLE DA DOENÇA MANCHA FOLIAR EM PLANTAS DE CEVADA	
Fernando Luquis Brenda Mery Santos de Godoy Cristiane Santana Garcia Victor Alves Franklin Luciana Leite Oliveira Nilsa Sumie Yamashita Wadt Vinicius de Oliveira Cardoso Erna Elisabeth Bach	
DOI 10.22533/at.ed.1661928033	
CAPÍTULO 4	37
ALELOPATIA DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Eragrostis lugens</i> Nees. NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE <i>Oryza sativa</i> L	
Daniela Sponchiado Jéssica Cezar Cassol Douglas de Lima Righi Lucas Menezes Jorge Eduarda Mena Barreto Juçara Terezinha Paranhos	
DOI 10.22533/at.ed.1661928034	

CAPÍTULO 5 45

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE *COMBRETUM LEPROSUM MART.*: TESTE *ALLIUM CEPA*

Raidan Costa Rodrigues
Valéria Moura de Carvalho
Jadielson da Silva Santos
Brenda Lois Barros dos Santos
Andressa Jordanne Pereira Ramos
Cairo Hilbert Santos de Melo
Juliane Moreira Ramos
Elizângela de Carvalho Nunes
Sâmya Katya Barros Guimarães
Wanderson Ferreira Martins
Adão Correia Maia
Kelly Maria Rêgo da Silva
Mateus Sávio Amorim
Antonio Lima Braga

DOI 10.22533/at.ed.1661928035

CAPÍTULO 6 50

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) E CHÁ VERDE (*CARMELLIA SINENSIS*) EM LINGUIÇAS FRESCAL BOVINA

Thaís Cidarta Melo Barbosa
Juliana Nobrega Clemente
Karina da Silva Chaves
Sthelio Braga da Fonseca
Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles

DOI 10.22533/at.ed.1661928036

CAPÍTULO 7 61

AVALIAÇÃO DO USO DE AÇÚCAR NA TERAPIA TÓPICA DE FERIDAS

Ingrid dos Santos Farias
Emanuelle Karine Frota Batista
Hebelys Ibiapina da Trindade
Janayna Batista Barbosa de Sousa Muller
Maria José Lima Nascimento
Evanita da Rocha Luz
Maria do Carmo de Souza Batista

DOI 10.22533/at.ed.1661928037

CAPÍTULO 8 71

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA VITAMINA C SOBRE A DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM A CEPA QM2 DE *Trypanosoma cruzi*

Patrícia Milani de Moraes
Bruna de Lima Pereira
Ludmyla Toller Cocco
Luciamare Perinetti Alves Martins

DOI 10.22533/at.ed.1661928038

CAPÍTULO 9	84
AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA NO MODELO EXPERIMENTAL DE HEPATECTOMIA A 70%	
Luz Marina Gonçalves de Araujo Oliveira Pedro Luiz Squilacci Leme Maria Cristina Chavantes	
DOI 10.22533/at.ed.1661928039	
CAPÍTULO 10	94
BIOTECNOLOGIA NO CONTROLE DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE ARBOVIROSES: BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA EM MOSQUITOS ADULTOS	
Fabíola da Cruz Nunes Louise Helena Guimarães de Oliveira Patrícia Alexandria Paiva Silva de Sousa Hyago Luiz Rique	
DOI 10.22533/at.ed.16619280310	
CAPÍTULO 11	103
COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL NUTRACÊUTICO DO FRUTO DE BURITI (<i>Mauritia flexuosa</i> L) NA TERAPIA COADJUVANTE EM PORTADORES DE DISLIPIDEMIA	
Joilane Alves Pereira-Freire Vivianne Rodrigues Amorim Fernanda Maria de Carvalho Ribeiro Stella Regina Arcanjo Medeiros Jurandy do Nascimento Silva Paulo Michel Pinheiro Ferreira	
DOI 10.22533/at.ed.16619280311	
CAPÍTULO 12	116
DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO PARA IMOBILIZAÇÃO DE <i>Chlorella vulgaris</i>	
Felipe de Albuquerque Santos Eduardo Bittencourt Sydney Alessandra Cristine Novak Sydney	
DOI 10.22533/at.ed.16619280312	
CAPÍTULO 13	127
DESENVOLVIMENTO DE PÃO DE FORMA CONTENDO FARINHA MISTA DE MARACUJÁ E JABUTICABA	
Jamilly Salustiano Ferreira Constantino Julice Dutra Lopes	
DOI 10.22533/at.ed.16619280313	
CAPÍTULO 14	143
DETERMINAÇÃO DO EHL (EQUILÍBRIO-HIDROFÍLICO LIPOFÍLICO) DO ÓLEO DE ABACATE	
Laíssa Aparecida Praxedes dos Reis Alessandra Cristine Novak Sydney	
DOI 10.22533/at.ed.16619280314	

CAPÍTULO 15 150

ESTUDO DA TOXICIDADE DE *Combretum leprosum* Mart.: TESTE *ALLIUM CEPA*

Valéria Moura de Carvalho
Raidan Costa Rodrigues
Kelly Maria Rêgo da Silva
Elizângela de Carvalho Nunes
Sâmya Katya Barros Guimarães
Brenda Lois Barros dos Santos
Cairo Hilbert Santos de Melo
Juliane Moreira Ramos
Wanderson Ferreira Martins
Gabrielle Costa Bento Campos
Adão Correia Maia
Antonio Lima Braga
Jadielson dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.16619280315

CAPÍTULO 16 155

ESTUDO E MODELAGEM CINÉTICA HETEROGÊNEA DA REAÇÃO DE CETALIZAÇÃO DO GLICEROL COM ACETONA UTILIZANDO ZEÓLITAS DO TIPO H-BEA E H-FER COMO CATALISADORES

Vinicius Rossa
Gisel Chenard Díaz
Yordanka Reyes Cruz
Sibele Berenice Castellã Pergher
Donato Alexandre Gomes Aranda

DOI 10.22533/at.ed.16619280316

CAPÍTULO 17 171

ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS DAS FOLHAS DA *Eugenia uniflora* Linn. (PITANGA)

Giovanna Gabrielly Alves da Silva Fraga
Maria Gabrielle de Oliveira Tabosa
Emilay Lira de Freitas
Leticia Vieira dos Santos Beserra
Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo
Risonildo Pereira Cordeiro

DOI 10.22533/at.ed.16619280317

CAPÍTULO 18 177

NEW PROCESS FOR OBTAINING NANOCHITOSAN / BURITI OIL (*Mauritia flexuosa*) BIOCOMPOSITE: A BIOMATERIAL FOR REGENERATIVE MEDICINE AND TISSUE ENGINEERING

Júlia Silveira Broquá
Luciano Pighinelli
Magda Comoretto Gall
Jader Figueiredo
Giovani André Piva
Lucas Eduardo Lopes
Machado, Pamela Persson
Anderson Rockenbach
Renata Pospichil
Luan Rios Paz
Fernando Guimarães
Gabrielle Zanin
Marzena Kmiec Pighinelli

DOI 10.22533/at.ed.16619280318

CAPÍTULO 19 192

PORPHYROMONAS GINGIVALIS NA PERIODONTITE: POR QUE ESTUDAR SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA COM FERRAMENTAS *IN SILICO*?

Ellen Karla Nobre dos Santos-Lima
Larissa de Mattos Oliveira
Michelle Miranda Lopes Falcão
Manoelito Coelho dos Santos Junior
Márcia Tosta Xavier
Soraya Castro Trindade

DOI 10.22533/at.ed.16619280319

CAPÍTULO 20 211

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis* A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA [*Prosopis juliflora* (SW) DC] COMO SUBSTRATO NÃO CONVENCIONAL

Adrielly Silva Albuquerque de Andrade
Emanuele Cardoso Dias
Napoleão José de Oliveira Neto
Graciana Clécia Dantas
Adna Cristina Barbosa de Sousa
Andréa Farias de Almeida

DOI 10.22533/at.ed.16619280320

CAPÍTULO 21 224

SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES NUTRACÊUTICOS ATENUA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS CARACTERÍSTICOS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Ana Olívia Martins Laurentino
Naiana da Rosa
Tamires Mateus Gomes
Eduardo de Medeiros Peretti
Fabiana Durante de Medeiros
Jucélia Jeremias Fortunato

DOI 10.22533/at.ed.16619280321

CAPÍTULO 22 231

USO DO EXTRATO DE *Ganoderma lucidum* NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR EM PLANTAS DE CEVADA PROTEGENDO O MEIO AMBIENTE

Ricardo Zanirato da Costa Fernandes
Lorena de Cássia Barboza Pires
Jessica Pojato da Silva
Joseanne Meira Cambuí
Edgar Matias Bach Hi
Vinicius de Oliveira Cardoso
Erna Elisabeth Bach

DOI 10.22533/at.ed.16619280322

SOBRE OS ORGANIZADORES..... 239

A BIOLOGIA SINTÉTICA E ENGENHARIA METABÓLICA PARA DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÕES EM BIOTECNOLOGIA

Mauricio Schiavo

Fundação Universidade de Caxias do Sul,
Laboratório de biotecnologia e microbiologia
aplicada, Caxias do Sul - Rio Grande do Sul

Gabriel Dall’Alba

Fundação Universidade de Caxias do Sul, Núcleo
de Pesquisa em Bioinformática, Caxias do Sul -
Rio Grande do Sul

Mauricio Moura da Silveira

Fundação Universidade de Caxias do Sul,
Laboratório de bioprocessos, Caxias do Sul - Rio
Grande do Sul

Sergio Echeverrigaray

Fundação Universidade de Caxias do Sul,
Laboratório de biotecnologia e microbiologia
aplicada, Caxias do Sul - Rio Grande do Sul

RESUMO: Os avanços na biologia molecular, bioinformática, biologia de sistemas e no estudo de genômica, proteômica e metabolômica levaram ao desenvolvimento de duas áreas tecnológicas com potencial para revolucionar a biotecnologia como um todo. Ambas as áreas, a biologia sintética e a engenharia metabólica vem sendo desenvolvidas e aplicadas para solução de diversos problemas, alguns exemplos sendo: na redução dos custos de produção de compostos químicos de maior valor agregado em biorrefinarias, reduzindo o impacto ambiental e possibilitando a criação de sistemas renováveis para obtenção destes variados compostos; na

indústria farmacêutica, com a possibilidade de modificar vias metabólicas pouco produtivas de compostos de interesse no desenvolvimento de fármacos e a utilização de diferentes organismos para expressão de novas vias metabólicas; na medicina, sendo a biologia sintética aplicada no desenvolvimento de terapias gênicas e no combate de agentes etiológicos biológicos como vírus e microrganismos patológicos; na indústria de alimentos, sendo que a biologia sintética e a engenharia metabólica são aplicadas em microrganismos para obtenção de flavorizantes, aromatizantes e diferentes micro e macro nutrientes; no desenvolvimento de novas soluções industriais e outras aplicações de organismos *chassis* que envolvam detecção e sinalização, purificação e extração e modificação enzimática de diferentes compostos químicos. Outras aplicações destas tecnologias poderão influenciar em várias questões diárias e trazer soluções em campos ainda não explorados. Neste trabalho visamos organizar os pontos relevantes recentes na biologia sintética e engenharia metabólica, com exemplos de aplicações destas tecnologias no mundo acadêmico e no setor produtivo, discutindo o presente, e a prospecção futura de estado da arte destas tecnologias e as mudanças de paradigma que podem trazer para a sociedade. Este trabalho também pode servir de inspiração no desenvolvimento de novas combinações de

biobricks e de novos sistemas baseados em engenharia metabólica e biologia sintética.

PALAVRAS-CHAVE: Biologia sintética, Engenharia metabólica, *biobricks*

ABSTRACT: Advances in molecular biology, bioinformatics, systems biology and the study of genomics, proteomics, and metabolomics have led to the development of two technological areas with the potential to revolutionize biotechnology as a whole. Both areas, synthetic biology, and metabolic engineering have been developed and applied to solve several problems, some examples being: reducing the production costs of higher value-added chemical compounds in biorefineries, diminishing environmental impact and enabling the creation of renewable systems to obtain these various compounds; in the pharmaceutical industry, with the possibility of modifying poorly productive metabolic pathways of compounds of interest in the development of drugs and the use of different organisms to express new metabolic pathways; in medicine, in the development of gene therapies and in the efforts to uphold against biological etiological agents such as viruses and microorganisms; in the food industry to modify microorganisms to obtain additives, flavorings and different micro and macronutrients; in the development of new industrial solutions and other applications of chassis organisms involving detection and signaling, purification and extraction and enzymatic modification of chemicals and peptides of interest. Other applications of these technologies may influence many daily issues and bring solutions in fields not yet explored. In this work we aim to organize the relevant aspects of synthetic biology and metabolic engineering, with examples of applications of these technologies by the academic community and the productive sector, discussing the present, and future state-of-the-art exploration of these technologies and paradigm shifts that they may bring to society. This work can also be an inspiration for the development of new combinations of *biobricks* and new systems based on metabolic engineering and synthetic biology.

KEYWORDS: Synthetic biology, metabolic engineering, *biobricks*

BIOLOGIA SINTÉTICA

A biologia sintética é um novo termo para uma ideia antiga. Em seu livro de 1912, *The Mechanistic Conception of Life*, o biólogo alemão-americano Jacques Loeb propôs que os organismos vivos fossem considerados a partir de uma perspectiva de engenharia - não apenas como entidades “projetadas” pela evolução, mas como dispositivos passíveis de intervenção humana, manipulação e alteração (BALL, 2018).

Essa foi uma visão nascida em parte por pura ingenuidade. De onde vinha a vitalidade da vida havia sido um profundo mistério para os cientistas, mas apenas nas décadas seguintes à proposta de Loeb é que os biólogos começaram a perceber que as origens surgiam da capacidade da matéria viva de se organizar em escalas microscópicas. E essa organização se mostrou incrivelmente complicada (BALL, 2018).

As esperanças de total compreensão dos mecanismos de herança e controle

genéticos, para levar a compreensão das células e os organismos em termos de sua maquinaria molecular, deram lugar a uma apreciação da complexidade desconcertante dos sistemas vivos (BALL, 2018).

Entretanto, mesmo com os desafios ainda existentes, é possível intervir na genética de maneiras que às vezes são previsíveis. Entende-se muito sobre como os genes tendem a funcionar em redes, regulando a atividade uns dos outros para direcionar o destino da célula. Essa análise dos genomas em termos de redes funcionais envolvendo *feedback*, *switching* e amplificação é aquela que soa familiar aos engenheiros. (BALL, 2018).

Dessa forma, a biologia sintética se caracteriza como um campo tecnológico emergente que envolve a construção orientada por engenharia de entidades biológicas cada vez mais complexas para novas aplicações. Os principais aspectos de uma abordagem de engenharia são a orientação para propósitos específicos, a percepção profunda dos princípios científicos subjacentes, uma hierarquia de abstração incluindo interfaces adequadas entre e dentro dos níveis da hierarquia, padronização e separação entre projeto e fabricação. A biologia sintética investiga as possibilidades de implementar esses requisitos no processo de engenharia de sistemas biológicos (HEINEMANN; PANKE, 2006).

O advento da biologia de sistemas, o constante desenvolvimento de tecnologias fundamentais, como a síntese de novo de DNA (TIAN et al., 2004; HEINEMANN; PANKE, 2006), experimentos importantes, como o redesenho computacional de enzimas (DWYER, 2004; HEINEMANN; PANKE, 2006), a oportunidade de recombinar amplamente sistemas utilizando tecnologias como CRISPR-Cas9 (MAO, 2018), proteínas zinc-finger (DREIER et al., 2001; HEINEMANN; PANKE, 2006) e proteínas TALENs (WOOD et al., 2011) para reprogramar a especificidade do local de ligação ao DNA, e ainda a disponibilidade de sistemas regulatórios modelo bem definidos para o design de dispositivos moleculares inspirados em engenharia, fornecem uma base de conhecimento e tecnologia muito poderosa para a construção de novas entidades biológicas.

Aplicações encorajadoras vêm de áreas tão diversas quanto o desenho de redes de genes artificiais (SPRINZAK; ELOWITZ, 2005; HEINEMANN; PANKE, 2006), a refatoração de pequenos genomas (CHAN; KOSURI; ENDY, 2005; HEINEMANN; PANKE, 2006), a reprogramação de vias de sinalização (DUEBER, 2003; HEINEMANN; PANKE, 2006) ou engenharia metabólica (MARTIN et al., 2003; HEINEMANN; PANKE, 2006). Em conjunto, estas abordagens têm sido referidas como “biologia sintética”.

ENGENHARIA METABÓLICA

A engenharia metabólica é um campo tecnológico em expansão que visa modificar o sistema metabólico endógeno de um organismo para aproveitá-lo em uma

tarefa biotecnologicamente útil como, por exemplo, a produção de um composto de interesse (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Tem sido um dos objetivos finais da biologia chegar ao mesmo nível conceitual e sintético alcançado na química, desde o princípio das pesquisas em “engenharia metabólica” desenvolvidas no início dos anos 90. No entanto, as células ainda estão longe de serem pequenas fábricas para obtenção de produtos químicos (WOOLSTON; EDGAR; STEPHANOPOULOS, 2013), sendo que a engenharia metabólica continua sendo limitada na sua capacidade sintética, dependendo primariamente da transposição de vias metabólicas de um organismo para outro seguido por otimização desta via (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Nestes esforços, diferentes enzimas existentes, de diferentes organismos ou de diferentes vias metabólicas conhecidas e que podem ser responsáveis por um passo específico de uma nova via metabólica sintética são integradas para realizar uma determinada tarefa metabólica com maior eficiência ou nova funcionalidade (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Considerando as modificações genéticas baseadas em biologia sintética e engenharia metabólica, o aprofundamento do uso de técnicas e ferramentas de biologia molecular é necessário, tanto para modificação no genoma de um microorganismo ou alterações baseadas no uso de plasmídeos de expressão.

Ferramentas para biologia sintética e engenharia metabólica:

Alterações no genoma

A biologia molecular investiga técnicas de edição genética há décadas. Goldstein (2017) traz as primeiras definições de “engenharia genética” como o conjunto de técnicas de manipulação do DNA que surgem através da clonagem de um gene, colocando-o em um outro contexto a fim de ser propagado. Contudo, hoje o termo ganha novos horizontes, sendo utilizado para descrever toda e qualquer atividade que envolva a manipulação de DNA, introdução de alterações em células somáticas de animais e/ou plantas e alterações em células germinativas.

A engenharia genética ganhou volume no início da década de noventa. Foi quando, através da recombinação homóloga, células tronco embrionárias de ratos foram intencionalmente modificadas, sendo a primeira vez em que cientistas puderam selecionar e silenciar genes de interesse (THOMAS e CAPECCHI, 1987) (CAPECCHI, 1989). A partir disso, foi possível expandir o uso do ratos para gerar modelos de estudo de doenças humanas (expressando proteínas associadas à doenças através da substituição de genes normais por genes mutados). Embora o sucesso da metodologia, o desenvolvimento de abordagens alternativas, mais baratas e práticas, tornou-se necessário para seguir promovendo avanços nesse campo de pesquisa.

Cronologicamente, o primeiro mecanismo a surgir em seguida e ser amplamente utilizado foram as nucleases *Zinc-Finger* (*Zinc Finger Proteins*), seguido pelas

nucleases *TALEN* (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*) e, mais recentemente, o complexo enzimático *CRISPR-Cas9* e suas variantes (dCas9, Cas13 e Cas12a) vem atraindo os olhares de pesquisadores mundo à fora (BATISTA e PACHECO, 2018).

As nucleases *Zinc-Finger* são abundantes domínios de ligação ao DNA em eucariotos e consistem de aproximadamente 30 aminoácidos, estabilizada por íons Zn^{2+} . Estas nucleases são capazes de reconhecer trípletos de DNA (trechos de no máximo três pares de base) e seu funcionamento depende da presença de um par de nucleases, um para a região *upstream* e um para a região *downstream* do sítio de clivagem, e de uma associação dos domínios à enzima de restrição *FokI*, que realiza a clivagem de fato (BATISTA e PACHECO, 2018) (LISTIK e CARMO, 2016).

A técnica tornou possível a edição gênica em mamíferos que não eram contemplados pelas técnicas previamente utilizadas. Como contrapontos da técnica estão descritos: (i) o alto custo; (ii) a complexidade da técnica e (iii) os altos índices de clivagem em regiões similares ao alvo (denominadas de *off-targets*) (FERNÁNDEZ et al., 2017).

Mesmo assim, ainda se há um espaço considerável para as *Zinc-Finger* até os dias de hoje, sendo muito utilizada para a detecção de DNA, conforme Batista e Pacheco (2018) discutem. Jen e Wang (2016) mencionam o uso das proteínas *Zinc-Finger* como potenciais marcadores de progressão de diferentes tipos de câncer em humanos.

Em 2011, pesquisadores identificaram em *Xanthomonas* um interessante mecanismo envolvendo domínios de ligação ao DNA (nesse caso, efetores pseudo-ativador de transcrição (*transcription activator-like effectors*)) associadas a uma *FokI* (CERMAK et al., 2011). Foi descoberto que as TALENs reconhecem sequências de DNA através de um mecanismo de pareamento de bases envolvendo resíduos de aminoácidos e pares de base específicos (e.g. asparagina-isoleucina reconhece Adenina) (LISTIK e CARMO, 2016).

As TALENs demonstraram-se vantajosas em relação às *Zinc-Finger* devido ao baixo índice de *off-targets*, característica dada pelas especificidades das cadeias de aminoácidos das TALENs, que conseguem se ligar a até 20 bases nitrogenadas. Além disso, enquanto as *Zinc-Fingers* possuem diversas restrições de montagem (JOUNG e SANDER, 2013), não se conhece complicações na capacidade de interação com sequências-alvo das TALENs nem com sua especificidade.

WareJoncas et al. (2018) afirmam que, até os dias atuais, as TALENs mantêm-se no topo das plataformas de DNA mais programáveis e com menos restrições ao seu funcionamento. Segundo os autores, o número de publicações que utilizam TALENs em suas metodologias ultrapassou substancialmente as publicações que utilizam *Zinc-Fingers* após a descoberta e aplicação dessa técnica, embora o alto custo monetário das TALENs impeça seu amplo uso em laboratórios de biologia molecular.

A descoberta de um complexo ribonucleoproteico – *CRISPR-Cas9* – tornou a edição gênica em uma tendência de pesquisa. *CRISPR* é a abreviação de Repetições

Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), um sistema natural encontrado nos mecanismos de imunidade em bactérias. As primeiras evidências do mecanismo vieram através do trabalho de Ishino et al. (1987), observando regiões espaçadoras e regiões de repetição no gene *lap* de *Escherichia coli*. Não muito tempo depois, a atividade da proteína *Cas9* (integrada no complexo *CRISPR*) foi observada envolvendo a degradação de plasmídios ou de fagos invasivos, identificando que as regiões espaçadoras são, na verdade, cópias de DNA viral.

A formação do complexo *CRISPR* começa com a transcrição de DNA viral (espaçadores) e com a transcrição das repetições que agem como domínios de regulação gênica. Em seguida, o RNA resultante (crRNA), juntamente com um RNA transativador (tracrRNA), liga-se à uma endonuclease *Cas9*, agindo como guia da enzima até a sequência alvo. Após o pareamento, a endonuclease induz uma quebra da dupla-fita de DNA para a clivagem da sequência alvo.

Os sistemas *CRISPR-Cas9* podem ser classificados em duas classes principais, de acordo com a performance das suas subunidades enzimáticas. A primeira classe consiste de complexos de múltiplas subunidades efectoras de RNA (tipos I, III e V), enquanto que a segunda classe consiste em efetores de RNA com uma única subunidade (tipos II e V) (KHADEMPAR et al., 2018; BARRANGOU et al., 2007).

A compreensão desse mecanismo trouxe vantagens na dinâmica da edição gênica por apresentar-se mais específica e dinâmica do que outros mecanismos prévios. A capacidade de realizar a fusão do crRNA e do tracrRNA em um único RNA guia (gRNA) simplificou o uso deste mecanismo, uma vez que, assim, a única necessidade para criar um complexo de interação com o DNA é criar um gRNA de interesse que seja capaz de atrelar-se à *Cas9*.

Com isso, o baixo custo da técnica aumentou a acessibilidade à tecnologia pelos laboratórios de biologia molecular ao redor do mundo. WareJoncas et al. (2018) evidencia que o *CRISPR-Cas9* possui limitações evidentes, como ainda apresentar clivagens em regiões *off-target* (similarmente às outras técnicas) e uma alta tolerância a interações não totalmente pareadas. Com isso, surgem tentativas de unificar diferentes técnicas, como *CRISPR-Cas9* + Sistemas *Zinc Finger*, juntando os monômeros FokI à proteínas *Cas9* inativadas, tornando o complexo mais específico e, assim, evitando *off-targets*.

Mais recentemente, variações da *CRISPR*, como a *CRISPR-Cas12a* (ou Cpf1) e *CRISPR-Cas13a* (gerado com gRNAs), oferecem alternativas às limitações do sistema dependente de *Cas9* através das particularidades exclusivas de cada variante. Por exemplo, o sistema *Cas12a* aparenta ser mais naturalmente específico do que o *Cas9* (KIM et al., 2016), enquanto que a *Cas13a* apresenta motivos proteicos similares às *TALE*, ligando-se cada uma a uma única base nitrogenada de RNA específica (dando ainda mais especificidade ao complexo).

Com a eficácia e barateamento das técnicas de edição gênica, principalmente

com o uso dos complexos *CRISPR*, crescem as pesquisas buscando mecanismos cada vez mais específicos de identificação e interação com uma sequência alvo.

As aplicações de diferentes técnicas de edição gênica (figura 1) podem ser vistas ao longo das décadas de seus usos, como: descobertas de mecanismos de desenvolvimento e funcionamento da vesícula biliar feitas com o uso de técnicas de entrega de genes aleatórios (*nontargeted gene delivery*) (Warejoncas et al., 2018); geração de modelos animais (como de camundongos (Marusugi et al., 2016), ratos (CHEN et al., 2013) e porcos (He et al., 2015) utilizando *zinc-finger*, *TALEN*, *CRISPR-Cas9* e inativação de genes/edição de genes-alvo (e.g. a recriação da mutação W no gene p.C147, associada a doença renal em ratos (JOHNSON et al., 2017).

Mais recentemente, um polêmico caso de pesquisa com embriões humanos virou o centro das atenções. He Jiankui, da Universidade do Sul de Ciência e Tecnologia da China, foi capaz de silenciar um gene envolvido na capacidade do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) de infectar células utilizando *CRISPR-Cas9*. O controverso trabalho levantou uma série de questões éticas, uma vez que há, ainda, a necessidade de aprimorar as técnicas de edição gênica, a fim de evitar efeitos indesejados de alterações no genoma que envolvem a clivagem parcial de sítios alvo, a clivagem *off-target* e os efeitos das deleções e modificações genéticas a nível transcricional, traducional, fisiológico e imunológico e a possibilidade da herdabilidade das alterações genéticas realizadas - algo que ainda é um desafio evidente para pesquisadores (REGALADO, 2018).

Os constantes avanços da pesquisa em edição gênica parecem, eventualmente, levar à edição de genes em humanos (com o objetivo de resolver problemas ligados à doenças atualmente sem cura ou tratamento), tornando evidente não apenas a necessidade de aprimorar as técnicas utilizadas, mas de discutir as questões éticas por trás dessa aplicação.

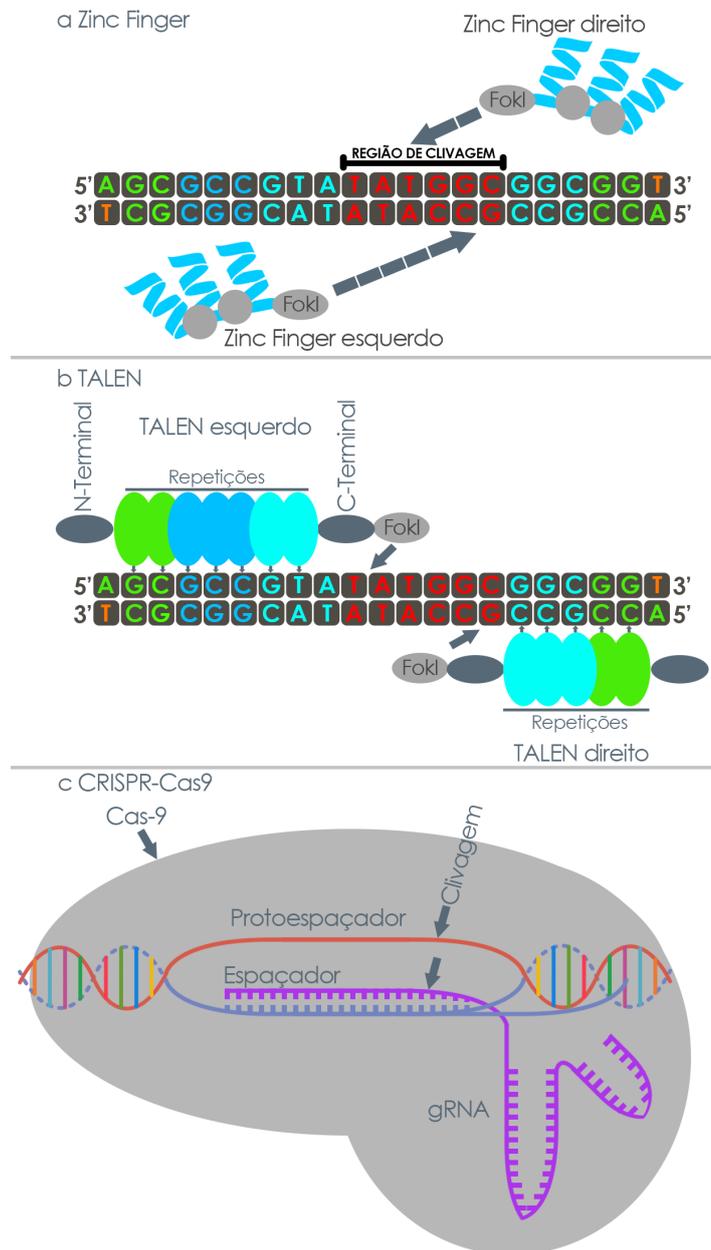


Figura 1: sistemas de modificação gênica utilizados para alterações a nível cromossomal ou outras aplicações de edição gênica *in vivo*. Adaptado de Warejoncas et al. (2018). Sistemas representados: (a) Zinc Finger; (b) TALENs e © CRISPR-Cas9.

Alterações no nível de expressão de genes

O silenciamento gênico, fenômeno em que ocorre o bloqueio do processo de transcrição, ou degradação de RNA transcrito, também conhecido como RNA de interferência (RNAi), é um mecanismo celular que pode ocorrer durante a transcrição do RNAm (RNA mensageiro). As funções vitais de qualquer organismo dependem da expressão de seus genes, isto é, a partir do DNA os genes são primeiro transcritos para o RNA, e depois traduzidos em proteínas (LIPPMAN; MARTIENSSSEN, 2004).

Quando ocorre o silenciamento gênico, o RNAi (fragmento de aproximadamente vinte e um nucleotídeos complementares a sequência do RNA mensageiro) atua em conjunto com complexos enzimáticos e leva a degradação do RNA alvo ou o

impedimento físico do processo de tradução. Desse modo considera-se que o gene para dado transcrito foi “desligado” (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004).

A ocorrência desse mecanismo foi identificada nos mais diversos organismos eucarióticos, como insetos, fungos, nematóides e plantas. A interferência por RNA ocorre naturalmente nesses organismos, funcionando como uma forma de regulação da produção de proteínas e como mecanismo de defesa contra vírus entre outras funções regulatórias (BRANTL, 2002).

Além da utilização de RNAi, outra alternativa que vem sendo estudada é o bloqueio físico de regiões promotoras utilizando CRISPR-dCAS (a enzima CAS possuindo uma mutação que inibe a sua atividade endonucleásica). Dessa forma, o processo de transcrição é interrompido antes da elongação e formação do RNAm. CRISPR-dCAS aparenta ser uma ferramenta mais versátil por poder ser aplicada tanto em eucariotos quanto em procariotos (XU; QI, 2019).

Sistemas de silenciamento gênico podem ser aplicados na terapia gênica, quando se busca evitar uma deleção completa de um gene específico ou apenas uma modulação na sua expressão. RNAi também pode ser utilizado no desenvolvimento de sistemas moleculares de combate a vírus de RNA e DNA em seres humanos, animais e plantas. A modulação específica na expressão de alguns genes também pode ser de interesse para preparar plantas de cultivo para situações de estresse biótico e abiótico (BRANTL, 2002; LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004; CULLEN, 2005; XU; QI, 2019).

Plasmídeos e sistemas para expressão extracromossomal

Além dos métodos desenvolvidos para alteração genômica de eucariotos e procariotos, sistemas de superexpressão e sistemas de *switch* genéticos (que envolvem sistemas de sinalização e regulação de expressão de genes repórter ou ativação de vias metabólicas) e outros sistemas de deleção de genes foram desenvolvidos utilizando fragmentos circulares de DNA, conhecidos como plasmídeos ou vetores (PURNICK; WEISS, 2009).

A utilização de plasmídeos e vetores de expressão gênica foram as primeiras estratégias exploradas no desenvolvimento de organismos geneticamente modificados e no desenvolvimento de engenharia metabólica visando a superexpressão de proteínas de interesse (BERG; MERTZ, 2010).

Estes plasmídeos podem ser encontrados em bancos de dados como Adgene, Snapgene, iGEM repository, e adquiridos em diferentes empresas, sendo que no Brasil, pode-se adquirir sequências sintéticas inteiras clonadas em diferentes vetores de escolha pelo valor de R\$ 3,00 a R\$ 2,00 por par de base dependendo das especificações e do fornecedor.

Geralmente vetores e plasmídeos possuem três regiões distintas, essenciais para seu funcionamento, sendo elas: um sítio de replicação, para promover a multiplicação do plasmídeo no interior da célula chassis; um marcador expresso que atribui uma

característica específica a célula do organismo chassis, para posterior seleção de transformantes; e um sítio de múltipla clonagem (MCS) que permite a inserção de um fragmento de DNA específico. Como exemplo tem-se plasmídeos para clonagem e expressão de genes em procariotos que contém uma região *ori* de replicação de DNA plasmidial obtida de pBR322, uma região para expressão do gene para β -lactamase *ampR* que atribui resistência a antibióticos como ampicilina e penicilina para seleção de transformantes e um sítio de clonagem múltipla no interior de uma região codificadora, expressa sobre um promotor e operador *lac* Figura 2 (NOVAGEN, 2018).

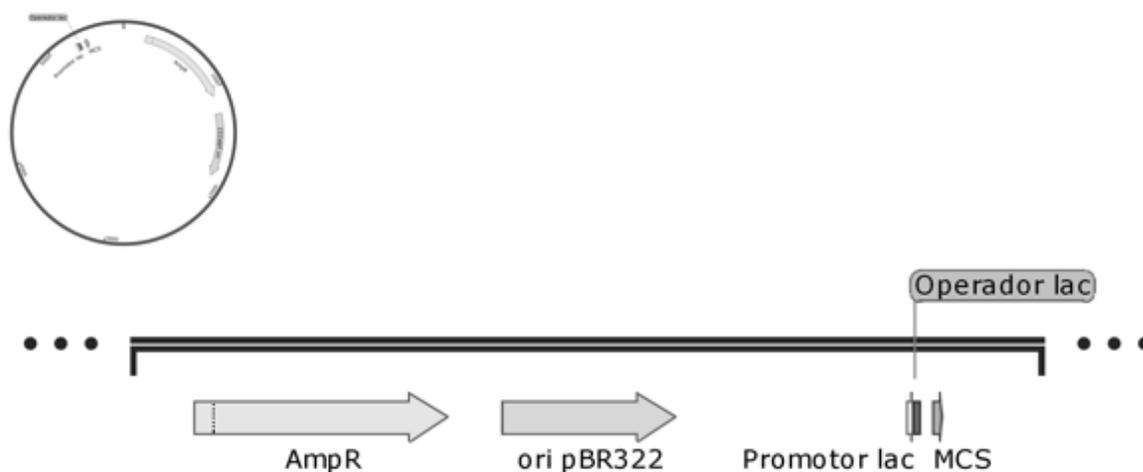


Figura 2: Exemplo de plasmídeo ou vetor para clonagem de seqüências de DNA específico. Imagem adaptada de vetor plasmidial pET-11a e desenvolvida utilizando software Snapgene (GSL Biotech LLC. 2017).

No sítio de clonagem múltipla (MCS) pode-se inserir diferentes combinações de partes e *biobricks* para desenvolvimento de novas funções metabólicas ou novos peptídeos e moléculas de DNA e RNA com funções específicas (NOVAGEN, 2018).

Biobricks, são partes partes, como promotores, reguladores, seqüências de codificação entre outras que são descritas e utilizadas conforme o sistema de linguagem aberta em biologia sintética (SBOL) para design de novas combinações e sistemas de expressão. *Biobricks* funcionam como um repositório de partes de seqüências de DNA que podem ser utilizadas em diferentes combinações para novas funções (Turing ATE my hamster LTD. 2018).

Peptídeos e suas aplicações

Plasmídeos e construções de *biobricks* são aplicados no design de novas proteínas e enzimas que vão atribuir uma nova função ou alteração para obtenção do próprio peptídeo purificado ou compostos gerados a partir de vias metabólicas obtidas por engenharia metabólica, ou sistemas de sinalização para interpretação de substâncias e proteínas em um meio específico (PURNICK; WEISS, 2009).

Considerando a expressão heteróloga de proteínas e sua reformulação, diferentes domínios de enzimas e peptídeos inteiros podem ser ligados para formação de proteínas de fusão. Aplicações de uma enzima de fusão em diferentes conceitos é explorada na figura 3 (ELLEUCHE, 2014).

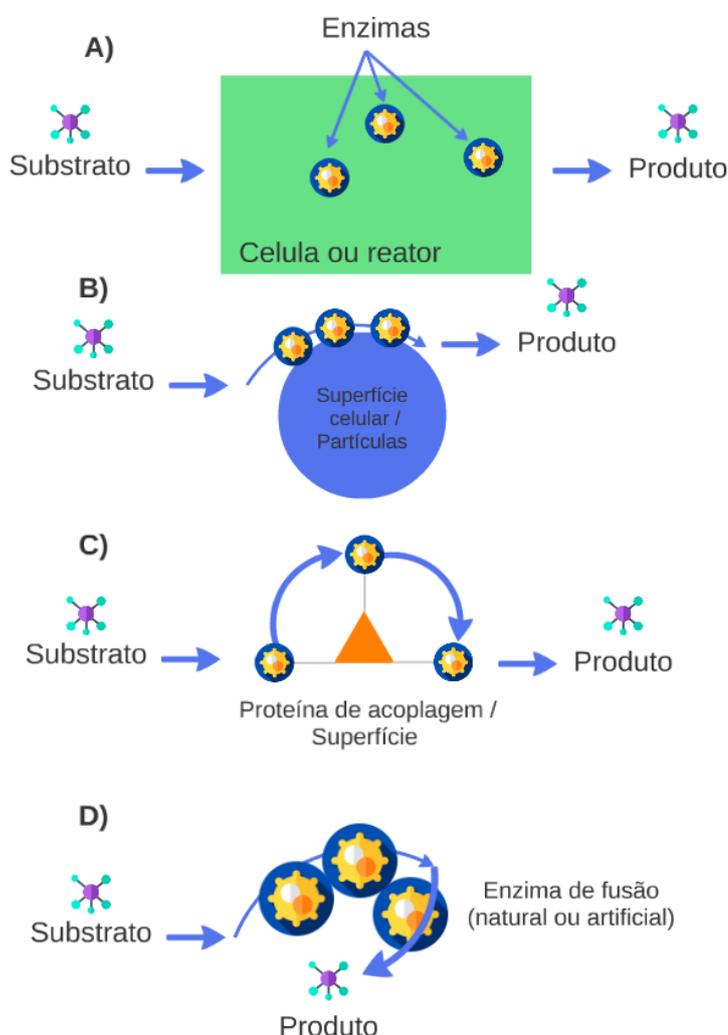


Figura. 3 Cascatas de reações acopladas em sistemas vivos como paradigmas para modelos artificiais. A) Ação combinada de três diferentes enzimas em um compartimento específico, como uma célula (natureza) ou em um reator de um único recipiente (sistema artificial) catalisa a conversão de um substrato para formação de um dado produto. B) As enzimas estão representadas na superfície celular, cell-surface display, (natureza) ou imobilizadas em partículas (sistema artificial). C) Enzimas são orientadas por uma proteína de suporte scaffold, como por exemplo em celulosomas (natureza) ou imobilizadas em uma superfície (sistema artificial). D) Uma enzima modular composta por três regiões ou domínios catalíticos (natureza) ou enzimas artificialmente fundidas (sistema artificial) catalisam três etapas de reação. Setas ilustram uma reação hipotética catalisada por três enzimas para converter um substrato em um produto. Adaptado de Elleuche (2014).

Além da fusão de enzimas e proteínas um processo de evolução e mutação direcionada de genes para proteínas já conhecidas pode levar a formação de vias metabólicas sintéticas mais rápidas e eficientes na utilização de substratos específicos, no desenvolvimento de novas proteínas repórter e cromoproteínas e aprimoramento de especificidade e capacidade de ligação de peptídeos, aptâmeros e fragmentos de

anticorpo voltados a identificação de epítomos específicos (ARNOLD, 2017).

Um exemplo complexo para aplicações destas técnicas são o desenvolvimento de novas vias metabólicas para obtenção do composto 2,3-butanodiol a partir do substrato glicerol em células *chassis* de *Klebsiella aerogenes* e *Escherichia coli*. Dentre as modificações aplicadas estão a superexpressão de enzimas para acelerar o consumo de glicerol e sua conversão em dihidroxiacetona para metabolismo em via metabólica de formação de piruvato, a superexpressão de genes para enzimas envolvidas na conversão de piruvato em 2,3-butanodiol, a deleção de genes para enzimas que levam ao desvio do piruvato para formação de outros subprodutos como acetato, etanol e lactato e a superexpressão de genes para auxiliar no reciclo de cofatores NAD e NADH envolvidos nos passos metabólicos de conversão de glicerol em 2,3-butanodiol e para manter o balanço redox interno das células *chassis* em homeostase. Também é explorado o uso de proteínas de fusão para realizar as funções descritas acima, um destes exemplos foi explorado pelo grupo de pesquisa do laboratório de biotecnologia e microbiologia aplicada da Universidade de Caxias do Sul, em que foi realizada a fusão das enzimas glicerol desidrogenase (para formação de dihidroxiacetona e NADH) e acetoína redutase (responsável pela formação de 2,3-butanodiol e NAD), esta estratégia visa trazer soluções para aumento no consumo de glicerol como substrato, aumento da produção de 2,3-butanodiol e um mutuo reciclo e reutilização de cofatores NAD e NADH, levando em consideração a aproximação física de ambas as enzimas (YANG; ZHANG, 2018).

Exemplos de aplicações recentes de engenharia metabólica e biologia

sintética:

Nos Estados Unidos, uma iniciativa chamada iGEM (genetically engineered machine) do MIT (Massachusetts Institute of Technology), realiza uma competição anual entre acadêmicos de nível de graduação para fomentar o desenvolvimento de novos designs e aplicações baseados em biologia sintética e a formação de empreendedores em biotecnologia (PURNICK; WEISS, 2009).

Entretanto, o uso de técnicas e aplicações em biologia sintética e engenharia metabólica não se restringem apenas a academia. Empresas e startups já vem desenvolvendo soluções e produtos baseados nestas técnicas, exemplos de empresas e startups que alcançaram investimento de 25 a 150 milhões de dólares em 2018 estão representadas na tabela 1 (SYNBIOBETA, 2018).

Startup/Empresa	Ramo de atuação ou Indústria	O que faz	País de fundação
Autolus Therapeutics	Indústria farmacêutica/ terapias para tratamento do câncer	Desenvolvimento de terapias com células T altamente direcionadas, controladas e altamente ativas. Engenharia de células T.	Reino Unido
Impossible foods	Indústria alimentícia	Desenvolve um hambúrguer de proteína vegetal contendo em seu ingrediente a levedura <i>Pichia pastoris</i> modificada expresando hemoglobina vegetal de raízes de plantas de soja.	Estados Unidos
Precision Biosciences	Indústria farmacêutica/ AgroIndústria/ Biotecnologia	Método próprio e sistemas de modificação genética <i>in vivo</i> . Terapia gênica e alteração de genes envolvidos com patologias e características específicas em plantas e animais.	Estados Unidos
Beam Therapeutics	Indústria farmacêutica	Utiliza a tecnologia CRISPR para editar genes e alterar uma única base nitrogenada. Modificação de SNP's (single nucleotide polymorphisms) utilizando CRISPR.	Estados Unidos
Synthorxs	Indústria farmacêutica	DNA sintético para tradução <i>in vitro</i> de peptídeos para uso como medicamentos e tratamentos.	Estados Unidos
Calyxt	AgroIndústria/ Indústria alimentícia	Edição genética utilizando TALEN para produção de plantas com traços que aumentem seu valor nutricional e quantidade de nutrientes. Foco na produção de alimentos para o consumidor final e não somente na produtividade.	Estados Unidos
Inovio Pharmaceutical	Indústria farmacêutica	Edição genética de células do sistema imune para combater células cancerosas e células infectadas com vírus. Produção de antígenos. <i>in vivo</i> Antigen-targeted immunotherapies.	Estados Unidos
Twist biosciences	Biotecnologia	Síntese de DNA. Produção de genes sintéticos.	Estados Unidos
Codexis	Biotecnologia	Evolução direcionada de proteínas e enzimas para aumento de especificidade e atividade catalítica entre outras atribuições. Protein engineering	Estados Unidos
Poseida Therapeutics	Indústria farmacêutica	Modificações genéticas em células CAR-T. Targeted immunotherapies.	Estados Unidos
Synlogics	Biotecnologia/Indústria farmacêutica	Desenvolvimento de microorganismos de microbioma, geneticamente modificados, utilizando engenharia metabólica para produção de compostos para tratamentos específicos a partir de um sistema gênico de circuitos para sinalizar ativação ou inativação destas vias metabólicas dependendo de sinais moleculares presentes no intestino.	Estados Unidos

Tabela 1: Empresas e startups que utilizam o conceito de biologia sintética e que alcançaram investimento de 25.000.000,00 US\$ a 150.000.000,00 US\$ em 2018 (SYNBIOBETA, 2018).

Os Estados Unidos lideram a inovação e formação de empresas em biologia sintética, sendo que se destacam sua aplicação na indústria alimentícia, na agroindústria e na medicina e indústria farmacêutica (SYNBIOBETA, 2018).

Outras aplicações que também vem sendo exploradas são o desenvolvimento de microrganismos para produção de combustíveis e outros compostos com aplicação na indústria química e de polímeros (SYNBIOBETA, 2018).

Acesso a capital para empreendedorismo em biologia sintética e biotecnologia

No Brasil, a iniciativa privada também tem voltado sua atenção para o desenvolvimento de startups no setor de biotecnologia, sendo que aplicações em biologia sintética são de áreas de interesse de agências financiadoras como FINEP (Agência financiadora de inovação e pesquisa) e StartupBrasil do CNPq (Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico). Outros incentivos ao empreendedorismo em ciências da vida vêm de programas como BioStartupLab, que busca auxiliar pesquisadores e cientistas empreendedores ou levar soluções desenvolvidas na academia para o mercado. Outro espaço em expansão no incentivo a startups e empresas de biotecnologia são os pólos, parques e incubadoras tecnológicas nas universidades e instituições de pesquisa brasileiras.

Além dos incentivos nacionais, outros programas internacionais buscam startups de biologia sintética e biotecnologia para investimento em *seed capital* como os programas Rebelbio do Reino Unido e Indiebio dos Estados Unidos, ambos oferecem investimento inicial de 200.000,00 £ a 250.000,00 US\$ mais experiência, mentoria e aceleração de negócios em biotecnologia.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento da biologia sintética e suas aplicações vem crescendo tanto no âmbito acadêmico quanto no setor produtivo trazendo soluções para diversos problemas. A aplicação dos conceitos de engenharia na biotecnologia e a construção de sistemas baseados em *switch* gênicos podem simplificar e padronizar a construção destes sistemas complexos, tornando sua aplicação e entendimento mais acessível para acadêmicos, engenheiros e empreendedores em biotecnologia. Considerando os exemplos abordados neste trabalho, fica claro a liderança dos Estados Unidos no fomento a biologia sintética e a sua liderança em captação de capital para empresas deste ramo. No Brasil, apesar dos esforços recentes, o ecossistema de desenvolvimento em biologia sintética e engenharia metabólica permanece embrionário, apesar das possibilidades e vantagens nacionais envolvendo a bioprospecção de organismos de interesse, sendo o Brasil o país mais biodiverso do mundo. Os exemplos apresentados neste trabalho também podem servir de inspiração para acadêmicos e pesquisadores para o desenvolvimento de startups para atender o mercado nacional de biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- ARNOLD, Frances H.. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 16, p.4143-4148, 28 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201708408>.
- BALL, Philip. Synthetic biology—Engineering nature to make materials. **Mrs Bulletin**, v. 43, n. 7, p.477-484, jul. 2018. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1557/mrs.2018.165>.
- BARRANGOU, R. et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p.1709-1712, 23 mar. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1138140>.
- BATISTA, Angelo C.; PACHECO, Luis G.c.. Detecting pathogens with Zinc-Finger, TALE and CRISPR-based programmable nucleic acid binding proteins. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 152, p.98-104, set. 2018.
- BERG, P.; MERTZ, J. E.. Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. **Genetics**, v. 184, n. 1, p.9-17, 1 jan. 2010. Genetics Society of America. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.109.112144>.
- BRANTL, Sabine. Antisense-RNA regulation and RNA interference. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Gene Structure And Expression**, v. 1575, n. 1-3, p.15-25, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4781\(02\)00280-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00280-4).
- CAPECCHI, M.. Altering the genome by homologous recombination. **Science**, v. 244, n. 4910, p.1288-1292, jun. 1989.
- CERMAK, Tomas et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 12, p.82-93, 14 abr. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr218>.
- CULLEN, Bryan R. RNAi the natural way. **Nature Genetics**, v. 37, n. 11, p.1163-1165, nov. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1105-1163>.
- CHEN, Chun Cheng Andy et al. Heterozygous knockout of transforming growth factor- β 1 protects Dahl S rats against high salt-induced renal injury. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 3, p.110-118, fev. 2013. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00119.2012>.
- DREIER, Birgit et al. Development of Zinc Finger Domains for Recognition of the 5'-ANN-3' Family of DNA Sequences and Their Use in the Construction of Artificial Transcription Factors. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p.29466-29478, 4 maio 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m102604200>.
- DUEBER, J. E.. Reprogramming Control of an Allosteric Signaling Switch Through Modular Recombination. **Science**, v. 301, n. 5641, p.1904-1908, 26 set. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1085945>.
- DWYER, M. A.. Computational Design of a Biologically Active Enzyme. **Science**, v. 304, n. 5679, p.1967-1971, 25 jun. 2004. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1098432>.
- ELLEUCHE, Skander. Bringing functions together with fusion enzymes—from nature's inventions to biotechnological applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 99, n. 4, p.1545-1556, 24 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6315-1>.
- REGALADO, A. **EXCLUSIVE: CHINESE SCIENTISTS ARE CREATING CRISPR BABIES**. Massachusetts: MIT, 25 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.technologyreview.com/s/612458/>>

exclusive-chinese-scientists-are-creating-crispr-babies/>. Acesso em: 10 dez. 2018.

ERB, Tobias J; JONES, Patrik R; BAR-EVEN, Arren. Synthetic metabolism: metabolic engineering meets enzyme design. **Current Opinion In Chemical Biology**, v. 37, p.56-62, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.023>.

FERNÁNDEZ, Almudena; JOSA, Santiago; MONTOLIU, Lluís. A history of genome editing in mammals. **Mammalian Genome**, v. 28, n. 7-8, p.237-246, 6 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-017-9699-2>.

GSL BIOTECH LLC. **Snappene plasmid viewer software**. 2017. Disponível em: <www.snappene.com>. Acesso em: 01 mar. 2017.

GOLDSTEIN, Elliott S.; KILPATRICK, Stephen T.; KREBS, Jocelyn E.. **Lewin's Genes XII**. 12. ed. Massachusetts: Jones & Bartlett Pub., 2017. 838 p.

HE, Jin et al. PKD1 Mono-Allelic Knockout Is Sufficient to Trigger Renal Cystogenesis in a Mini-Pig Model. **International Journal Of Biological Sciences**, v. 11, n. 4, p.361-369, 2015. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.10858>.

HEINEMANN, M.; PANKE, S.. Synthetic biology--putting engineering into biology. **Bioinformatics**, v. 22, n. 22, p.2790-2799, 5 set. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl469>.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for the alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p.5429-5433, 1987.

JEN, Jayu; WANG, Yi-ching. Zinc finger proteins in cancer progression. **Journal Of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p.1-9, 13 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-016-0269-9>.

JOHNSON, Bryce G. et al. Uromodulin p.Cys147Trp mutation drives kidney disease by activating ER stress and apoptosis. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 127, n. 11, p.3954-3969, 9 out. 2017. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci93817>.

JOUNG, J. Keith; SANDER, Jeffrey D.. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 1, p.49-55, 21 nov. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3486>.

KHADEMPAR, Saedeh et al. CRISPR-Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. **Journal Of Cellular Physiology**, p.1-11, 26 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27476>.

KIM, Daesik et al. Erratum: Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p.888-888, ago. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0816-888a>.

LISTIK, E.; CARMO, A. C. V. As características dos mecanismos e sistemas de edição genômica. **Revista acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 10, p.1-14, 2016.

LIPPMAN, Zachary; MARTIENSSSEN, Rob. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v. 431, n. 7006, p.364-370, set. 2004. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02875>.

MAO, Steve. Taking CRISPR technology further. **Science**, v. 360, n. 6387, p.393-393, 26 abr. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.360.6387.393-d>.

MARTIN, Vincent J J et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 7, p.796-802, 1 jun. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt833>.

MARUSUGI, Kiyoma et al. Functional validation of tensin2 SH2-PTB domain by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. **Journal Of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 9, p.1413-1420, 2016. Japanese Society of Veterinary Science. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.16-0205>.

NOVAGEN. **PET-11a-d Vectors**. Disponível em: <<https://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET11a.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

PURNICK, Priscilla E. M.; WEISS, Ron. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 6, p.410-422, jun. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2698>.

SPRINZAK, David; ELOWITZ, Michael B.. Reconstruction of genetic circuits. **Nature**, v. 438, n. 7067, p.443-448, nov. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04335>.

SYNBIOBETA. **Funding for synthetic biology companies**. Disponível em: <<https://synbiobeta.com/these-33-synthetic-biology-companies-just-raised-925-million/>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

THOMAS, Kirk R.; CAPECCHI, Mario R.. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. **Cell**, v. 51, n. 3, p.503-512, nov. 1987.

TIAN, Jingdong et al. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. **Nature**, v. 432, n. 7020, p.1050-1054, dez. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03151>.

Turing Ate My Hamster LTD. (SBOL) The Synthetic Biology Open Language. Disponível em: <<https://biobricks.org/>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

XU, Xiaoshu; QI, Lei S.. A CRISPR-dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. **Journal Of Molecular Biology**, v. 431, n. 1, p.34-47, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.037>.

YANG, Zhiliang; ZHANG, Zisheng. Recent advances on production of 2, 3-butanediol using engineered microbes. **Biotechnology Advances**, v. 1, n. 1, p.1-39, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.019>.

WAREJONCAS, Zachary et al. Precision gene editing technology and applications in nephrology. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 11, p.663-677, 8 ago. 2018. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-018-0047-x>.

WOOD, Andrew J. et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. **Science**, v. 333, n. 6040, p.307-307, 23 jun. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1207773>.

WOOLSTON, Benjamin M.; EDGAR, Steven; STEPHANOPOULOS, Gregory. Metabolic Engineering: Past and Future. **Annual Review Of Chemical And Biomolecular Engineering**, v. 4, n. 1, p.259-288, 7 jun. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061312-103312>.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-216-6

