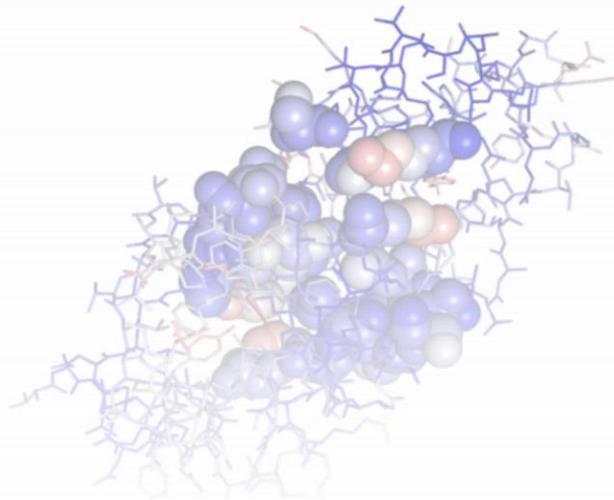


## **Microorganismos: Biotecnologia e engenharia genética**



Dr. Ronaldo J. D. Dalio  
ronaldobio@hotmail.com

# Agenda

- Definições
- Histórico
- Uso
- Métodos: DNA recombinante, transformação, clonagem, genoma, terapia gênica
- Benefícios
- Biossegurança
- Riscos
- Discussão

# Objetivos

- Obter uma visão geral sobre a biotecnologia, sua importância, principais métodos e aplicabilidades
- Desenvolver um pensamento crítico em relação aos benefícios e riscos envolvidos no uso desta tecnologia

# Definições

*Bio* – elemento designativo de vida, uso de processos biológicos

*Tecnologia* – solucionar problemas ou produzir produtos úteis, usáveis.

Ereky (1919): “A ciência e os métodos que permitem a obtenção de produtos a partir da matéria-prima, mediante a intervenção de organismos vivos”

OTA – Office of Technology Assessment: Biotecnologia, de uma forma abrangente, inclui qualquer técnica que utiliza organismos vivos (ou partes deles) para obter ou modificar produtos, melhorar plantas e animais, ou desenvolver microrganismos para usos específicos (1984).

Biotechnology Industry Organization: em sentido amplo, Biotecnologia é "bio" + "tecnologia", isto é o uso de processos biológicos para resolver problemas ou fazer produtos úteis (2003).

# Biotecnologia

É a utilização de agentes biológicos ou partes destes afim de gerar produtos e serviços tendo como base princípios científicos e de engenharia.

## CONHECIMENTO

Microbiologia, Bioquímica, Química, Genética, Engenharia, Informática, etc.

## AGENTES BIOLÓGICOS

Microrganismos, DNA, enzimas, anticorpos, etc

## BIOTECNOLOGIA

```
graph TD; C[CONHECIMENTO] --> B[BIOTECNOLOGIA]; A[AGENTES BIOLÓGICOS] --> B; B --> G[BENS]; B --> S[SERVIÇOS];
```

## BENS

Alimentos, bebidas, produtos químicos, produtos farmacêuticos, energia, etc.

## SERVIÇOS

Purificação da água, tratamentos de resíduos, controle de poluição, etc.

# Histórico



- **Primeira Geração:** 2000 a.C.

Fatos: - cruzamento de espécies animais e plantas  
- leveduras para fermentação - pão e álcool

---

- **Segunda Geração:** Fim do século XIX

Fatos: - microrganismos causam enfermidades humanas  
- ação dos microrganismos anaeróbios nas fermentações  
láctea, alcoólica, etc

---

- **Terceira Geração:** Início de 1970. **Biologia Molecular**

Fatos: 1º – isolamento e manipulação de genes (DNA)  
2º – fusão e multiplicação de células

# Uso: Saúde

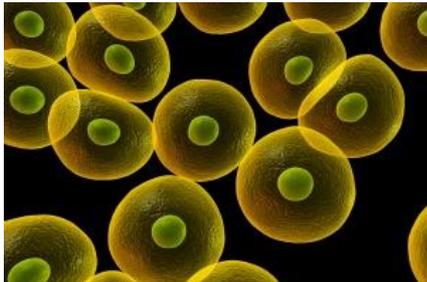


Produção de:

- vacinas
- anticorpos
- medicamentos, etc



Terapia gênica



Células tronco

# Uso: Saúde



Vetores de doenças manipulados geneticamente



Kits para diagnósticos



Pré-Diagnose em função da análise do genoma do indivíduo

<https://www.23andme.com/>

# Uso: alimentos

Pães;

Bebidas (vinho, cerveja, saquê, etc);

Queijos;

Vinagre;

Aditivos (espessantes e emulsificantes);

Alimentos funcionais (nutracêuticos).



Biotechnologia



# Uso: Meio-ambiente

- biorremediação de vazamentos de petróleo e resíduos tóxicos
- monitoramento de poluentes (biosensores)
- tratamento de resíduos industriais e águas residuárias
- biomineração (recuperação de metais pesados e radioisótopos)
- recuperação de áreas degradadas (micorrizas e bactérias fixadoras de nitrogênio)



# Uso: agricultura

Controle de doenças e pragas;

Compostagem;

Fixação biológica de nitrogênio;

Plantas geneticamente modificadas.

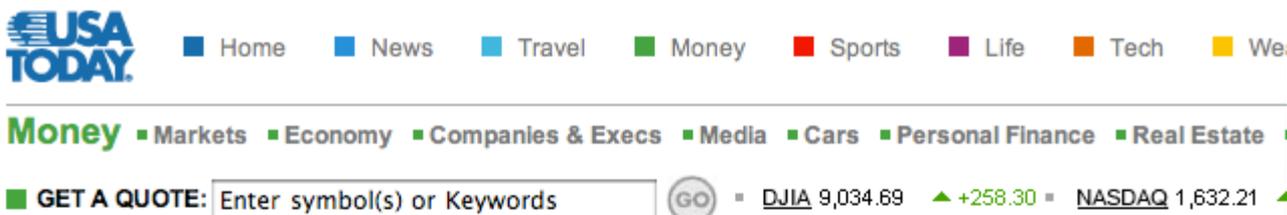


# Uso: indústria

Butanol, aceto  
etc. Numerosa  
(têxtil, de dete



Lipases



USA TODAY

Home News Travel Money Sports Life Tech We

Money Markets Economy Companies & Execs Media Cars Personal Finance Real Estate

GET A QUOTE: Enter symbol(s) or Keywords GO DJIA 9,034.69 +258.30 NASDAQ 1,632.21

## Biodegradable plastic made from plants, not oil, is emerging

Updated 12/26/2008 2:31 AM | Comments 57 | Recommend 20 | E-mail | Save | Print | Reprints & Permissions | RSS

By Ron Barnett, USA TODAY

Here is one word about an up-and-coming innovation in plastics: cornfields.

Bioplastics — most of which are now made from corn — are poised to grab a bigger share of the plastics market as concerns about the environment and U.S. dependence on foreign oil promote alternatives to products made from petrochemicals.

They already are showing up in a variety of products, such as plastic gift cards, food containers and cellphone casings, says Steve Davies, a spokesman for NatureWorks.

NatureWorks, based in Minnetonka, Minn., developed one of the first plant-based plastics with the creation of a resin technology called Ingeo. Its Ingeo plastic pellets are used to make clothing, diapers and food-packaging material.

After doubling the size of its manufacturing plant in Nebraska, NatureWorks will have the capacity to produce up to 300 million



Enlarge

Metabolix

Mirel is a family of plant-based, biodegradable plastics. It's being made into such items as razor handles, cups and packaging for cosmetics.

pounds of pellets a year.

Mixx it

Other ways to share:

Yahoo! Buzz

Digg

Newsvine

Reddit

Facebook

What's this?



trico  
alimentos)

# Uso: Energia

Etanol;  
Biogás.



*Saccharomyces cerevisiae*  
Fermentação alcoólica



Bactérias metanogênicas  
(biogás)

**Tabela 1.** Alguns exemplos de utilização direta de microrganismos em processos biotecnológicos em diferentes segmentos da indústria.

---

**Indústria de alimentos**

- produção e preservação de alimentos
- produção de bebidas
- aromas e essências
- aditivos para alimentos (emulsificantes e espessantes)
- alimentos funcionais (nutracêuticos)

**Indústria farmacêutica**

- compostos farmacologicamente ativos
- antibióticos, antimicrobianos e antivirais
- vitaminas e hormônios
- vacinas e probióticos
- biopolímeros de aplicação médica (e.g., pele artificial)
- biotransformações em química fina

**Agro-Indústria**

- aumento de fertilidade do solo
- fixação biológica de nitrogênio
- controle biológico de insetos e patógenos
- promotores de crescimento de plantas
- promotores de crescimento animal
- anti-parasitídeos, antibióticos, antimicrobianos, antivirais
- vitaminas e hormônios
- vacinas e probióticos
- compostagem e tratamento biológico de resíduos

**Indústria Química**

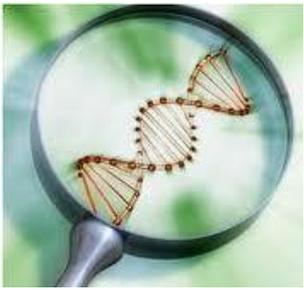
- biotransformações em química fina e produção de matérias-primas
- assimilação de metano e enxofre em processos industriais
- surfactantes
- matérias-primas industriais diversas: polissacarídeos, polímeros, ácidos orgânicos, aminoácidos
- enzimas de aplicação industrial (detergentes, têxteis, papel e celulose)

**Ambiental**

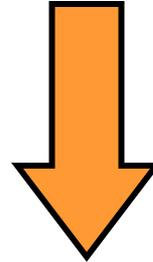
- biorremediação de vazamentos de petróleo e resíduos tóxicos
- monitoramento de poluentes (biosensores)
- tratamento de resíduos industriais e águas residuárias
- biomineração (recuperação de metais pesados e radioisótopos)
- recuperação de áreas degradadas (micorrizas e bactérias fixadoras de nitrogênio)

**Energia**

- geração de combustíveis: álcool e biorefino de petróleo
-



# Biotecnologia Moderna

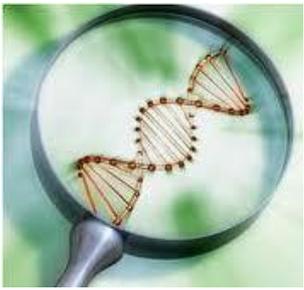


**BIOLOGIA MOLECULAR**

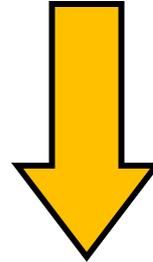
**ENGENHARIA GENÉTICA**

**TECNOLOGIA DO DNA  
RECOMBINANTE**

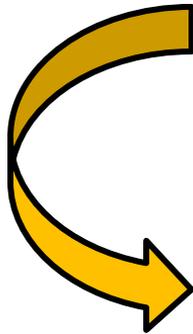




# Biotecnologia Moderna



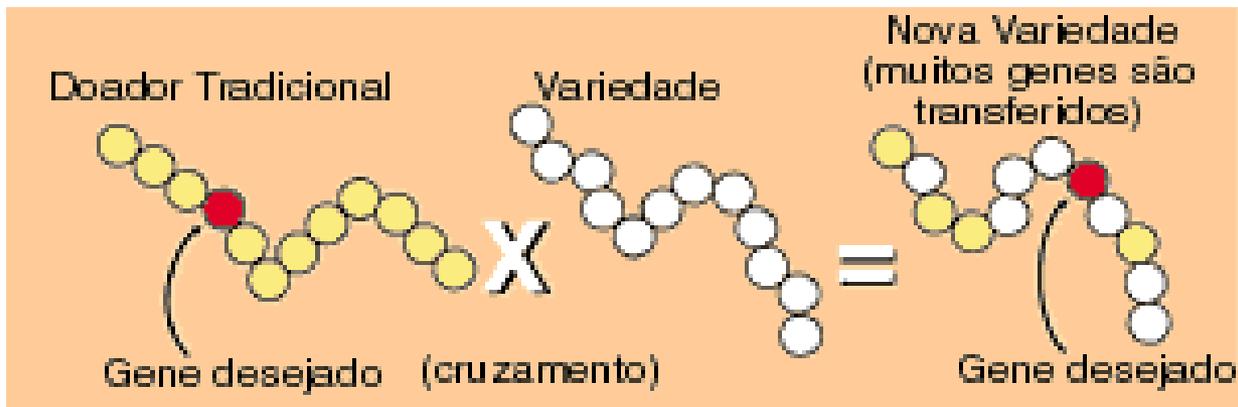
**Tecnologia do DNA  
recombinante**



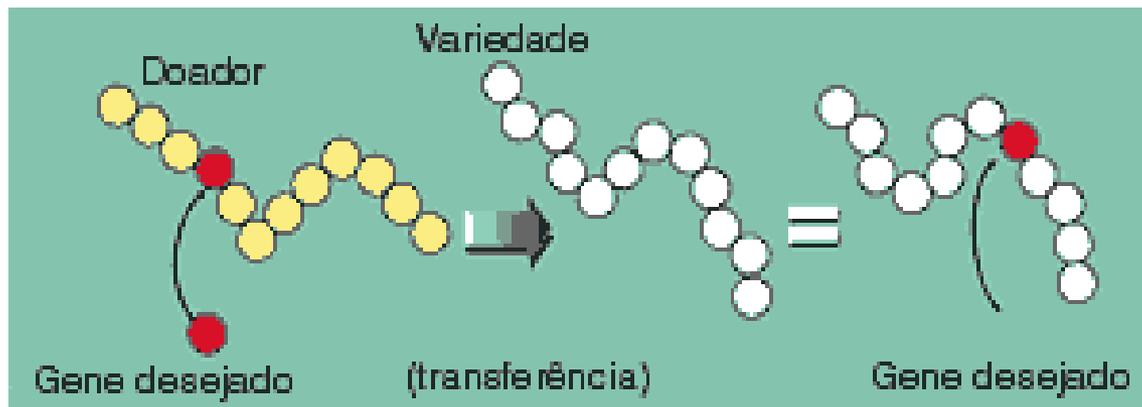
É o termo usado para descrever algumas técnicas modernas em biologia molecular afim de mudar a constituição genética das células vivas de tal modo que estas possam produzir novas substâncias.

# Engenharia Genética

## Melhoramento tradicional



## Melhoramento através da engenharia genética



# Engenharia Genética

- Não se limita a organismos de uma mesma espécie
- A compatibilidade sexual torna-se irrelevante
- Permite modificações em uma única geração, o que antes levaria dezenas ou centenas de gerações



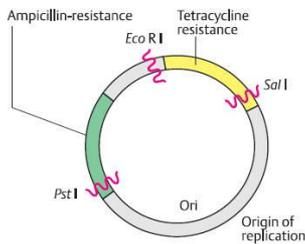
# Engenharia Genética

## Ferramentas

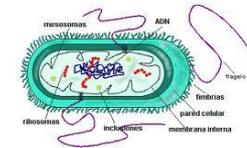
DNA



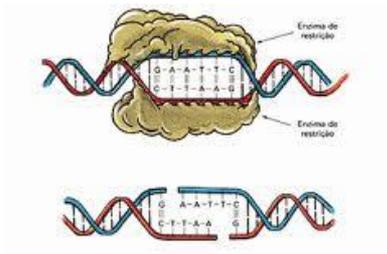
## plasmídeos (vetores)



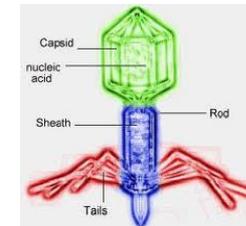
bactérias



## enzimas de restrição



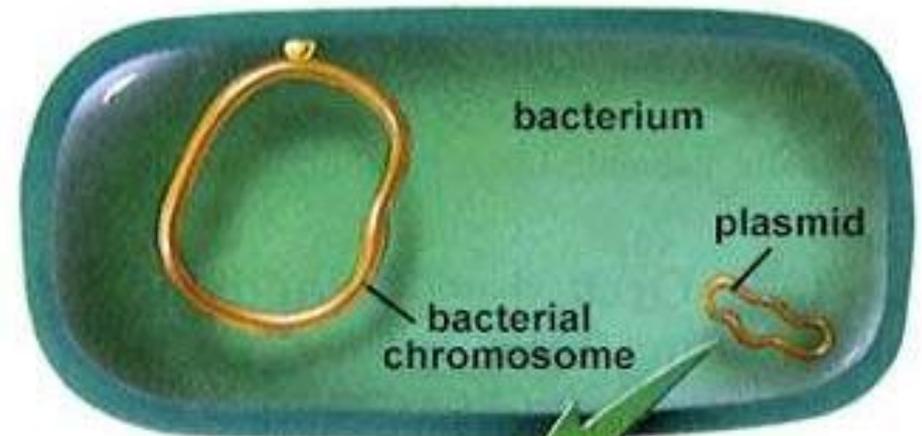
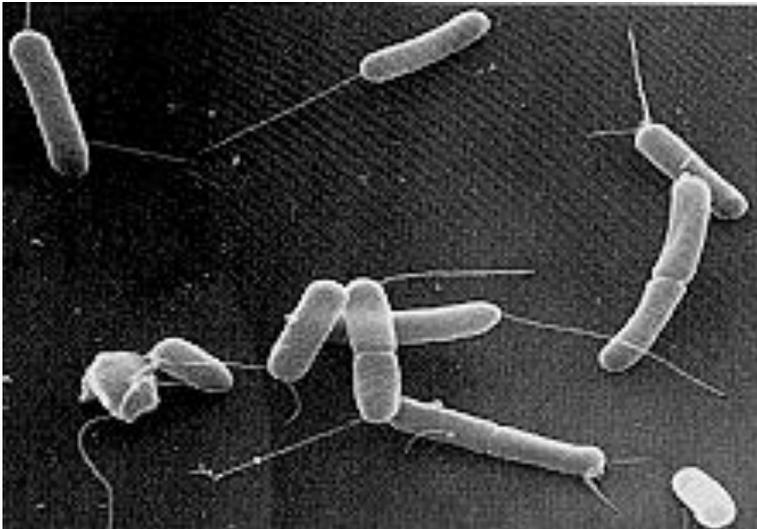
## doadores de DNA



# Engenharia Genética

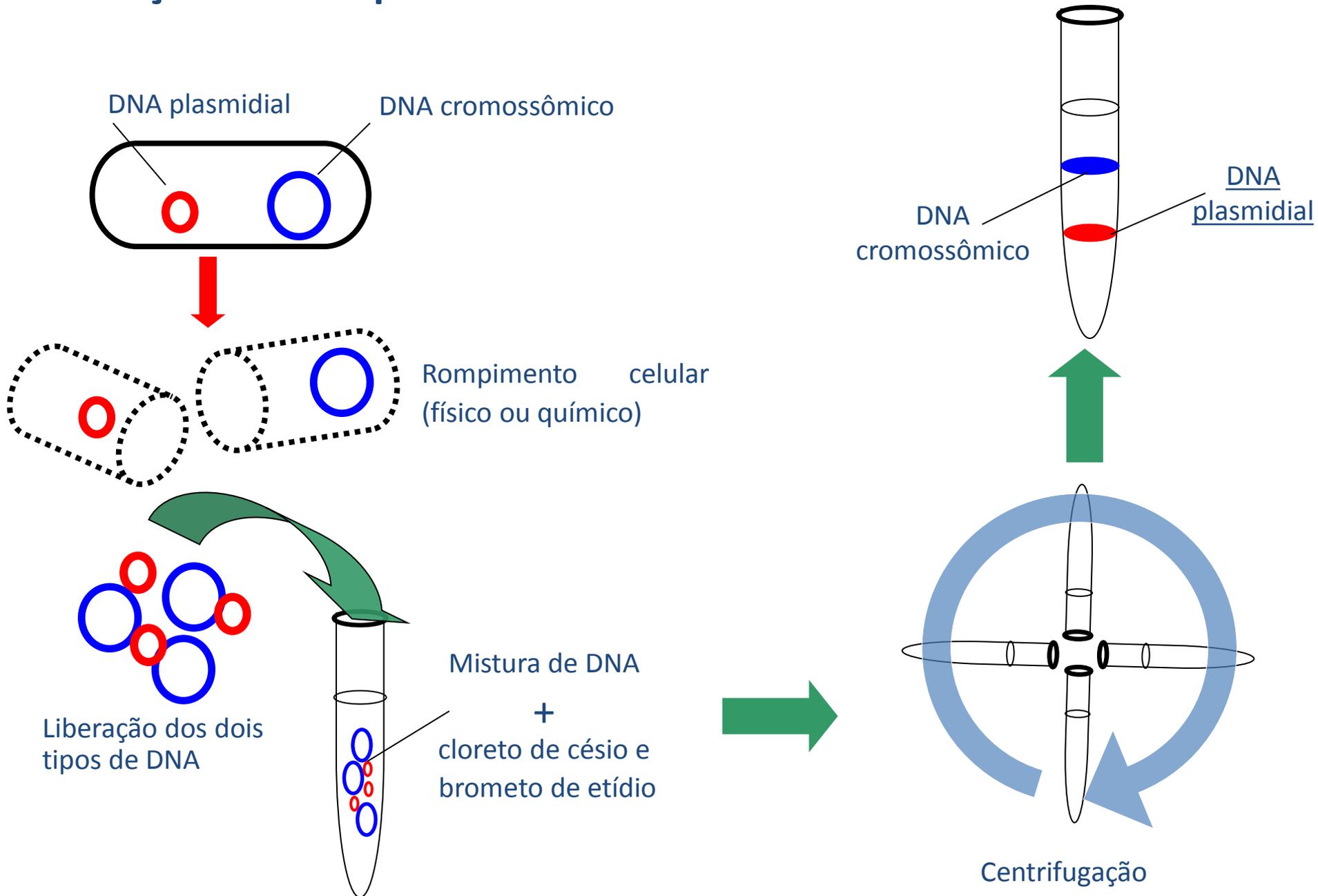
## Plasmídeos

Moléculas de DNA circulares que se replicam independentemente do cromossomo



1  $\mu\text{m}$

# Extração do DNA plasmidial



## Enzimas de Restrição

São encontradas nas bactérias e são utilizadas para cortar o DNA exógeno que possa penetrar em seu citoplasma

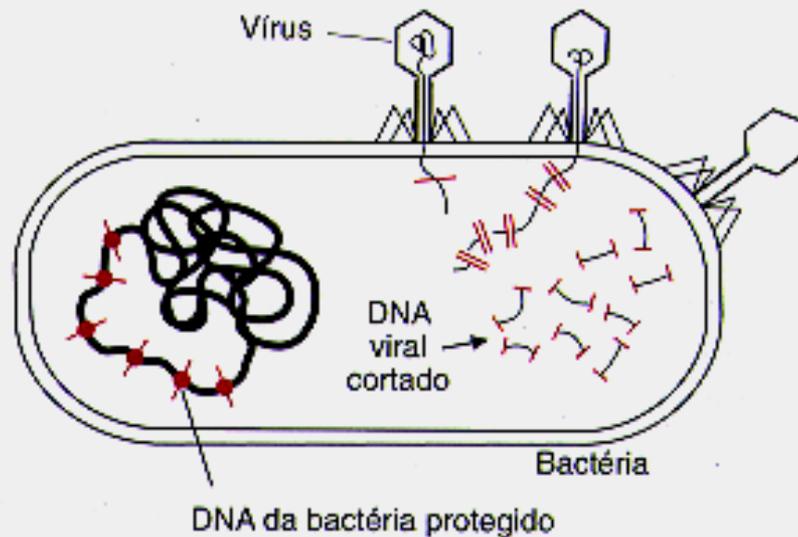


Figura 2.1 ■ Algumas linhagens de bactérias, resistentes à infecção viral, possuem enzimas de restrição capazes de cortar o DNA do vírus em seqüências específicas. Nesses mesmos pontos, o DNA da bactéria aparece protegido, evitando sua degradação.

## Enzimas de Restrição

Reconhecem e cortam o DNA em pontos específicos, geralmente em seqüências e 4 a 8 pares de bases, chamados palíndromos

ARARA  
ARARA

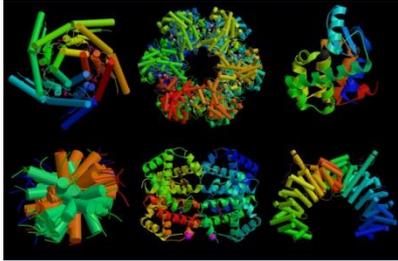
ANA  
ANA

OMO  
OMO

*EcoRI*: 5' ... TAGACT **GAATTC** AAGTC ... 3'  
3' ... ATCTGA **CTTAAG** TTCAG ... 5'

*HindIII*: 5' ... CAGGAT **AAGCTT** ATGC ... 3'  
3' ... GTCCTA **TTCGAA** TACG ... 5'

## Enzimas de Restrição



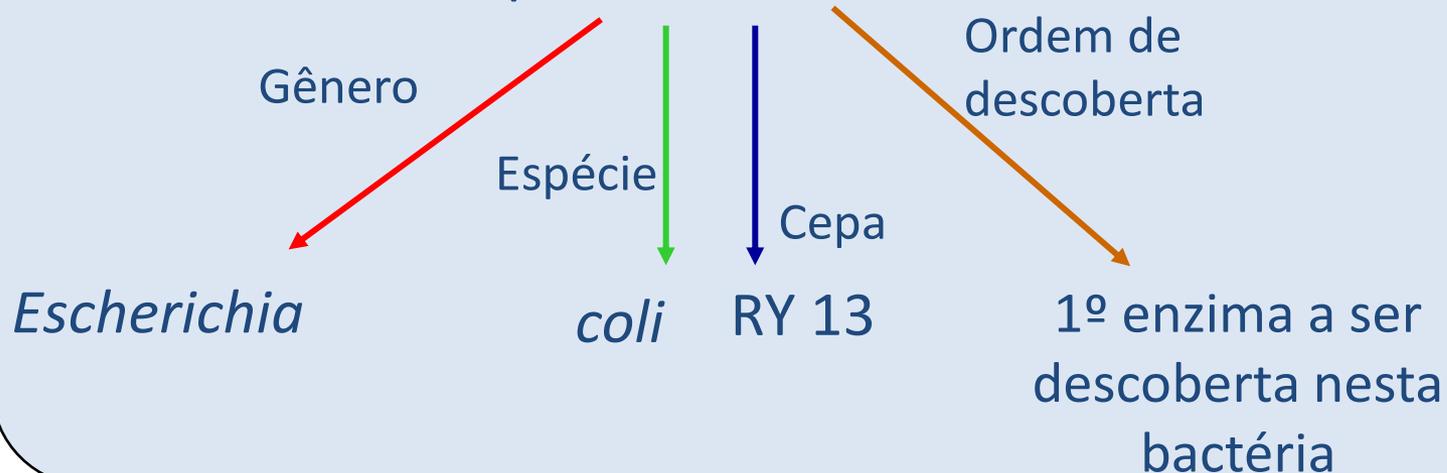
A descoberta das enzimas de restrição revolucionou a biologia molecular, pois possibilitou montar moléculas de DNA recombinantes e manipulá-las com extrema precisão

# Enzimas de Restrição

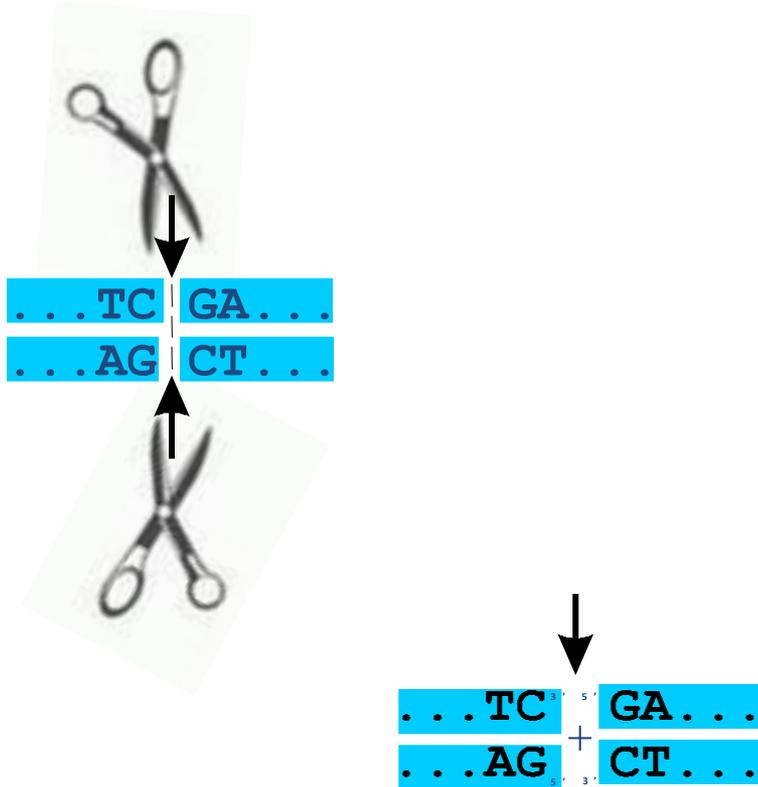
- Nomeclatura

- Nome específico do organismo:
- 1ª letra o gênero + 2 letras espécie = 3 letras
- próxima letra da identificação da cepa
- numeral romano indica ordem de identificação
  - *Escherichia coli* = *Eco* R I
  - *Haemophilus influenza* = *Hin* d III

## Exemplo: ***EcoR* I**

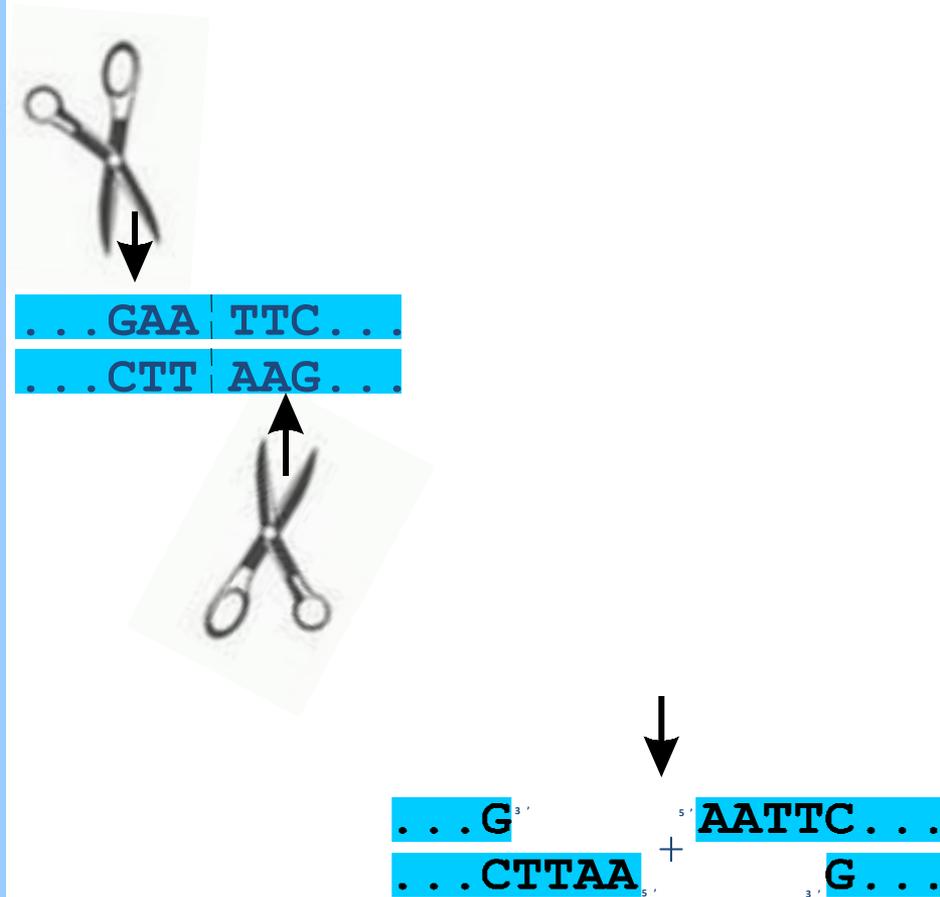


a) Clivagem no eixo de simetria



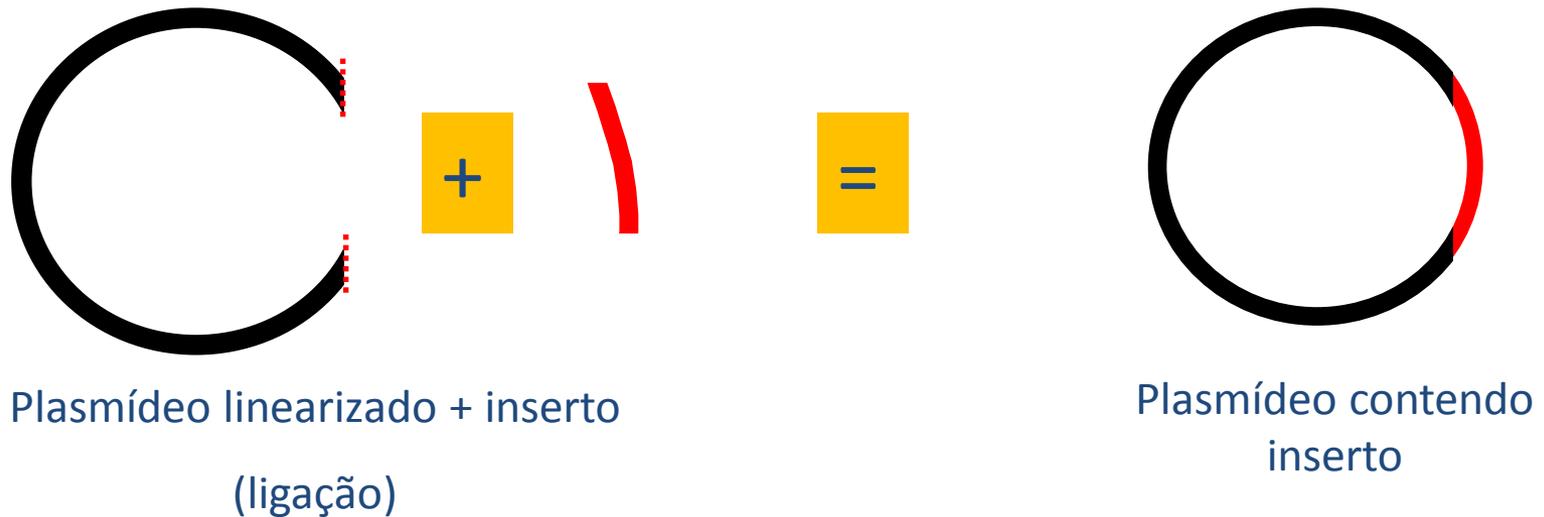
Moléculas com extremidades abruptas

b) Clivagem simetricamente situada ao redor do eixo de simetria



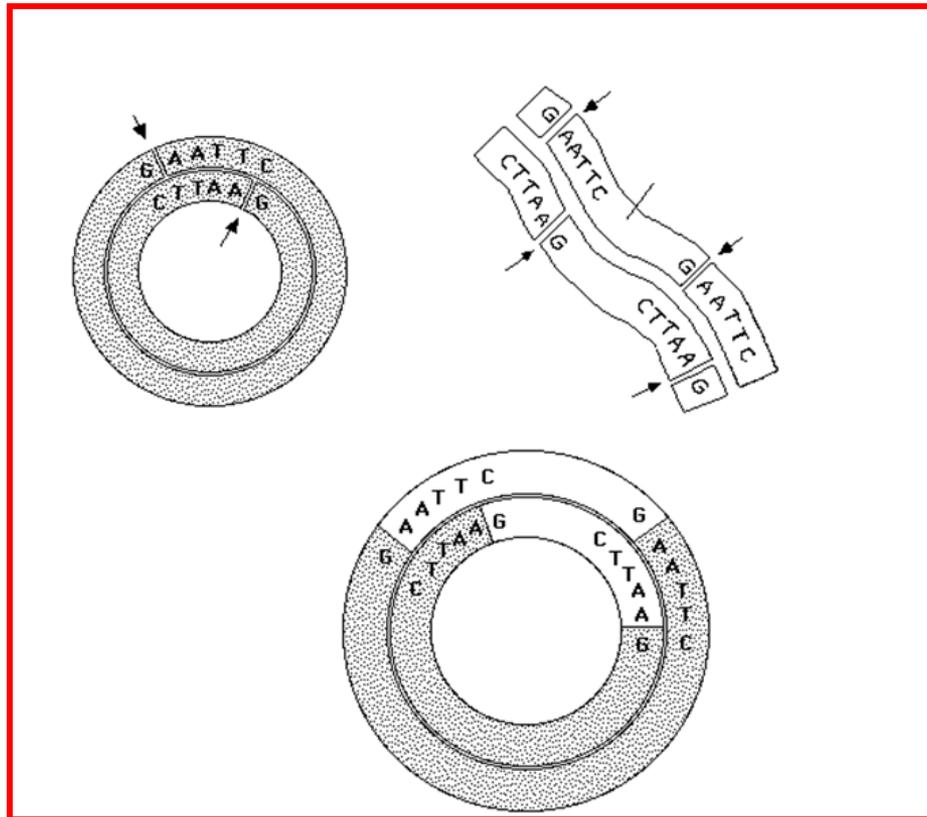
Moléculas com extremidades coesivas

## Tecnologia do DNA recombinante



# Tecnologia do DNA recombinante

- Detalhe da ligação do inserto no vetor

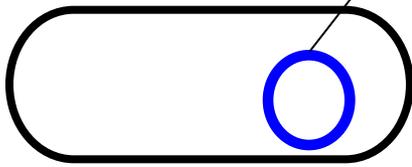


**- Enzima de restrição**

<https://www.youtube.com/watch?v=aA5fyWJh5S0&list=WL3C08E20DC356AEC7>

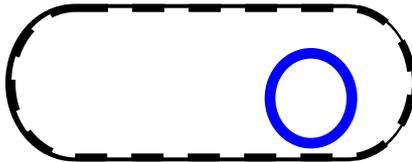
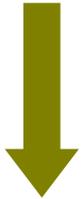
# Transformação

DNA cromossômico



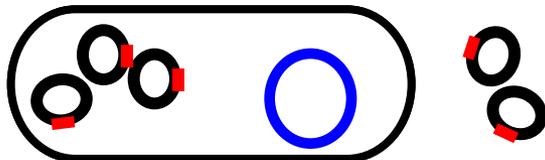
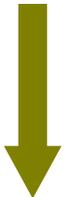
Células sob baixa temperatura

Adicionar o plasmídeo e aplicar pulso elétrico (eletroporação)



Permeabilidade celular é alterada

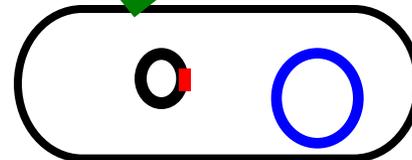
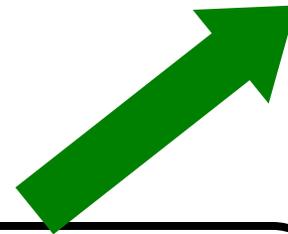
A bactéria retorna as condições normais de crescimento e o plasmídeo é replicado quando a bactéria se multiplica



*E. coli*

- cresce rapidamente a 37 °C (ciclo de 20 min)
- meio mínimo
- Ideal para produção em escala industrial

Produto de interesse

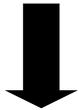


# Aplicações da Engenharia Genética

## Produção de insulina

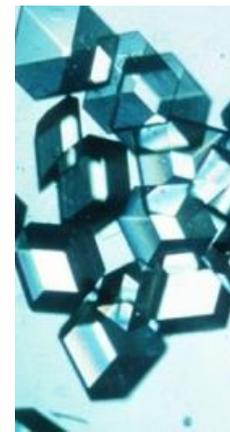
Extração de quantidades limitadas de insulina a partir de pâncreas de suínos.

- muito oneroso
- problemas com rejeições



Solução (1982): Transferência de genes codificantes da insulina humana para células bacterianas

- produção rápida e em larga escala
- mais barato e acessível
- sem problemas c/ rejeições (insulina humana)



# Aplicações da Engenharia Genética

## Degradação de óleo em acidentes ecológicos

*Pseudomonas putida* - 1ª patente de um microrganismo construído.

Inserção de vários plasmídeos



metaboliza

Cânfora  
Octano  
Xileno  
Naftaleno



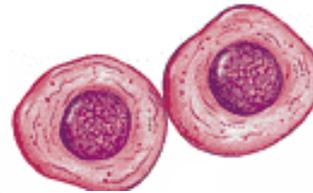
✓ Uso não liberado



✓ Preocupações legais sobre a liberação OGM no ambiente

Bactéria contendo DNA plasmidial (vetor)

Célula doadora



Vetor

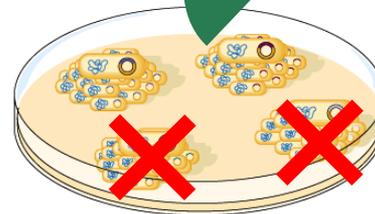
gene de interesse



Transformação

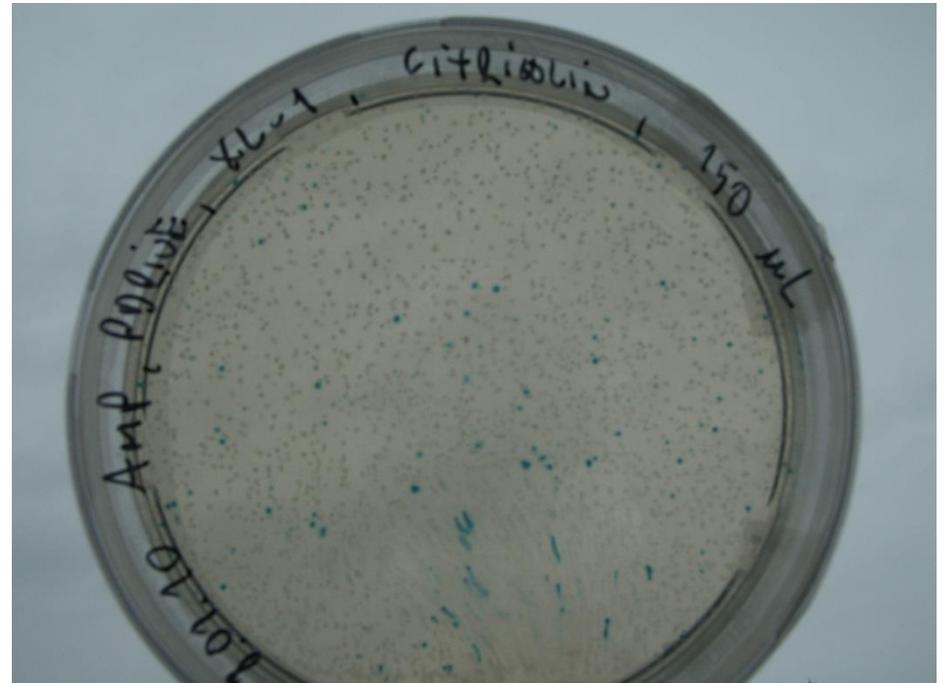
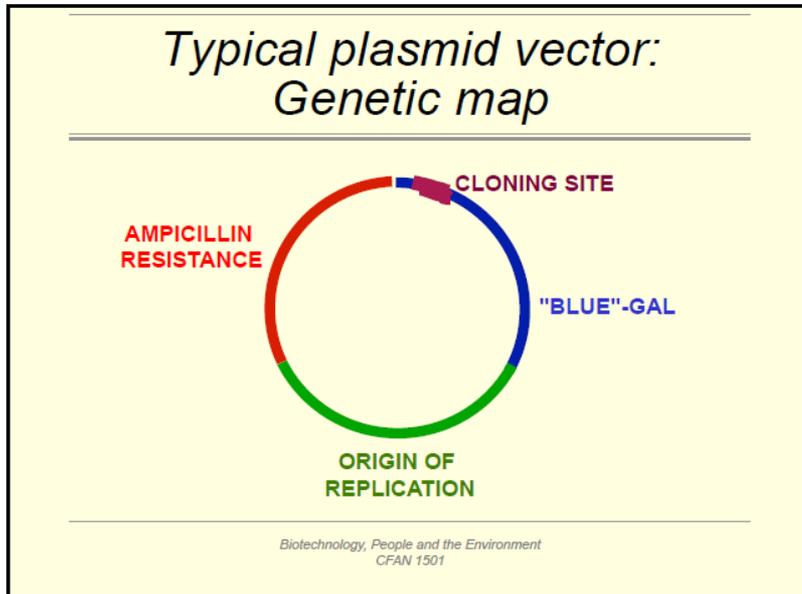


Produção em larga escala



Seleção

## Seleção de bactérias transformadas:



# Dificuldades envolvidas na clonagem

- 📄 As endonucleases de restrição podem cortar e destruir o gene em questão;
- 📄 Mais de um gene pode estar envolvido na expressão de uma característica particular;
- 📄 O gene pode ser inserido incorretamente no vetor resultando em uma falha na expressão do gene;
- 📄 A proteína pode apresentar-se dentro da célula como agregados grandes e insolúveis de forma irreversível;

 Um excesso na síntese de um dado produto do gene clonado pode ser letal para a célula;

 A célula receptora pode detectar e destruir o produto do gene;

 Pode ocorrer instabilidade plasmidial;

 Pode haver dificuldade na extração e purificação do produto do gene devido à presença de produtos naturais ou estruturas sintetizadas pela células receptoras.

# Organismos Geneticamente Modificados (OGM's)

“Organismos que tiveram a constituição genética modificada pela transferência de genes”

- Plantas transgênicas
- Animais transgênicos
- Microrganismos transgênicos



## Alguns exemplos de plantas transgênicas

- ✓ Tomate “longa vida” (Flavor saver)
  - ✓ Canola (óleo - qualidade/quantidade)
  - ✓ Milho (Milho Guardian)
- Gene *cryIA9(b)* (*Bacillus thuringiensis*)
- Resistência contra insetos
- ✓ Soja (Soja Roundap Ready)

Genes *epsps* (*Agrobacterium* spp)

Resistência ao herbicida glifosato



## **Alguns exemplos de organismos transgênicos**

### **Eventos aprovados no Brasil**

<http://cib.org.br/biotecnologia/regulamentacao/ctnbio/eventos-aprovados/>

# Como é feito um transgênico?

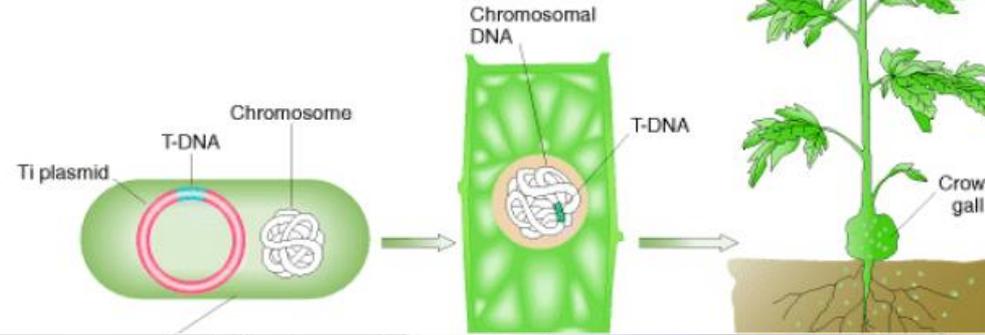
-Via *Agrobacterium tumefaciens*

[https://www.youtube.com/watch?v=L7qnY\\_GqytM](https://www.youtube.com/watch?v=L7qnY_GqytM)

- Via "gene gun"

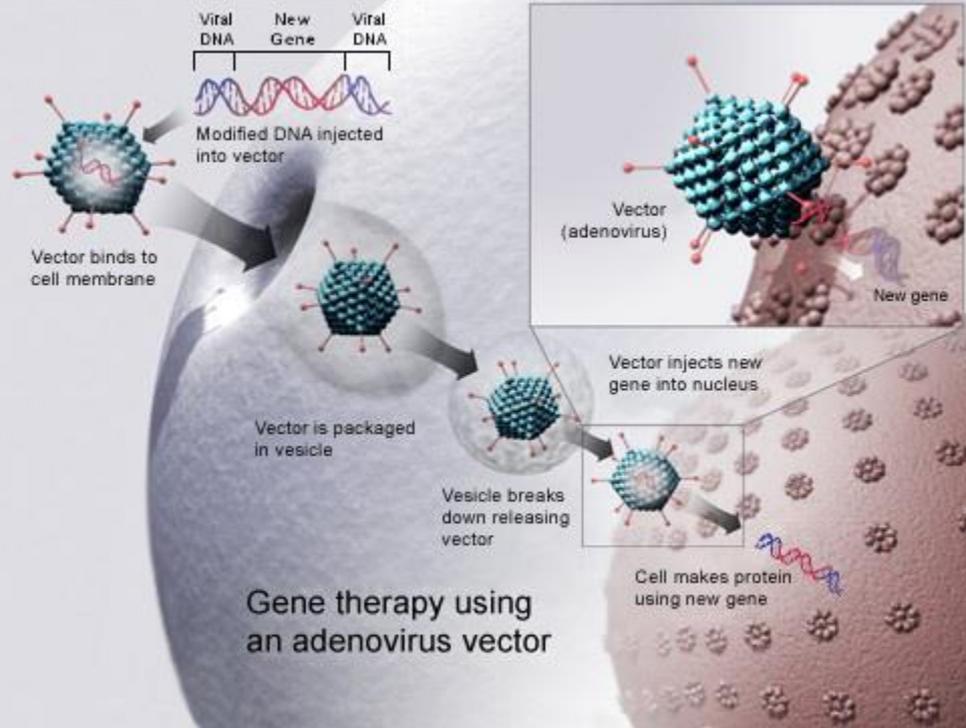
-Via eletroporação

-Via ...



<http://science.marshall.edu/harrison/research.html>

o.davidson





# Biossegurança

“Ciência voltada para o controle e minimização de riscos advindos da prática de diferentes tecnologias em laboratório ou quando aplicadas ao meio ambiente”

Fundamento básico – assegurar o avanço dos processos tecnológicos e proteger a saúde humana, animal e o meio ambiente

# Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)



- ✓ Órgão responsável pelo controle da tecnologia do DNA recombinante no Brasil
- ✓ Vinculada ao Ministério da Ciência e Tecnologia
- ✓ Lei de Biossegurança (Lei 8974) Janeiro/1995 (revogado)
- ✓ Reestruturado com Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005

## Competências da CTNBio (Lei nº 11.105/2005)



- **estabelecer normas para as pesquisas** com OGM e derivados de OGM;
- **emitir Certificado de Qualidade** em Biossegurança – CQB;
- **autorizar, cadastrar e acompanhar as atividades de pesquisa** com OGM ou derivado e autorizar a importação de OGM e seus derivados para atividade de pesquisa;

## Competências da CTNBio (Lei nº 11.105/2005)



- **estabelecer critérios de avaliação e monitoramento de risco** de OGM e seus derivados
- **proceder à análise da avaliação de risco, caso a caso**, para as atividades que envolvam OGM e seus derivados
- **classificar os OGM segundo a classe de risco**, observados os critérios estabelecidos no regulamento da Lei (Lei nº 11.105/2005)

## Competências da CTNBio (Lei nº 11.105/2005)

- **definir o nível de biossegurança a ser aplicado** ao OGM e os respectivos procedimentos e medidas de segurança quanto ao seu uso;
- **identificar atividades** e produtos decorrentes do uso de OGM **potencialmente causadores de degradação do meio ambiente** ou que possam causar riscos à saúde humana;
- **emitir decisão técnica**, caso a caso, sobre a biossegurança de OGM e seus derivados no âmbito das **atividades de pesquisa e de uso comercial de OGM e seus derivados**.

# Polêmica

Manifestações contra a Monsanto e o uso de OGMs.



## We Will March Against Monsanto!

<b>Where?</b> 428 cities in 58 countries	<b>When?</b> Saturday, May 25th, 2013	<b>Who?</b> 292,804 are going!	<b>Now What?</b> Let's get to 500,000!
---	--	-----------------------------------	---

We did it! Thank you all for participating to this first anti-Monsanto world march. There will be many more!



- 1. Scroll with your mouse to zoom in and out
- 2. Click on a marker to get more info about a march
- 3. Invite all your friends!

1,000+ attendees  
2,500+ attendees

We need organizers!  
Many events still need individuals to coordinate with the local police and plan precise march details (location, time and type of event), etc. Post on your Facebook event wall to get in



## **FACT # 9. Benefits offered by biotech crops.**

From 1996 to 2011, biotech crops contributed to Food Security, Sustainability and the Environment/Climate Change by:

- increasing crop production valued at US\$98.2 billion;
- providing a better environment, by saving 473 million kg a.i. of pesticides; in 2011 alone reducing CO2 emissions by 23.1 billion kg, equivalent to taking 10.2 million cars off the road for one year;
- conserving biodiversity by saving 108.7 million hectares of land;
- and helped alleviate poverty for >15.0 million small farmers and their families totaling >50 million people, who are some of the poorest people in the world.

<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/44/toptenfacts/default.asp>

# Riscos

- Introdução de genes nocivos indesejados
- Perda de controle da dispersão dos genes (fluxo gênico)
- Passagem dos genes de resistência a espécies infestantes
- Monopólio da produção de alimentos
- Uso de informações genéticas do indivíduo por empresas e governo
- Sequências de vírus na internet (bio-hackers)

# Questões éticas



Craig Venter

Venter está procurando patentear a primeira forma de vida criada pela humanidade, Mycoplasma Laboratorium.

Maio de 2010: primeira "vida sintética", molécula longa de DNA contendo todo um genoma de bactéria, e introduzida em outra célula

O organismo unicelular contém quatro "marcas" em seu DNA para identificá-lo como sintético e para ajudar a rastrear seus descendentes. As marcas incluem:

1. Tabela de códigos para o alfabeto inteiro com pontuações
2. Os nomes dos 46 cientistas que contribuíram
3. Três citações
4. endereço da web

<http://www.youtube.com/watch?v=99U0NESBJEQ&list=WL3C08E20DC356AEC7>

de 6:11 até 8:16

# Futuro?

Maior e mais rígida fiscalização pelo meio científico, governo e sociedade.