

Biodiversity Business Discovery

O uso de automação na exploração de novas moléculas

A biodiversidade brasileira é tema central, no que tange aos objetivos de conservação ambiental em fóruns mundiais. Além de atrair interesse de diversos setores da indústria global, ela é vista como patrimônio inestimável, com aplicações diversas, provendo um potencial de exploração comercial extenso àqueles que souberem fazer bom uso de seus recursos.

Estes recursos representam a maior riqueza nacional, contribuindo com pelo menos 20% de toda a biodiversidade do mundo. Nesse contexto, a sua exploração sustentável torna-se essencial ao desenvolvimento nacional. Entretanto, além da sustentabilidade ecológica é interessante que o processo seja economicamente viável, dessa forma, encontrar aplicações industriais para os recursos naturais explorados torna-se atrativo tanto para conservação quanto para o setor produtivo.

Para isso, se faz necessária a prospecção, identificação, caracterização e definição de aplicação dos compostos da biodiversidade brasileira. Tais atividades são alcançadas pela utilização de diferentes métodos e tecnologias envolvendo pesquisa básica, como coleta de espécimes, identificação morfológica e caracterização gênica.

Entretanto, apenas a classificação da diversidade não garante a sua utilidade como fonte de moléculas, ou compostos de interesse. Para tanto, estes compostos devem ser submetidos a diversos ensaios que busquem responder e definir seu emprego na indústria. Estes ensaios podem, inicialmente, basear-se em buscas in silico (métodos computacionais), os quais podem utilizar de inteligência artificial.

No entanto, análises in silico também não são suficientes per se, havendo a necessidade da adoção de metodologias experimentais aplicadas nessa busca e descoberta de novas oportunidades de mercado, que estão escondidas na biodiversidade.

Ensaio laboratoriais, mesmo que otimizados, são laboriosos e dependem de pesquisadores treinados. Além disso, a sua execução é limitada pela capacidade humana de realizar um grande número de tarefas, simultaneamente, e, nesse contexto, a automação atua como aliada e uma ferramenta valiosa, sendo capaz de operar ininterruptamente, aumentando a processividade de amostras. A automação resulta, então, em uma triagem eficiente, podendo atuar com menor quantidade de insumos e recursos, além de ser apta a triar bibliotecas de compostos com grande número de exemplares.

Métodos laboratoriais desenhados para triagem em alta processividade também são chamados de High throughput-screening (HTS). Atualmente, uma gama de métodos comerciais está disponível para diferentes aplicações, como por exemplo, para identificação de moléculas com potencial farmacêutico. Além disso, métodos laboratoriais podem ser elaborados e traduzidos para serem executados em HTS, tornando a busca por compostos de interesse da biodiversidade uma atividade mais eficiente.

Nesse contexto, o ISI B&F propõe a criação de uma agenda de discussão e plataforma chamada Biodiversity Business Discovery (BBD), na qual, através de metodologias computacionais e laboratoriais automatizadas, podemos definir e descobrir a utilidade para diferentes compostos provenientes da biodiversidade brasileira. Essa plataforma se apoia na criação de diferentes pipelines, os quais são capazes de identificar moléculas e compostos com atividades de interesse, para diferentes setores industriais, incluindo o setor farmacêutico, agroindustrial, cosmético, ou óleo e gás. Finalmente, para alcançar os objetivos propostos, o Instituto reconhece ser necessária a construção de redes de cooperação, principalmente com iniciativas governamentais e privadas, que já estão atuando e explorando alternativas sustentáveis de bioeconomia.

O potencial da biodiversidade nacional

O Brasil é um país de proporções continentais, estendendo-se por mais de 8 milhões de quilômetros quadrados, ocupando quase metade de todo o território da América do Sul. A sua vasta extensão longitudinal e as suas demais características geográficas traduzem-se em uma grande diversidade de climas e vegetação, que refletem as características únicas dos biomas que compõem o país.

O IBGE reconhece seis biomas distintos que constituem o território brasileiro: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa, que juntos abrigam uma variedade de espécies de animais, plantas, fungos e microrganismos, que conferem ao país o título de detentor da maior biodiversidade do mundo.

De acordo com o relatório elaborado pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos¹, comissionado pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, em 2020, o desenvolvimento de cadeias produtivas sustentadas na biodiversidade dos biomas brasileiros deve constituir uma missão estratégica para o país, orientada à solução do desafio, que é permitir ao país o uso da bioeconomia a seu favor, de modo a promover o crescimento econômico, em bases sustentáveis, a melhoria da qualidade de vida da sociedade como um todo, e assegurar a proteção do meio-ambiente.

Cada um dos biomas brasileiros apresenta oportunidades e desafios únicos (Box 1, Figura 1). Com um foco maior, a conservação e o adequado uso da Biodiversidade Amazônica apresentam muitos desafios que somente com parcerias podem ser direcionados. Até hoje, ainda não temos uma proposta para aquele que talvez seja o maior desafio quando se trata de Amazônia, ou seja, um modelo capaz de aliar a conservação da floresta, com o desenvolvimento local e a geração de negócios internacionais.

Associada a esta biodiversidade existe uma vasta coleção de compostos naturais com enorme potencial para aplicações nas diversas indústrias que compõem a bioeconomia. Microrganismos, plantas, animais e fungos, há décadas, são conhecidamente produtores de diversas moléculas e metabólitos secundários, com potencial atuação como fármacos, biopesticidas, biofertilizantes, cosméticos, fragrâncias, corantes, dentre outros. Observa-se, portanto, que a biodiversidade brasileira é um recurso natural de imenso valor, comparável, ou até superior, ao que o país já explora em termos de agricultura, de reservas minerais e de petróleo, mas que ainda tem sido drasticamente subaproveitado.

Centro de Gestão e Estudos Estratégicos- CGEE. Oportunidades e Desafios da Bioeconomia. Proposta de modelo de governança para a bioeconomia brasileira. Brasília, DF: 2020. 34 p.

20% da Biodiversidade Mundial:
116.000 espécies animais
46.000 espécies vegetais



A **Mata Atlântica** é um bioma, que abriga mais de 60% da população brasileira e retém 1/3 da biodiversidade, centrado nas atividades agrícolas e extrativismo predatório, para favorecer o crescimento urbano acelerado.

O **Cerrado** abriga o berço das nascentes hídricas do país e é a savana mais biodiversa do mundo. Espécies endêmicas encontram-se em risco de extinção pelo modelo de economia adotado pelo setor agropecuário na região.

A **Caatinga** é um bioma repleto de oportunidades em espécies vegetais, animais e microbiológicas, mas que oferece desafios nas formas de estresses hídricos e temperaturas elevadas.

O **Pantanal** é marcado pela biodiversidade trazida pela característica alternância entre períodos de escassez hídrica e de regiões alagadas pelas chuvas, mas que recentemente tem sido fortemente ameaçado por incêndios e queimadas.

O **Pampa**, foi severamente reduzido pela atividade agrícola – particularmente pela monocultura de eucalipto – e oferece oportunidades tanto pela biodiversidade nativa e pouco caracterizada, quanto pelo relevo ideal a outras atividades econômicas, como a pecuária sustentável.

A **Amazônia** representa cerca de 50% do território nacional, no entanto gera menos que 8% do PIB nacional, além de estar sobre forte ameaça de uso predatório dos recursos naturais.

Moléculas identificadas na biodiversidade brasileira

Dentre as aplicações da biodiversidade, na produção de moléculas de interesse, o mercado farmacológico possui um alto valor de retorno. Entretanto, até hoje, são raros os exemplos de compostos naturais, derivados de espécies nativas brasileiras, a alcançar o mercado mundial. Um destes exemplos é a bradicinina, importante droga, com efeito anti-hipertensivo, isolada da peçonha da jararaca-da-mata (*Bothrops jararaca*), que é o princípio ativo do captopril, o qual alcançou um mercado de 536,6 milhões de dólares, com um CAGR de 17,5%, até 2028 (“Captopril API Market Report | Global Forecast From 2023 To 2031”).

Outro caso de destaque é a pilocarpina, droga que tem sido usada, com sucesso, em forma de colírio, para o tratamento do glaucoma, que pode ser obtida das folhas do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), árvore arbustiva do Norte e Nordeste do país. Para mais, outra molécula de interesse é o lapachol, uma naftoquinona isolada do ipê-rocho (*Tabebuia* spp., *Bignoniaceae*), árvore nativa brasileira, empregada no século XIX para tratar casos de malária e, posteriormente, utilizada como protótipo para síntese do fármaco atovaquona (droga anti-malárica). Além disso, o lapachol têm sido usado como tratamento anticâncer, pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (BARBOSA; NETO, 2013; MONIKA, 2023).

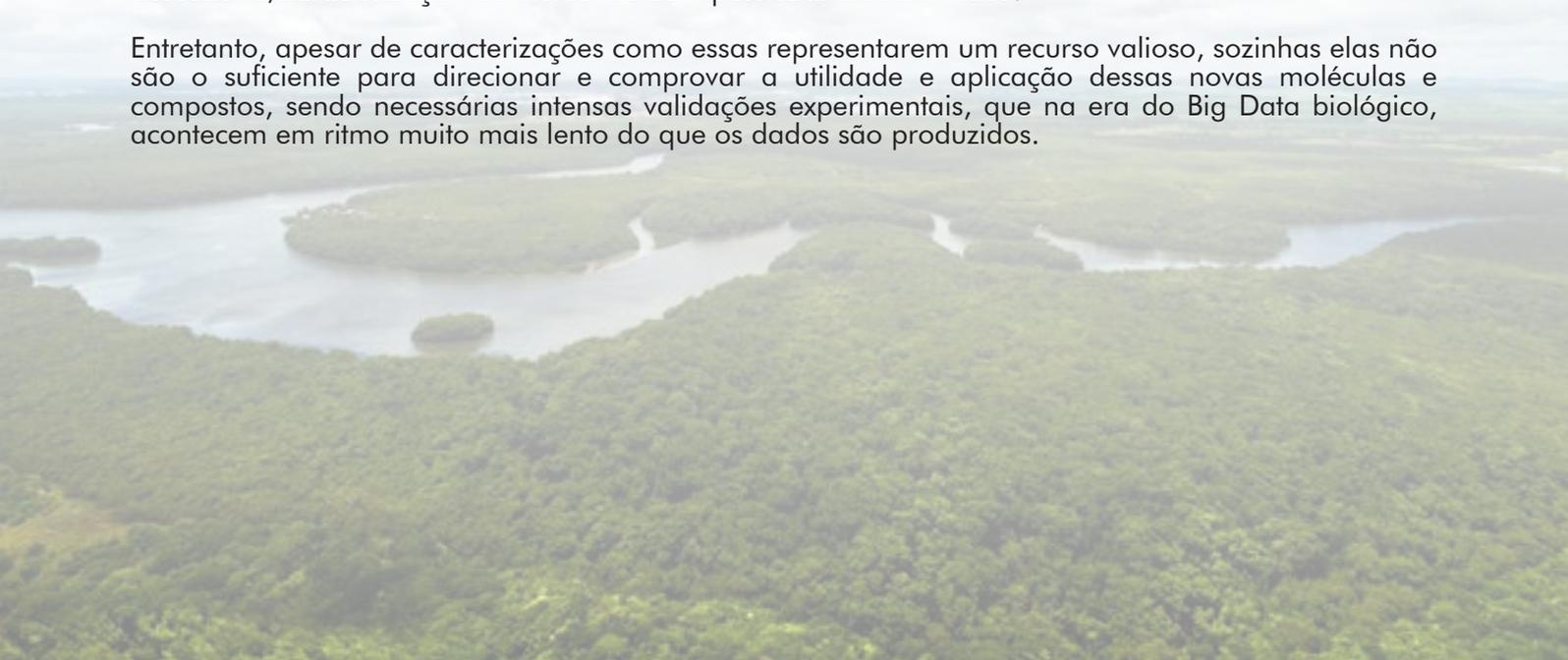
A empresa farmacêutica Ache também teve êxito em levar ao mercado um produto derivado da biodiversidade brasileira: o creme Acheflan (princípio ativo: alfa-humuleno), um fitoterápico com atividade anti-inflamatória, indicado para o tratamento de tendinites e dores musculares. Este produto foi preparado a partir da erva-baleeira (*Cordia verneacea*), planta encontrada na costa brasileira, previamente utilizada na medicina tradicional. Em parceria com a professora Vanderlan da Silva Bolzani, e outros pesquisadores, foi encontrada aplicação para o composto, que apresenta atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo, hoje, o líder de vendas de medicamento dessa categoria. De acordo com a professora, esse foi o primeiro anti-inflamatório desenvolvido inteiramente no Brasil (GUIMARÃES, 2011; BODINI et al., 2020).

Apesar de escassos, os exemplos acima demonstram o potencial da utilização da biodiversidade como fonte de novas moléculas, para tratamento de diversas doenças, que acometem tanto o cenário nacional, como o mundial, apresentando um potencial de mercado expressivo.

A adição de novas moléculas ao repertório acima é essencial para um desenvolvimento crescente, cada vez mais apoiado na bioeconomia, deixando evidente a demanda urgente, para mais estudos que permitam a caracterização da biodiversidade brasileira. As chamadas tecnologias ômicas, combinadas a partir do sequenciamento genético e da química analítica, são uma possibilidade de resposta inicial a essa urgência, fornecendo as ferramentas e dados necessários, para a descoberta em alta capacidade, e processividade de novas moléculas e produtos naturais, com potencial aplicação ao mercado, escondidos dentro da biodiversidade.

Dentro deste contexto, o Instituto SENAI de Inovação em Biossintéticos e Fibras (ISI B&F), possui uma estrutura completa de sequenciamento genético de primeira, até terceira geração (Sanger, Illumina™ e PacBio™), assim como, expertise na análise de dados, podendo aplicar a gama de informações na descoberta/caracterização de moléculas com potencial bioeconômico.

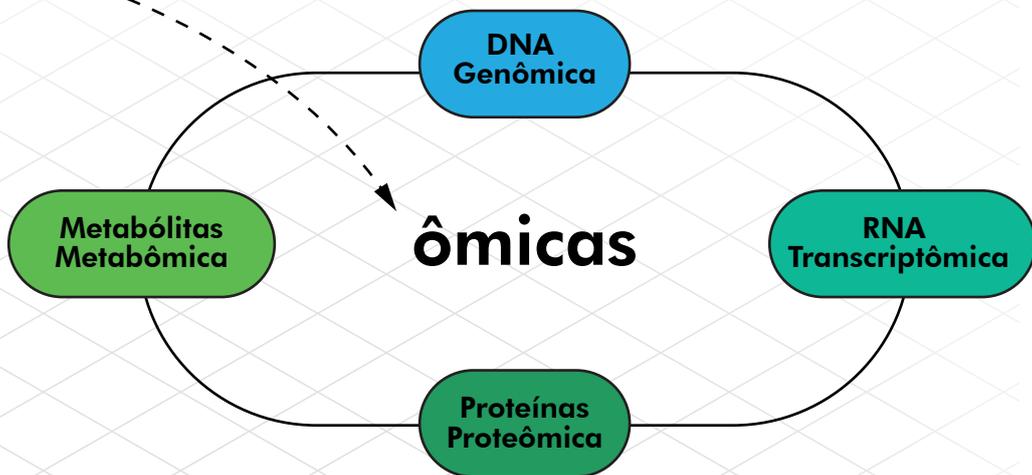
Entretanto, apesar de caracterizações como essas representarem um recurso valioso, sozinhas elas não são o suficiente para direcionar e comprovar a utilidade e aplicação dessas novas moléculas e compostos, sendo necessárias intensas validações experimentais, que na era do Big Data biológico, acontecem em ritmo muito mais lento do que os dados são produzidos.



Assim como a biodiversidade brasileira é enorme, também é o desafio de validar, experimentalmente, quais agentes biológicos possuem efeitos nos alvos de interesse. Para efeitos de bioprospecção, os agentes biológicos podem ser considerados quaisquer extratos, frações, misturas, ou até moléculas isoladas de animais, plantas, fungos, bactérias, ou outros microrganismos que, isoladamente, ou em comunidade, possuem uma biblioteca única de compostos químicos a depender também de sua origem, processamento ou concentração. Desse modo, encontrar uma relação de causa e efeito de um agente, em um alvo experimentalmente, é bastante desafiador, sem o auxílio de outras tecnologias que favoreçam essas buscas. Atualmente, ferramentas como screening virtual utilizam bases de dados online (bibliotecas de compostos), e são capazes de testar as propriedades bioativas de moléculas in silico, com o objetivo de reduzir os possíveis candidatos a serem levados a diante em uma triagem experimental.

Entretanto, mesmo com os indícios de análises in silico, os potenciais ainda hits devem ser posteriormente validados experimentalmente (SANTANA et al., 2021).

Amostra Ambiental



Dados



Alto volume de dados que dificulta a curadoria e a HTS viabiliza testar com menores custos por amostra; além da possibilidade de miniaturização de ensaios.

Screening virtual

HTS



Triagem com operador



Triagem Automatizada

A solução para este desafio é a realização de uma abordagem sistemática, para se identificar novos compostos biológicos, na qual uma triagem de uma biblioteca de compostos presentes nos agentes biológicos seja identificada. Para isso, a automação participa como componente principal na aplicação de diferentes métodos de identificação para triagem de bibliotecas, podendo ser adaptado a depender da finalidade do produto.

É importante ressaltar que, muitas vezes, a automação atua não apenas como facilitadora de um processo, mas como indispensável para o sucesso de projetos dificilmente escalonáveis. Um bom exemplo é o desenvolvimento da rota sintética de produção de 1,3-propanodiol da Dupont, que exigiu esforços equivalentes a 575 anos homem e investimentos, para serem finalizados. A automação, nesse contexto, poderia ser em tempo hábil e com menor investimento obter êxito (CARBONELL; RADIVOJEVIC; GARCÍA MARTÍN, 2019).

Na indústria farmacêutica, essa abordagem é conhecida como drug discovery, utilizada para descobrimento de novos fármacos e seus mecanismos de ação, sendo tradicionalmente realizada a partir da biblioteca de compostos naturais, mas também podendo ser realizada a partir de semissintético, ou totalmente sintéticas. Ademais, como mencionado, essa abordagem sistemática pode ser aplicada a outras indústrias, na intenção de aumentar o espectro de compostos com interesse industrial e econômico. Podemos destacar dentre essas indústrias a de higiene pessoal, perfumaria e de cosméticos (HPPC), papel e celulose, (bio)energia entre outras.

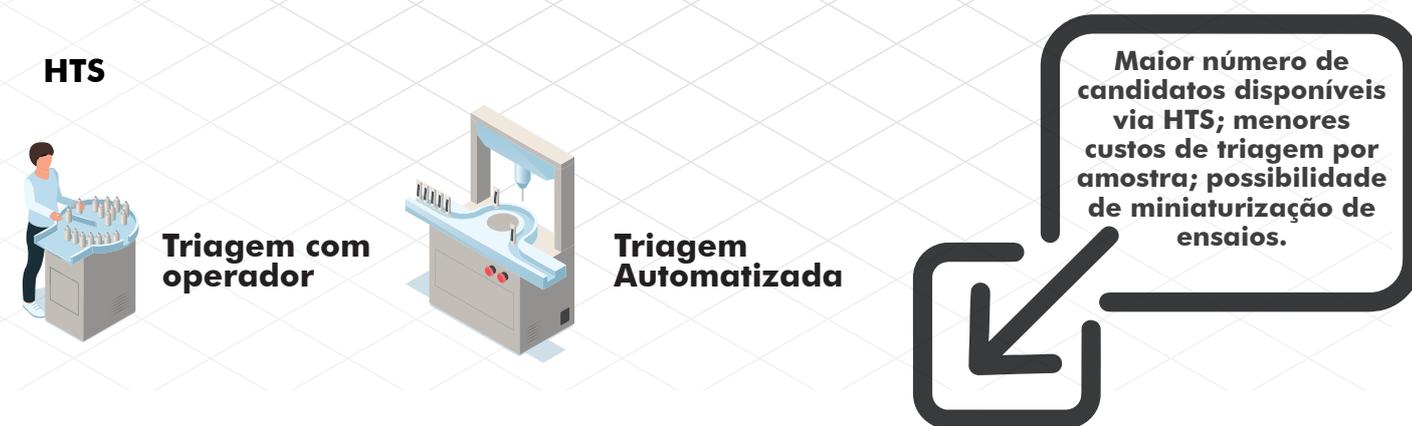
Considerando a riqueza disponível em nossa biodiversidade, se faz necessário o desenvolvimento de pipelines que sejam capazes de cobrir um grande volume de amostras e dados. A etapa de triagem em alta performance (High Throughput Screening, HTS) tem a função de identificar os hits mais promissores, ou seja, quais compostos possuem efeito desejado dentro do ensaio executado. A aplicação industrial de HTS também tem por objetivo a redução de custos no processo de identificação de novas moléculas, como já é frequentemente visto na indústria farmacêutica (ALDEWACHI et al., 2021).

Neste setor, é comum a associação de HTS a outros métodos bem estabelecidos, dessa forma a indústria farmacêutica tem conseguido manter um output anual de aproximadamente 20 NMEs (new molecular entities), dos quais de 3-4 por ano seriam moléculas inéditas, as quais seriam as primeiras representantes em sua classe (MACARRON et al., 2011).

Como um exemplo de aplicação, seria a busca por proteínas que apresentem atividade enzimática de xilanase, para isso pode ser desenhado um experimento de hidrólise enzimática in-vitro onde os hits positivos são os candidatos (linhagens, enzimas etc.) que apresentam atividade hidrolítica da xilana. O experimento pode ser performado pelos equipamentos de automação e a leitura, ou resultado, será indicativa de atividade hidrolítica, sendo esta, geralmente, um resultado de fácil e rápida interpretação.

Empresas, com experiência na aplicação de HTS, são capazes de otimizar o seu tempo e investimento em uma determinada linha de pesquisa, um bom exemplo foi relatado pela Amyris, a qual selecionou através de uma triagem HTS, uma levedura para aplicação em processo fermentativo. O fato de triar centenas de milhares de linhagens facilitou a identificação da melhor linhagem, o que resultou em uma celeridade de 80% para aplicação no mercado e redução de 90% do custo de P&D ("A Breakthrough for High-Throughput Screening - Amyris").

Uma grande diversidade de novas moléculas de interesse comercial pode ser descoberta por ensaios HTS, através de análises de fluorescência, absorvância, biossensores, sensores eletroquímicos, espectros de infravermelho, tensão superficial, entre outras análises. A Figura 2 mostra o fluxo de trabalho que uma típica triagem em HTS funciona.



Aplicação da automação no contexto de PD&I

Na década de 1990, equipamentos robóticos, que tradicionalmente foram desenhados para laboratórios de produção, como os laboratórios clínicos, passaram a ser programados para realizar tarefas repetitivas dentro do contexto de PD&I. Esses equipamentos, conhecidos como liquid handlers, são capazes de manipular amostras, reagentes e recipientes dentro de um ambiente controlado e são programáveis para seguir instruções de execução de uma metodologia preparativa, ou analítica.

Desde então, as tecnologias de precisão de liquid handlers evoluíram rapidamente, a ponto de ser possível miniaturizar reações para maior rendimento de reagentes, ou mesmo uso de amostras raras e pouco abundantes. O ISI Biossintéticos e Fibras possui uma gama de equipamentos de liquid handling, equipados com módulos de incubação em temperatura, agitação, sistemas óticos de detecção de sinais colorimétricos, ou fluorimétricos, que podem ser integrados para um fluxo de trabalho de triagem de compostos da biodiversidade brasileira. Abaixo, seguem os principais equipamentos disponíveis:



BIOLECTOR: Microbiorreator microflúídico com pH individual contínuo e controle de alimentação. O BioLector Pro combina a tecnologia BioLector escalável com um chip microflúídico.

CYTOFLEX: A citometria de fluxo é uma tecnologia que permite análise simultânea e multiparamétrica de células ou partículas em suspensão, avaliando-as individualmente.



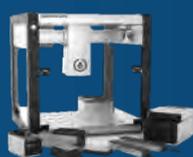
VARIOSKAN: O equipamento vem equipado com diferentes tecnologias de medição em tempo real, incluindo absorção e intensidade de fluorescência com luminescência para 96 amostras simultâneas.

COLONY PICKING: Equipamento especializado em selecionar e contar colônias microbianas com alta precisão e velocidade. Possui detecção de fluorescência e variação de morfologia celular.



NANODROP EXPRESS: Dispensador de pressão positiva automático de baixos volumes para manipulação de líquidos. São capazes de aspirar e dispensar líquidos de maneira automatizada na escala de microlitros ou nanolitros.

HAMILTON STAR: braços robóticos onde podem ser adicionados módulos de temperatura, magnéticos e de agitação de forma customizada. Possui capacidade de empilhamento de amostras e duas cabeças de pipetagem, uma de 8 canais (1-1000 μ L) independentes e outra de 96 canais.



OT-2 OPENTRONS: Robô capaz de automatizar protocolos de pipetagem com funções de aquecimento e magnético, podem ser aplicados em: Biologia molecular, Diluição Seriada, Aliquotagem, Preparação de Bibliotecas NGS e ELISA. Programação em Python.

A união de uma abordagem sistemática de HTS da biodiversidade com a automação laboratorial é bastante sinérgica e existem algumas grandes vantagens. Dentre elas, destacam-se para triagem de compostos da biodiversidade:

- Não é necessário conhecer detalhes da natureza/origem do agente que possui o efeito procurado.

Por exemplo, em uma biblioteca de linhagens bacterianas isoladas, ou de seus extratos e frações, não é necessário o conhecimento da espécie bacteriana, para que seja possível atribuir o efeito desejado de um surfactante em um ensaio colorimétrico, uma vez que a resposta é universal (YANG; YU; SHEN, 2015).

- É possível aumentar em ordens de grandeza o número de candidatos em relação a ensaios manuais.

Ensaio manuais conseguem processar, no máximo, de centenas a milhares de amostras ($10^3 - 10^4$), já ensaios automatizados partem de milhares e dezenas de milhares de amostras ($10^4 - 10^5$), podendo ainda atingir bilhões de amostras, no caso de metodologias de cell sorting ($10^7 - 10^9$). Para metodologias de sequenciamento essa vantagem é grande devido ao laborioso fluxo de extração de DNA e preparação de bibliotecas (ZENG et al., 2020).

- Redução e rastreabilidade de erros.

A execução de ensaios manuais tende a apresentar mais erros comparado ao procedimento automatizado, devido ao operador humano. Esse tipo de erro é natural e mesmo um operador bem experiente possui falha e variação de produtividade, dependendo de várias condicionantes (YEOW et al., 2014). Ao contrário, um robô automatizado, quando comete erros, geralmente, são sistemáticos, o que permite a facilidade de rastreabilidade e correção.

High Troughtput Screening aplicada à biodiversidade

Finalmente, tratando-se de aplicações, diversos estudos já foram realizados para descobrimento de moléculas funcionais da biodiversidade. A seguir, são descritas algumas aplicações práticas do screening utilizando HTS.

Surfactantes

Moléculas versáteis para a indústria, os surfactantes possuem diferentes aplicações na linha de produção. Seja para a emulsificação de formulações, ou como agente dispersante, é possível desenhar moléculas diferentes para atender a demanda.

Biossurfactantes são alternativas renováveis aos tradicionais surfactantes químicos, sendo produzidos por microrganismos, ou derivados de matéria-prima biológica (principalmente óleos vegetais). Além de serem uma opção mais “verde” aos tensoativos petroquímicos, essa nova categoria de produtos é mais biodegradável, mais eficiente e menos agressiva ao meio ambiente.

Biossurfactantes já são comercializados por empresas como Evonik, Unilever, Dow, BASF e Solvay, porém estima-se uma tendência de aumento no mercado, nos próximos anos (NAGTODE et al., 2023).

Apesar da complexidade do escalonamento de processos para produção de biossurfactantes de origem microbiana, grande parte dos mais promissores estão cobertos no cenário de propriedade intelectual. Isso torna os avanços em PD&I de novos processos, para produção de biossurfactantes, mais difícil. Desta forma, a triagem da biodiversidade de microrganismos produtores de biossurfactantes, ou até de novas moléculas tensoativas, é estratégia promissora para quem deseja entrar nesse mercado.

Microrganismos produzem biossurfactantes em diferentes situações: produção contra outros organismos, aumento da solubilidade de nutrientes, formação de biofilmes, melhoria da motilidade, etc (CHRZANOWSKI; ŁAWNICZAK; CZACZYK, 2012).

As avaliações direta, indireta, qualitativa, ou quantitativa, de biossíntese de biossurfactantes, frequentemente, avaliam o sobrenadante de cultivos (brutos, ou, em alguns casos, purificados). Para busca de novas moléculas com potencial surfactante, tais avaliações são diversas e variam de acordo com o objetivo de cada ensaio. Um fluxo de trabalho em HTS deve apresentar uma resposta rápida, facilmente detectável (como alteração de absorbância), sem a exigência de processamentos longos, ou complexos.

Walter e colaboradores (2010) fizeram um compilado de metodologias para a identificação de surfactantes em HTS. Dentre elas, destacam-se as metodologias em microplacas com alteração do caminho ótico da luz pela ação do surfactante em água. Estes autores também descreveram um ensaio nomeado "penetration assay", uma metodologia colorimétrica onde um corante é detectado e separado quando há a presença de um surfactante na mistura. Outra metodologia possível é a baseada em triagem pelo halo de colônias de microrganismos com meio de cultura diferencial. Tais metodologias podem ser empregadas na busca de linhagens, ou compostos surfactantes presentes na biodiversidade brasileira. Ainda, tendo em vista a escassez de biossurfactantes disponíveis para indústria, um produto voltado para esse propósito poderia ter rápida inserção e aceitação.

Controle de pragas: herbicidas, inseticidas, fungicidas e nematicidas

É possível utilizar a abordagem de HTS para identificação de moléculas com potencial inseticida, através de um biossensor. Existem diversos tipos e aplicações para biossensores, que podem ser definidos como dispositivos capazes de medir reações químicas, ou biológicas, respondendo de maneira a emitir sinais que podem ser interpretados (BHALLA et al., 2016). Um exemplo de interesse, é o biossensor construído por Kaykawa e colaboradores (2020), onde o dispositivo foi construído baseado em células de inseto, geneticamente modificadas, as quais emitiam sinal ótico de luminescência, caso o receptor hormonal das células fosse alvo de uma molécula interferente (hit), assim, atribui-se causa-efeito da molécula com potencial inseticida. Existem ainda outras metodologias de identificação de potencial inseticida, sendo a mais comum a identificação de enzimas com atividade quitinase, como também, testes de microplacas utilizando larvas de insetos (PRIDGEON et al., 2009; DING et al., 2015).

Para atividade herbicida e fungicida podem ser utilizados ensaios de inibição de enzimas-chave, para a viabilidade desses organismos, como receptores de auxina e citocromo redutase, respectivamente (TIETJEN; DREWES; STENZEL, 2005). Já para o controle de helmintos, estão disponíveis metodologias para testes em microplacas contendo larvas, onde os compostos das bibliotecas são misturados, e, posteriormente, avalia-se a mobilidade das larvas por interferência de feixe de raios infravermelhos (TAKI et al., 2021).

Microrganismos solubilizadores de fertilizantes

Os ensaios de HTS podem identificar características de microrganismos que possuam potencial de serem utilizados como bioinoculantes, atuando em sinergia com fertilizantes de base inorgânica tradicional. Uma metodologia já disponível é a busca por organismos solubilizadores de potássio (K⁺).

Para isso, pode ser empregado o ensaio de detecção de K⁺ solúvel utilizando metodologia de tetrafenilborato de sódio, seguido por espectroscopia de absorção atômica, podendo também ser utilizado FTIR para solubilização de feldspatos de K⁺ (JACKSON, 1985; XUE et al., 2020). Também, existem metodologias para detecção de solubilização de fósforo, onde pode ser empregada metodologia colorimétrica de molibdênio-antimônio (YONGMEI; PANPAN, 2021). A utilização desses procedimentos em HTS dão condições para encontrar as melhores possibilidades de microrganismos solubilizadores em tempo reduzido, acelerando, assim, a entrada de um novo produto no mercado.

Materiais derivados de organismos para uso medicinal - drug discovery

Compostos derivados de organismos, como plantas, fungos, animais e bactérias, são frequentemente aplicados a terapias medicinais. Estima-se que, globalmente, mais de 25% de novas drogas sejam provenientes de produtos naturais, no qual até 70% de compostos naturais são utilizados em tratamentos de câncer (IPBES, 2019). Diferentes estratégias são utilizadas para a descoberta de uma nova molécula terapêutica, desde abordagens clássicas, como serendipidade e screening farmacológico/fenotípico, até os mais modernos, como screening virtual, ou in silico, que por sua vez utiliza dados computacionais, para realizar uma varredura ampla de moléculas, avaliando diversas características.

Também, métodos que utilizam screening target based, os quais podem ser adaptados às técnicas HTS, procuram moléculas que sejam capazes de modular um alvo (target), o que em outras palavras, selecionam uma molécula a partir de um screening baseado no mecanismo de ação molecular desejado (TERSTAPPEN et al., 2007). Para mais, é importante ressaltar que na indústria farmacêutica a aplicação de triagem via HTS é capaz de avaliar entre 1-5 milhões de compostos, em apenas algumas semanas, demonstrando a eficiência da estratégia de busca utilizando HTS (PETRONE et al., 2013).

Para descoberta de novos antibióticos, a estratégia tradicional ocorre por meio da utilização de componentes celulares, ou linhagens bacterianas modelo, os quais são utilizados como alvos a serem modulados e/ou inibidos pelas moléculas/compostos terapêuticos.

Tal abordagem é uma das estratégias utilizada em um pipeline de drug discovery da indústria farmacêutica. Atualmente, 50% dos antibióticos existentes são derivados de produtos naturais. Ayon, N (2023) descreve que, apesar dos desafios, as bibliotecas de compostos naturais têm apresentado vantagens em relação à de moléculas sintéticas, devido a sua maior exploração do espaço de diversidade de moléculas, reduzida hidrofobicidade, maior massa molecular e propriedades estereoquímicas.

Para mais, atualmente existem diversos pipelines comerciais utilizados em drug discovery, direcionados à várias aplicações, seja para descoberta de antibióticos, fármacos antitumorais, drogas psicoativas, imunomoduladores, entre outras. Assim como, metodologias baseadas em biologia molecular, que podem ser adaptadas ao HTS, acelerando o processo de identificação de novos hits (TERSTAPPEN et al., 2007). A aplicação de tais metodologias na descoberta de hits, usando como base a biodiversidade de organismos brasileiros, oferece oportunidades únicas na exploração e descoberta de tratamentos inéditos para doenças ainda incuráveis.

Bibliotecas de compostos naturais

Para que o fluxo de trabalho de descoberta de novas funcionalidades em moléculas naturais seja realizado, é necessário que exista uma coleção de potenciais hits, descritos como bibliotecas, podendo estas ser de categoria química sintética, ou semi-sintética, oriunda de produtos naturais, como organismos, frações isoladas de plantas, onde os compostos estejam separados, ou não, e disponíveis em diversidade e quantidade suficiente, para que o uso de High Throughput seja justificado.

Existem bibliotecas construídas por institutos governamentais e empresas privadas que podem ser adquiridas para a realização da triagem. Alternativamente, é possível a construção de uma biblioteca dedicada a partir de uma nova fonte de diversidade biológica, embora seja altamente laborioso (KATO et al., 2012; TAKAGI; SHIN-YA, 2012).

O NIH possui um compilado de algumas destas bibliotecas que estão disponíveis para aquisição: <https://www.nccih.nih.gov/grants/natural-product-libraries>. Dentro dessa grande diversidade podem ser encontrados organismos terrestres e marinhos, podendo ser de fonte microbiana, incluindo actinomicetos e cianobactérias, plantas, fungos, invertebrados e outros organismos. Os compostos químicos são encontrados na forma de extratos brutos, ou enriquecidos, frações, ou até mesmo separados por classes de compostos químicos, como alcaloides, flavonoides, fenóis, quinonas, sacarídeos, esteroides, terpenóides, xantonas, carboidratos entre outros.

É importante ressaltar, que o sucesso de uma triagem via HTS, na busca de compostos com potencial atividade, diretamente dependente da qualidade da biblioteca utilizada, a qual se entende em outras palavras por uma biblioteca de compostos diversos. Para isso, diferentes ferramentas já foram construídas, a fim de avaliar a qualidade da diversidade da biblioteca, para que sejam utilizadas experimentalmente as bibliotecas mais promissoras, como o caso do método HTS fingerprints, desenvolvido pela Novartis.

Nesse contexto, um trabalho interessante de Petrone e colaboradores, demonstrou que a diversidade em bibliotecas químicas não garante o sucesso de uma triagem HTS, entretanto a diversidade biológica é suficiente para isso, além de prover diversidade química na própria biblioteca. Isso reforça, a riqueza da diversidade brasileira, tanto em se tratando de diversidade química, quanto biológica (PETRONE et al., 2013).

Quanto a bibliotecas baseadas na biodiversidade brasileira, podemos citar a coleção proprietária da Phytobios, que conta com compostos isolados a partir de angiospermas, construída em parceria com o LNBio, para descobrimento de novas moléculas a serem utilizadas pela empresa farmacêutica, Aché.

Outra iniciativa interessante é o NuBBE, uma base de dados que reúne dados de 50 mil moléculas provenientes de plantas, microrganismos terrestres, marinhos e do reino animal, da diversidade brasileira, na qual é possível encontrar informações sobre a espécie e a localidade de cada registro de molécula química.

Bibliotecas de microrganismos marinhos também são ricas em diversidade e aplicações. A empresa Regenera Moléculas do Mar conta com um banco prioritário único de origem marinha do país, o qual está disponível para bioprospecção ("Quem somos | Regenera Moléculas do Mar"). Para mais, é importante que futuramente as bibliotecas nacionais possam ser vinculadas e haja conexão com bases de dados internacionais, a fim de aumentar o alcance das informações e evitar replicação de moléculas.

Bases de dados como species link (<https://specieslink.net/>), MOL (map of life) (<https://mol.org/>), ATLAS of living Australia (<https://www.ala.org.au/>) e Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS), podem ser plataformas extremamente úteis para divulgação das bibliotecas nacionais e pesquisa de dados.

Iniciativas para a construção de coleções de moléculas, originárias da biodiversidade brasileira, são de suma importância no desenvolvimento sustentável da indústria brasileira, focada em produtos tecnológicos, com base de desenvolvimento nacional e maior valor agregado. Entretanto, essas iniciativas somente apresentam valor uma vez que as moléculas sejam direcionadas a solucionar problemas, ou desenvolver produtos específicos. Nesse contexto, a automação atua como principal aliada buscando utilidade para as coleções catalogadas.

À luz das problemáticas, oportunidades e soluções apresentadas, o Instituto SENAI de Inovação em Biossintéticos e Fibras (ISI B&F) propõe a criação de uma agenda de discussão sobre a temática, associada ao desenvolvimento de um pipeline de descoberta e aproveitamento da biodiversidade, o qual nomeamos de Biodiversity Business Discovery (BBD).

Este pipeline tem por finalidade encontrar aplicações diversas para novas moléculas e compostos, provenientes da biodiversidade brasileira, que possam ser utilizados em produtos de maior valor agregado com aplicações industriais diversas, subsidiando assim a exploração sustentável dos biomas.

Para isso, o ISI B&F faz uso da plataforma de biotecnologia mais integrada do país, combinando sua infraestrutura de ponta, de tecnologias ômicas (sequenciamento genômico) e de automação laboratorial, associadas a um time de pesquisadores multidisciplinares, para permitir a caracterização e a comprovação do potencial de aplicação de ativos derivados da biodiversidade nacional, com alta taxa de processividade. Dessa forma, oferecemos pacotes completos para a criação de novos negócios a partir da biodiversidade, com soluções para diferentes segmentos de mercado, visando cumprir nossa missão de fomentar cada vez mais o desenvolvimento industrial apoiado na bioeconomia.

Como objetivo geral, a criação desses pipelines propostos pelo ISI B&F procura atribuir utilidade para moléculas derivadas da biodiversidade brasileira, sejam elas para uso terapêutico na indústria farmacêutica, ou como moléculas para beneficiar o plantio em agricultura (“Biodiversity Commitment | Bayer Global”,). Também, a descoberta de novos compostos com potencial aplicação industrial, como surfactantes, os quais podem ser utilizados desde setores como óleo e gás, até cosméticos e home and care.

Finalmente, é importante ressaltar que produtos naturais e seus derivados contribuem com pelo menos 1/3 das novas moléculas aprovadas pela FDA. Em declaração feita pelo biólogo Thomas Lovejoy, ele afirma “Uma floresta é como uma biblioteca de livros não lidos. Explorar a sabedoria contida nessas bibliotecas pode levar a descoberta de produtos inovadores e novos mercados”.

Neste cenário, o ISI B&F conta com toda a capacidade para auxiliar os pesquisadores e indústrias brasileiras nessa leitura e descoberta (“The Business of Biodiversity”). Finalmente, para alcançar tais objetivos, o ISI B&F está ciente da necessidade da construção de uma ampla rede de cooperação a nível nacional, tendo em vista a dimensão do presente desafio.

Para isso é importante citar algumas iniciativas que podem apoiar a exploração sustentável da biodiversidade, como é o caso do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr), que é associado ao Global Biodiversity Information Facility (GBIF), apoiado por iniciativas do Ministério da Ciência e Tecnologia.

O SiBBr (<https://www.sibbr.gov.br/>) reúne notícias, dados, coleções e bibliotecas de espécimes inéditas da biodiversidade brasileira. Além disso, a região amazônica conta com algumas redes específicas, como é o caso do Centro de estudos integrados da Biodiversidade Amazônica (CENBAM-<https://ppbio.inpa.gov.br/cenbam>). Criado em 2009, para consolidar cadeias produtivas sustentáveis e conhecimentos científicos regionais, juntamente com o Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBIO), o Centro têm realizado um importante trabalho integrando achados científicos com conhecimento tradicional da Amazônia. Os participantes e organizadores dessas redes são extremamente importantes para dar forma e ação aos objetivos de preservação e utilização sustentável da biodiversidade.

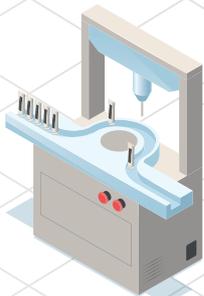
Por fim, destacamos a Iniciativa Brasileira de Negócios e Biodiversidade, baseada na Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) das Nações Unidas, que entrou em vigor em 1993 (CDB, Ministério do Meio Ambiente, 2000). Essa iniciativa objetiva conectar e servir como um canal de comunicação entre o setor empresarial, industrial e produtivo brasileiro, e as iniciativas nacionais e internacionais conectadas à CDB. Nesse contexto, fica clara a necessidade de unir os esforços e trabalhos de diferentes instituições e iniciativas, para alcançar objetivos desafiadores e conquistar, em tempo hábil, os propósitos sustentáveis do BBD.

Biodiversity Business Discovery



Biblioteca de moléculas

Avaliação de potencial de aplicação de Indústria



Triagem e testagem de targets de via HTS

- **Enzimas**
- **Agentes biocidas**
- **Pigmentos**
- **Flavors**
- **Fragrâncias**
- **Quelantes**
- **Surfactantes**
- **Biopolímeros**
- **Bioestimulante**
- **Agentes umectantes**



Referências

1. A Breakthrough for High-Throughput Screening - Amyris. Disponível em: <<https://amyris.com/1769/a-breakthrough-for-high-throughput-screening>>. Acesso em: 17 jul. 2023.
2. ALDEWACHI, H. et al. High-Throughput Screening Platforms in the Discovery of Novel Drugs for Neurodegenerative Diseases. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 2, p. 1–20, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33672148/>>. Acesso em: 17 jul. 2023.
3. AYON, N. J. High-Throughput Screening of Natural Product and Synthetic Molecule Libraries for Antibacterial Drug Discovery. *Metabolites*, v. 13, n. 5, 2023.
4. BARBOSA, T. P.; NETO, H. D. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de Química Orgânica Experimental. *Química Nova*, v. 36, n. 2, p. 331–334, 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/sjXV3rWngy4PRxKkXjfVQHL/?lang=pt>>. Acesso em: 17 jul. 2023.
5. BHALLA, N. et al. Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, v. 60, n. 1, p. 1–8, 2016.
6. Biodiversity Commitment | Bayer Global. Disponível em: <<https://www.bayer.com/en/agriculture/restoring-biodiversity>>. Acesso em: 17 jul. 2023.
7. BODINI, R. B. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of orally disintegrating films based on starch and hydroxypropyl methylcellulose incorporated with *Cordia verbenacea* (erva baleeira) extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 159, p. 714–724, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.075>>.
8. Captopril API Market Report | Global Forecast From 2023 To 2031. Disponível em: <<https://dataintel.com/report/global-captopril-api-market/>>. Acesso em: 17 jul. 2023.
9. CARBONELL, P.; RADIVOJEVIC, T.; GARCÍA MARTÍN, H. Opportunities at the Intersection of Synthetic Biology, Machine Learning, and Automation. *ACS Synthetic Biology*, v. 8, n. 7, p. 1474–1477, 19 jul. 2019. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssynbio.8b00540>>. Acesso em: 17 jul. 2023.
10. DING, W. et al. Functional characterization of a vanillin dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*. *Scientific Reports*, v. 5, p. 8044, 2015.
11. GUIMARÃES, M. Das moléculas aos organismos. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/das-moléculas-aos-organismos/>>. Acesso em: 17 jul. 2023.
12. IPBES. Status and Trends - Nature's contributions to people. [s.l.: s.n.]
13. JACKSON, B. L. J. A modified sodium tetraphenylboron method for the routine determination of reserve-potassium status of soil. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, v. 13, n. 3, p. 253–262, 1985.
14. KATO, N. et al. Construction of a microbial natural product library for chemical biology studies. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 16, n. 1–2, p. 101–108, 1 abr. 2012.
15. KAYUKAWA, T. et al. Identification of a juvenile-hormone signaling inhibitor via high-throughput screening of a chemical library. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75386-x>>.
16. MACARRON, R. et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nature Reviews Drug Discovery* 2011 10:3, v. 10, n. 3, p. 188–195, 1 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrd3368>>. Acesso em: 17 jul. 2023.
17. MONIKA, B. Exploração da biodiversidade brasileira como fonte de insumos farmacêuticos ativos vegetais (IFAVs): desafios da indústria farmacêutica nacional. v. 17, n. 2, p. 236–259, 2023.
18. PETRONE, P. M. et al. Biodiversity of small molecules – a new perspective in screening set selection. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 13–14, p. 674–680, 1 jul. 2013.
19. PRIDGEON, J. W. et al. A High-Throughput Screening Method to Identify Potential Pesticides for Mosquito Control. *Journal of Medical Entomology*, v. 46, n. 2, p. 335–341, 1 mar. 2009. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1603/033.046.0219>>. Acesso em: 10 jul. 2023.
20. Quem somos | Regenera Moléculas do Mar. Disponível em: <<https://regeneramoleculas.com.br/quem-somos/>>. Acesso em: 17 jul. 2023.
21. SANTANA, K. et al. Applications of Virtual Screening in Bioprospecting: Facts, Shifts, and Perspectives to Explore the Chemo-Structural Diversity of Natural Products. *Frontiers in Chemistry*, v. 9, n. April, 2021.
22. TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. Construction of a natural product library containing secondary metabolites produced by actinomycetes. *Journal of Antibiotics*, v. 65, n. 9, p. 443–447, 2012.
23. TAKI, A. C. et al. High-throughput phenotypic assay to screen for anthelmintic activity on *haemonchus contortus*. *Pharmaceuticals*, v. 14, n. 7, p. 1–13, 2021.
24. TERSTAPPEN, G. C. et al. Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, n. 11, p. 891–903, 2007.
25. The Business of Biodiversity. Disponível em: <https://ssir.org/articles/entry/the_business_of_biodiversity>. Acesso em: 17 jul. 2023.

26. TIETJEN, K.; DREWES, M.; STENZEL, K. High Throughput Screening in Agrochemical Research. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 8, n. 7, p. 589–594, 2005.
27. WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 672, p. 1–13, 2010.
28. XUE, Y. et al. Screening of high-efficiency potassium-dissolving strains and optimization of the potassium-dissolving process. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, v. 57, n. 2, p. 1–13, 2020.
29. YANG, H.; YU, H.; SHEN, Z. FERMENTATION, CELL CULTURE AND BIOENGINEERING A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 42, p. 1139–1147, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jimb/article/42/8/1139/5961484>>. Acesso em: 10 jul. 2023.
30. YEOW, J. A. et al. Effects of Stress, Repetition, Fatigue and Work Environment on Human Error in Manufacturing Industries. *Journal of Applied Sciences*, v. 14, n. 24, p. 3464–3471, 1 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=jas.2014.3464.3471>>.
31. YONGMEI, Z.; PANPAN, W. Screening and Preliminary Identification of Soil Potassium and Phosphorus-hydrolyzing Bacteria WP1-3. *E3S Web of Conferences*, v. 293, p. 1–4, 2021.
32. ZENG, W. et al. High-Throughput Screening Technology in Industrial Biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 38, n. 8, p. 888–906, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.01.001>>.
33. A Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB, arquivo pdf. <https://www.gov.br/mma/pt-br/textoconvenoportugus.pdf>

Autores:

Carlos Gonçalves, Eamim Squizani, Giulia Aranha, Lucas Cespedes e Patrick Squizato



SENAI CETIQT



Rua Fernando de Souza Barros, n° 120
Bairro: Cidade Universitária
Cidade: Rio de Janeiro | RJ - CEP: 21941-857