

SEVEN

EDITORA
2026

BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE PÚBLICA



ROBSON XAVIER FARIA

EDITORIA CHEFE

Prof^o Me. Isabele de Souza Carvalho

EDITOR EXECUTIVO

Nathan Albano Valente

ORGANIZADOR DO LIVRO

Robson Xavier Faria

PRODUÇÃO EDITORIAL

Seven Publicações Ltda

EDIÇÃO DE ARTE

Evellyn Thais de Souza

EDIÇÃO DE TEXTO

Stephanie Caroline Meyer de Quadros

BIBLIOTECÁRIA

Bruna Heller

IMAGENS DE CAPA

Evellyn Thais de Souza

2026 by Seven Editora

Copyright © Seven Editora

Copyright do Texto © 2026 Os Autores

Copyright da Edição © 2026 Seven Editora

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Seven Publicações Ltda. 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.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Seven Publicações Ltda é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação.

Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético



O conteúdo deste Livro foi enviado pelos autores para publicação de acesso aberto, sob os termos e condições da Licença de Atribuição Creative Commons 4.0 Internacional

CONSELHO EDITORIAL

EDITORA CHEFE

Prof. Me. Isabele de Souza Carvalho

CONSELHO EDITORIAL

Adriana Barni Truccolo - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
Adriana Barretta Almeida - Universidade Federal do Paraná
Alessandre Gomes de Lima - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
Anderson Nunes da Silva - Universidade Federal do Norte do Tocantins
Antonio da Costa Cardoso Neto - Universidade de Flores, Buenos Aires
Antônio Alves de Fontes-Júnior - Universidade Cruzeiro do Sul
Ariane Fernandes da Conceição - Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Arnaldo Oliveira Souza Júnior - Universidade Federal do Piauí, CEAD
Caio Vinicius Efigenio Formiga - Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Charles Henrique Andrade de Oliveira - Universidade de Pernambuco
Egas José Armando - Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique
Inaldo Kley do Nascimento Moraes - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Irlane Maia de Oliveira - Universidade Federal de Mato Grosso
Janyel Trevisol - Universidade Federal de Santa Maria
Jorge Fernando Silva de Menezes - Universidade de Aveiro
Jorge Luís Pereira Cavalcante - Fundação Universitária Iberoamericana
Kleber Farinazo Borges - Universidade de Brasília
Luiz Gonzaga Lapa Junior - Universidade de Brasília
Mara Lucia da Silva Ribeiro - Universidade Federal de São Paulo
Marcelo Silva de Carvalho - Universidade Federal de Alfenas
Marcos Garcia Costa Moraes - Universidade Estadual da Paraíba
Maria Gorete Valus - Universidade Estadual de Campinas
Mônica Maria de Almeida Brainer - Instituto Federal de Goiás, Campus Ceres
Moacir Silva de Castro - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Paulo Roberto Duailibe Monteiro - Universidade Federal Fluminense
Pedro Henrique Ferreira Marçal - Universidade Vale do Rio Doce
Rafael Braga Esteves - Universidade de São Paulo
Telma Regina Stroparo - Universidade Estadual de Ponta Grossa
Valéria Raquel Alcantara Barbosa - Fundação Oswaldo Cruz
Wanderson Santos de Farias - Universidade do Desenvolvimento Sustentável
Yuni Saputri M.A - Universidade Nalanda, Índia

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

F224b

Faria, Robson Xavier.

Biotecnologia Aplicada à Saúde Pública [recurso eletrônico] / Robson Xavier Faria. – São José dos Pinhais, PR: Editora Seven, 2026.

Dados eletrônicos (1 PDF).

Inclui bibliografia.

ISBN 978-65-6109-413-9

1. Medicina. 2. Biotecnologia. 3. Inovação. 4. Saúde.
I. Título.

CDU 61

Bruna Heller - Bibliotecária - CRB10/2348

Índices para catálogo sistemático:

1 Ciências da saúde 61

DOI: 10.56238/livrosindi202691-001

Seven Publications Company
CNPJ: 43.789.355/0001-14
editora@sevenevents.com.br
São José dos Pinhais/PR

ORGANIZADOR DO LIVRO

Robson Xavier Faria

PREFÁCIO

A **Biotecnologia** representa uma das fronteiras mais dinâmicas e promissoras da ciência moderna, atuando como a ponte fundamental entre o vasto conhecimento da biodiversidade e a criação de soluções aplicadas à saúde humana, animal e ambiental. Em sua essência, a biotecnologia contemporânea utiliza sistemas vivos e componentes moleculares não apenas para compreender fenômenos naturais, mas também para desenvolver produtos de alto valor agregado e impacto global.

O ponto de partida para muitas dessas inovações é a **bioprospecção**, a exploração sistemática de recursos naturais em busca de novas moléculas bioativas. Um exemplo fascinante dessa busca é o estudo das **naftoquinonas**, metabólitos secundários encontrados em plantas e micro-organismos que possuem uma versatilidade química e farmacológica extraordinária. O salto tecnológico dessas moléculas, **da bioprospecção à nanotecnologia**, tem revolucionado o desenvolvimento de novos produtos. Por meio da nanotecnologia, compostos naturais de difícil solubilidade ou instabilidade podem ser encapsulados em nanocápsulas, o que aumenta drasticamente sua biodisponibilidade, reduz a toxicidade sistêmica e permite uma liberação controlada nos tecidos-alvo.

Nesse cenário de transição para a inovação tecnológica, o **uso de produtos naturais, da avaliação bioquímica até o uso no mercado**, exige um rigoroso caminho científico. O sucesso de um fitomedicamento ou bioproduto requer a elucidação precisa de seus alvos moleculares. Isso envolve o **estudo da inflamação e da dor na biotecnologia**, onde pesquisadores buscam identificar moléculas naturais capazes de modular vias de sinalização de citocinas ou inibir enzimas pró-inflamatórias, aliviando o sofrimento com menores efeitos colaterais em comparação aos sintéticos tradicionais.

Paralelamente, o **estudo de antifúngicos na biotecnologia** tornou-se uma prioridade global, impulsionado pelo aumento de infecções oportunistas e pelo alarmante fenômeno da resistência microbiana. Compostos de diferentes fontes, incluindo os produtos naturais, têm se destacado na interrupção da proliferação de leveduras e fungos filamentosos. O **mecanismo de estudo da morte celular na biotecnologia** é crucial aqui: ele permite compreender se o produto natural induz a apoptose (morte celular programada) ou a necrose das células fúngicas, garantindo que o composto seja tóxico para o patógeno, mas seguro para as células do hospedeiro humano.

Além da saúde humana, a biotecnologia aplicada ao controle ambiental e de pragas é igualmente vital. O **uso de produtos naturais como moluscicidas** oferece uma alternativa sustentável e ecológica para o controle de vetores biológicos, a exemplo dos moluscos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. A aplicação de extratos botânicos ou de substâncias isoladas ou sintéticas impacta diretamente o ciclo de vida desses vetores, sem contaminar os ecossistemas aquáticos com os resíduos tóxicos dos defensivos químicos convencionais.

Em suma, a intersecção dessas áreas reflete a maturidade da biotecnologia: uma ciência que parte da observação da natureza para compreender os mecanismos bioquímicos da vida e da morte celular, que aprimora

essas substâncias por meio da nanotecnologia e que culmina no desenvolvimento de produtos seguros e eficazes para o mercado global. Esta obra convida o leitor a explorar o vasto universo da biotecnologia, onde a natureza serve não apenas como inspiração, mas como o próprio alicerce para o futuro da inovação terapêutica e agrícola.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO À BIOTECNOLOGIA.....	8
MORTE CELULAR: UMA VISÃO GERAL.....	25
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR: EXPLORANDO RESAZURINA E MTT NA BIOTECNOLOGIA.....	36
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR: TÉCNICA DE LIBERAÇÃO DE LDH E ENSAIO COM PI.....	48
DESVENDANDO A GENOTOXICOLOGIA DE CÉLULAS ÚNICA: ENSAIOS COMETA E TUNEL COMO PILARES DA ANÁLISE INTEGRADA DE DANO E DESTINO CELULAR.....	59
EXPLORANDO A BIOTECNOLOGIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS: DA BIOQUÍMICA VEGETAL ÀS DINÂMICAS DE MERCADO.....	73
NAFTOQUINONAS: DA BIOPROSPECÇÃO À NANOTERAPIA – OTIMIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM AÇÃO REDOX E ANTI-TOPOISOMERASE.....	87
INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA ACOMETIDA POR <i>Candida albicans</i> : BUSCA DE ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SEU TRATAMENTO.....	97
ASPECTOS GERAIS DA DOR E INFLAMAÇÃO: BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS COM BIOTECNOLOGIA.....	105
POTENCIAL MOLUSCICIDA DE PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DA ESQUISTOSSOMOSE: USO DE NANOEMULSÕES COMO ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS À SAÚDE.....	133

INTRODUÇÃO À BIOTECNOLOGIA

Jonathas Albertino de Souza Oliveira Carneiro

Universidade Federal Fluminense - Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia, Niterói, RJ, Brasil.

Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

A biotecnologia, cujo termo deriva do grego *bios* (vida), *technos* (técnica) e *logos* (conhecimento), constitui um domínio tecnocientífico intrinsecamente multidisciplinar voltado à manipulação coordenada de sistemas biológicos e derivados moleculares para a produção de bens e serviços. Originalmente cunhado em 1919 pelo engenheiro húngaro Karl Ereky, o conceito evoluiu de uma interface metodológica para a síntese de matérias-primas em uma fusão transdisciplinar entre as ciências biológicas e a engenharia. Operando em escalas celular e molecular, esta "tecnologia da esperança" fundamenta-se em ferramentas como o DNA recombinante e a genômica para desenvolver soluções transversais que abrangem desde o diagnóstico de patógenos emergentes como os vírus Ebola, SARS e Zika, até a consolidação da medicina personalizada, que ajusta intervenções clínicas ao perfil genético individual (Gupta V, Sengupta M et al., 2016).

A complexidade e a capilaridade deste campo na sociedade contemporânea são organizadas por meio de uma classificação cromática que delimita suas áreas de atuação e mecanismos específicos. A biotecnologia vermelha (saúde) lidera o desenvolvimento de biofármacos e terapias gênicas, enquanto a verde (agrícola) foca na bioengenharia de cultivos para resistência endógena a pragas, mitigando o uso de defensivos químicos. No setor industrial, a biotecnologia branca otimiza processos de manufatura via biocatálise enzimática e fermentação, ao passo que a azul (marinha) dedica-se à prospecção de moléculas bioativas em organismos aquáticos. A vertente amarela concentra-se na segurança alimentar e nutrição, desenvolvendo alimentos funcionalmente enriquecidos, enquanto a cinza é voltada especificamente à proteção e remediação ambiental, utilizando o metabolismo microbiano para a detoxificação de solos e efluentes (Gupta V, Sengupta M et al., 2016).

Expandindo o espectro regulatório e estratégico, a biotecnologia dourada abrange a bioinformática e a nanobiotecnologia, ferramentas essenciais para o processamento de grandes volumes de dados biológicos (*Big Data*). A vertente marrom foca no manejo de

solos áridos e em regiões desérticas, enquanto a violeta trata dos aspectos éticos, patentes e leis de propriedade intelectual que regem a inovação biológica. Por fim, a biotecnologia laranja dedica-se à disseminação do conhecimento e educação na área, a preta investiga o bioterrorismo e o desenvolvimento de contramedidas biológicas contra patógenos letais, e a amarela (referenciada às vezes como biotecnologia educacional) foca na comunicação científica. Essa estrutura multidimensional exige marcos regulatórios e bioéticos robustos para assegurar que a governança das inovações garanta a segurança biológica e a legitimidade das pesquisas frente aos desafios globais (Tonini, R. M. C. W., Gonçalves, A. C. dos S. et al., 2025).

PERSPETIVA HISTÓRICA: A TRANSIÇÃO DA BIOTECNOLOGIA EMPÍRICA PARA A CIÊNCIA MODERNA

A descrição detalhada do surgimento da biotecnologia antes e durante a era cristã é fundamental para estabelecer que a manipulação de microrganismos não é uma prática contemporânea, mas uma competência técnica estruturante da civilização humana. Ao resgatar os processos fermentativos utilizados por sumérios, babilônios e egípcios para a produção de pão e bebidas alcoólicas (Figura 1), o texto deste artigo visa fundamentar a transição de uma biotecnologia empírica e ancestral para uma ciência industrial estratégica observada atualmente.

Figura 1 – Modelo de madeira representando quatro figuras preparando comida e cerveja. Proveniente de Sidmant, Egípto, VI Dinastia (c. 2345–2181 a.C.).



Fonte: The British Museum (2026). Disponível em: <https://www.britishmuseum.org/collection/image/68404001>. Acesso em: 24 abr. 2026.

Essa contextualização histórica permite compreender como o domínio milenar sobre seres microscópicos evoluiu, sob a pressão das Grandes Guerras Mundiais e de marcos como a descoberta da penicilina no ano de 1928, para o desenvolvimento de fermentadores industriais, técnicas de controle de infecção e, finalmente, para a engenharia genética moderna. Assim, a retrospectiva histórica valida a biotecnologia como uma ciência de evolução contínua, que hoje integra conhecimentos de biologia molecular e DNA recombinante para gerar soluções de alta complexidade nos setores agrícola, industrial, ambiental e de saúde.

DE LEEUWENHOEK À PENICILINA: A EVOLUÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS E A CONSOLIDAÇÃO DA INDÚSTRIA BIOTECNOLÓGICA

A evolução do microscópio e a consequente descoberta do mundo microscópico representam um divisor de águas na biologia. Embora a invenção do instrumento seja frequentemente associada a Galileu, foi o naturalista holandês Antonie van Leeuwenhoek (Figura 2) quem, em 1674, aperfeiçoou o dispositivo de lente única, alcançando ampliações de até 300 vezes com nitidez surpreendente para a época. Essa inovação

permitiu a visualização de estruturas anteriormente invisíveis, como bactérias de apenas 1 a 2 micra, glóbulos vermelhos e espermatozoides, inaugurando o estudo sistemático dos microrganismos (van Leeuwenhoek, 2004). Posteriormente, o trabalho de Leeuwenhoek foi expandido por Robert Hooke, que aprimorou o design do microscópio ao introduzir uma segunda lente, aumentando significativamente a capacidade de ampliação.

Figura 2 – Retrato de Antonie van Leeuwenhoek. Pintura de Jan Verkolje, 1686. Óleo sobre tela.



Fonte: Rijksmuseum (2026).

As observações pioneiras de ambos os pesquisadores foram fundamentais para a identificação das células, embora o entendimento da sua real função tenha levado mais tempo para se consolidar. Foi apenas em 1839 que os cientistas alemães Matthias Jacob Schleiden e Theodor Schwann sintetizaram esses conhecimentos, reconhecendo formalmente a célula como a unidade fundamental de todos os seres vivos (van Leeuwenhoek, 2004).

LOUIS PASTEUR PRECURSOR DA IMUNOLOGIA

Embora Louis Pasteur (Figura 3) seja tradicionalmente celebrado como o precursor da imunologia moderna por popularizar a teoria microbiana e introduzir o conceito de vacinação profilática e terapêutica no final do século XIX, sua compreensão sobre os mecanismos de defesa do corpo era, na verdade, pautada em premissas que hoje sabemos serem equivocadas.

Trabalhando em uma era que precedia a distinção clara entre fungos, bactérias e vírus, Pasteur raciocinava estritamente como microbiologista, acreditando que a imunidade ocorria porque microrganismos atenuados esgotavam os nutrientes vitais do hospedeiro, impedindo novas infecções, e não por uma resposta ativa do sistema imunológico, cuja existência ainda era desconhecida.

Apesar desse equívoco teórico sobre o funcionamento biológico da proteção, sua genialidade residiu na capacidade de transitar entre a química orgânica, a microbiologia e a medicina, concentrando esforços na imunidade e pavimentando o caminho para que gerações futuras de cientistas desvendassem a complexidade das respostas do organismo contra invasores (Smith KA, 2012).

Figura 3: Louis Pasteur em seu laboratório. Pintura de Albert Edelfelt, 1885. Óleo sobre tela.



Fonte: Musée d'Orsay (2026).

ALEXANDER FLEMING E O ADVENTO DOS ANTIBIÓTICOS: O PARADIGMA DA PENICILINA

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming representou uma revolução sem precedentes na medicina terapêutica e na indústria farmacêutica, consolidando-se como o paradigma para o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais. Ao identificar a atividade antibacteriana do fungo *Penicillium* e cunhar o termo que se tornaria sinônimo de "medicamento milagroso", Fleming não apenas impulsionou avanços cruciais na biologia molecular e no controle da divisão celular bacteriana, mas também se tornou um

ícone da profissão científica. Esse marco histórico, embora por vezes cercado por uma aura mítica, destaca a necessidade de esforços interdisciplinares para transformar observações clínicas em soluções que alteraram permanentemente as expectativas de cura para doenças infecciosas (JW Bennett, KT Chung et., al 2001).

Figura 4: Alexander Fleming em seu laboratório.



Fonte: Famiglia Cristiana (2026).

Foi em setembro de 1928 que, Alexander Fleming protagonizou uma das descobertas mais fortuitas da história da medicina ao retornar ao seu laboratório no St. Mary's Hospital após um período de férias (Figura 4). Ao examinar uma placa de Petri com colônias da bactéria *Staphylococcus* que havia sido deixada destampada, o cientista notou uma contaminação pelo fungo *Penicillium no-tatum*, observando a formação de um halo translúcido onde o crescimento bacteriano fora inibido (Bennett, JW, & Chung, KT et., al 2001).

Intrigado por esse fenômeno de ruptura, Fleming realizou experimentos que comprovaram a capacidade do fungo de produzir uma substância capaz de destruir diversos patógenos responsáveis por doenças graves, como pneumonia, meningite e difteria. Batizada por ele como "penicilina", essa substância demonstrou um potencial antibacteriano sem precedentes, marcando o início de uma nova era na ciência médica (Bennett, JW, & Chung, KT et., al 2001).

FUNDAMENTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR: O LEGADO DE WATSON, CRICK E A CONTRIBUIÇÃO DE FRANKLIN

O artigo de Watson e Crick, publicado na edição de abril de 1953 da revista *Nature*, apresentou de forma clara e precisa a estrutura molecular do ácido desoxirribonucleico (DNA), a molécula da vida. Este trabalho representou o ápice de uma pesquisa iniciada em 1951 por Francis Crick em parceria com o jovem biólogo americano James D. Watson (Figura 5).

Embora as primeiras tentativas de determinar a estrutura tenham fracassado, o sucesso foi alcançado dois anos depois através de um esforço que integrou contribuições vitais de outros cientistas, como Maurice F. Wilkins e a biofísica britânica Rosalind Franklin, cujos estudos de difração de raios-X foram fundamentais, ainda que inicialmente pouco reconhecidos. Entre 1951 e 1953, a comunidade científica viveu um período de intensa competição, com grupos liderados por Erwin Chargaff e Linus Pauling buscando incansavelmente a decifração da estrutura do DNA. A segunda tentativa de Crick e Watson culminou no famoso artigo de aproximadamente 600 palavras que mudou o curso da biologia moderna. Como reconhecimento por esta descoberta histórica e pelos estudos subsequentes sobre a dupla hélice, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido conjuntamente a Crick, Watson e Wilkins no ano de 1962 (Teive, HA 2016).

PARA ALÉM DO MODELO DE WATSON E CRICK: O PAPEL DETERMINANTE DA BIOFÍSICA NO KING'S COLLEGE

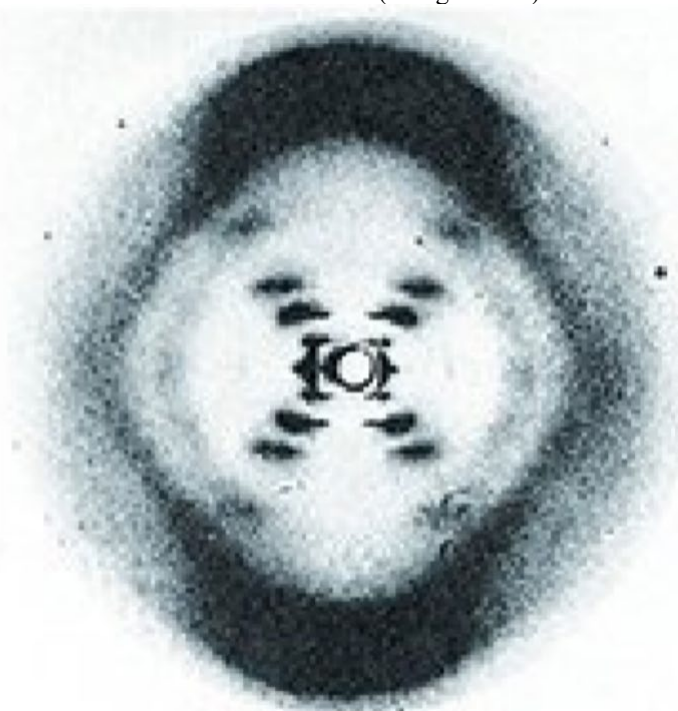
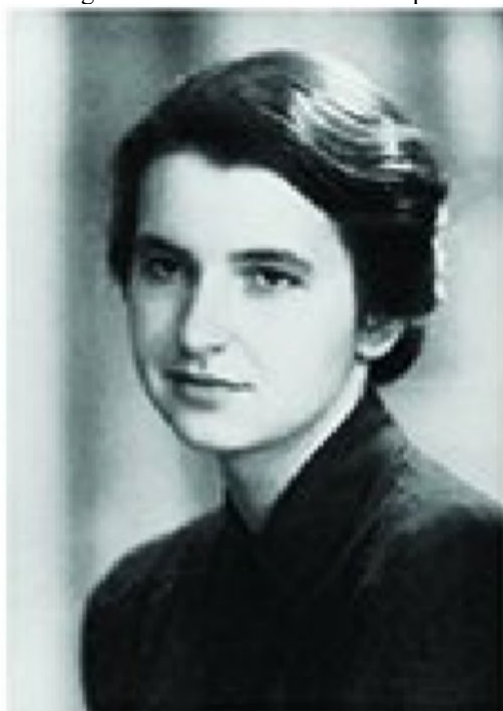
Figura 5 – James Watson e Francis Crick com o modelo da molécula de DNA em 1953.



Fonte: A. Barrington Brown (1953).

Durante a década de 1950, a busca pela estrutura do DNA teve na biofísica britânica Rosalind Franklin uma de suas figuras mais determinantes, embora historicamente menos celebrada. Atuando no King's College de Londres, Franklin aplicou seu rigor técnico em difração de raios-X para capturar imagens de alta resolução da molécula, sendo a famosa "Fotografia 51" (Figura 6) o dado em-pírico crucial que evidenciou a configuração em dupla hélice. Seus cálculos precisos sobre a densidade e a hidratação da molécula revelaram que os grupos fosfato deveriam estar localizados na parte externa da estrutura, servindo de base para que Watson e Crick propusessem o modelo final em 1953. Assim, o entendimento de que o DNA é composto por duas cadeias espirais antiparalelas, mantidas por pares complementares de nucleotídeos, deve-se fundamentalmente ao trabalho experimental de Franklin, cuja maestria técnica permitiu visualizar a arquitetura da vida antes que ela pudesse ser teorizada (Teive, HA 2016).

Figura 6 – Rosalind Franklin e o padrão de difração de raios-X da molécula de DNA (Fotografia 51).



Fonte: Marcolin (2014).

ENGENHARIA GENÉTICA: O INSTRUMENTO DA BIOTECNOLOGIA CONTEMPORÂNEA

Os avanços fundamentais na biologia molecular, na genética e no estudo do metabolismo bacteriano foram os pilares que impulsionaram o desenvolvimento das biotecnologias, inicialmente através de métodos de mutação e seleção de estirpes de elevado rendimento. Este progresso foi consolidado pela implementação de processos de fermentação contínua e pela inovação na imobilização de enzimas. Contudo, a verdadeira revolução biotecnológica emergiu em meados da década de 1970, com a descoberta das enzimas de restrição (endonucleases), das ligases e das técnicas de clonagem génica, além do desenvolvimento da tecnologia de hibridomas para a produção de anticorpos monoclonais. Mais recentemente, a invenção da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permitiu a amplificação exponencial de quantidades infinitesimais de ADN, facilitando a manipulação do património hereditário a partir de amostras celulares mínimas (Mayor, F., 1992).

Estas ferramentas, que constituem a engenharia genética ou tecnologia do ADN recombinante, permitem uma compreensão profunda da expressão génica e encontram aplicações vastas em áreas farmacêutica, medicinal, agricultura e bioenergia. Ao contrário dos métodos convencionais de hibridação, a recombinação de ADN possibilita a criação de organismos transgénicos incluindo micróbios, plantas e animais dotados de novos genes que codificam substâncias de interesse comercial ou características biológicas otimizadas. Desta forma, a biotecnologia transcende as barreiras das espécies, oferecendo soluções precisas para desafios globais de nutrição e saúde (Mayor, F., 1992).

De acordo com a definição da OCDE, a biotecnologia não é uma disciplina isolada, mas um campo de atividade essencialmente multidisciplinar que integra conhecimentos de bioquímica, microbiologia, engenharia química e computação. É crucial distinguir que a engenharia genética atua como um instrumento poderoso dentro deste vasto campo, e não como a biotecnologia em si. O potencial destas técnicas para o futuro da medicina foi demonstrado historicamente em 1989, com o primeiro experimento de terapia génica em humanos realizado pelo “National Cancer Institute”, onde linfócitos geneticamente manipulados foram utilizados no tratamento de pacientes com cancro, marcando o início de uma nova era na prática clínica (Mayor, F., 1992).

DO PÂNCREAS ANIMAL À E. COLI: A REVOLUÇÃO NA PRODUÇÃO DE INSULINA

A aplicação da biotecnologia na indústria farmacêutica atingiu um marco histórico em 1978, quando a empresa Genentech desenvolveu o primeiro biofármaco produzido por bactérias: a insulina recombinante humana. Esta inovação foi consolidada em 1982 através de uma parceria com a Eli Lilly Company, que resultou na produção otimizada da substância e na sua subsequente aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA). A introdução das técnicas de engenharia genética na fabricação da insulina solucionou problemas críticos de impureza e reações adversas associados à versão anterior do medicamento, que era purificada a partir do pâncreas de animais (Ferro, E. S., 2010).

O processo de produção da insulina recombinante baseia-se na inserção de sequências de DNA humano em uma célula hospedeira, como a bactéria *Escherichia coli*. Durante o crescimento e reprodução celular, o hospedeiro utiliza o código genético inserido para sintetizar a insulina, tornando-a perfeitamente adequada para a terapêutica humana. Atualmente, essa ciência pragmática beneficia mais de 250 milhões de pessoas globalmente, fornecendo tratamentos avançados para condições complexas como o cancro de mama, esclerose múltipla, leucemia e fibrose cística, além de impulsionar o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes contra diversas doenças infecciosas (Ferro, E. S., 2010).

Tabela 1: O comparativo entre a biotecnologia tradicional e a biotecnologia moderna

BIOTECNOLOGIA TRADICIONAL X BIOTECNOLOGIA MODERNA	
Tradicional	Moderna
Mais antiga e rudimentar	Iniciando na década de 70
Obtenção de produtos a partir de matéria-prima, mediante a intervenção de organismos vivos	Estudos e desenvolvimento da química combinatória de biomoléculas, processos de biotransformação, a tecnologia de ácidos nucleicos, a aplicação de moléculas menores em controles de metabolismo e em farmacologia.
Egípcios e Babilônios	

O ano de 1997 foi marcado por um divisor de águas na biotecnologia com o anúncio do nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero clonado a partir do núcleo de uma célula somática de um animal adulto. Esta conquista técnica sem precedentes despertou tanto fascínio quanto temor ético, especialmente no que diz respeito à possibilidade de aplicação da técnica em seres humanos. A reação global foi imediata, levando à revisão de legislações nacionais e à criação de comitês de bioética para assessorar governos sobre os limites da manipulação da vida, cenário que se tornou ainda mais tenso após as declarações

do físico Richard Seed sobre suas intenções de realizar clonagem humana (Petersen, 2002; Nisbet, Lewenstein, 2002).

Apesar dos dilemas éticos e das propostas de banimento total da tecnologia, a comunidade científica destacou o imenso potencial terapêutico derivado desse processo, particularmente no estudo das células-tronco embrionárias. Coletadas no estágio de blastocisto, estas células possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer tecido do organismo. Quando geradas a partir de embriões clonados do próprio paciente, elas carregam as mesmas instruções genéticas do doador, abrindo caminho para a medicina regenerativa e o transplante de tecidos e órgãos sem o risco de rejeição imunológica (Medeiros, F. N. D. S., 2013).

A CARTOGRAFIA DO DNA: DECIFRANDO AS 3 BILHÕES DE BASES NITROGENADAS

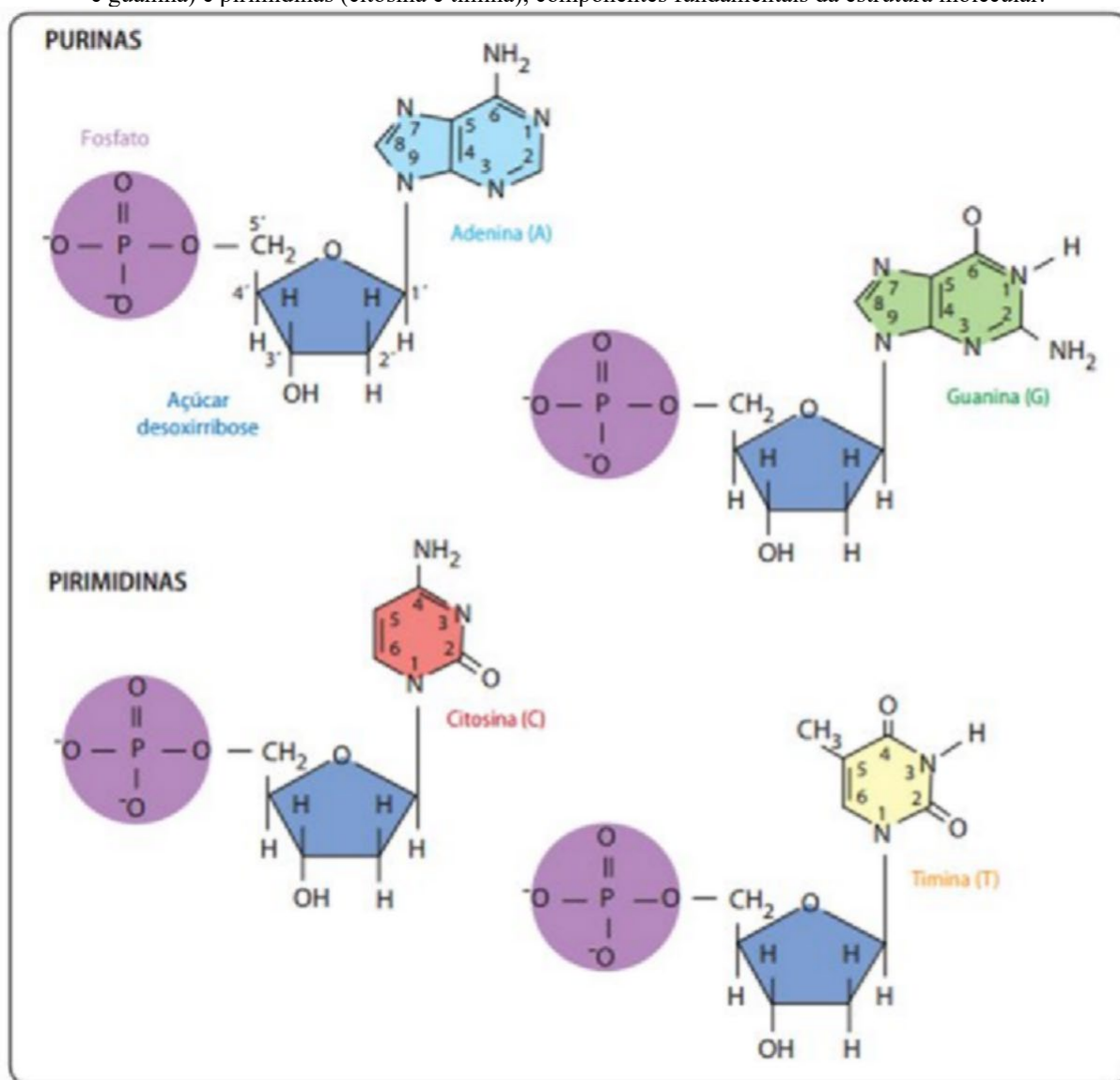
O surgimento do mapeamento do genoma humano consolidou-se com o lançamento do Projeto Genoma Humano (PGH), uma iniciativa monumental que estabeleceu como meta o sequenciamento das 3,1 bilhões de bases nitrogenadas que compõem o código genético de nossa espécie. O genoma, definido como o conjunto completo de DNA de um organismo, é estruturado pela ligação sequencial de nucleotídeos, cada um composto por uma molécula de fosfato, uma desoxirribose (açúcar) e uma base nitrogenada. Como as moléculas de açúcar e fosfato são constantes na estrutura, a identidade e a função de cada molécula de DNA são determinadas especificamente pela ordem das bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) (Góes, A. C. D. S., & Oliveira, B. V. X. D. et., al 2014).

A capacidade de decifrar essa ordem por meio do sequenciamento permitiu aos cientistas identificar as variações fundamentais que distinguem um indivíduo de outro e compreender a base molecular da hereditariedade. Ao mapear fragmentos específicos, como sequências do tipo AGCT, o projeto não apenas revelou a sequência linear das bases, mas abriu caminho para uma nova era na medicina e na biologia, onde a localização exata de cada gene no conjunto do patrimônio genético humano passou a ser conhecida. Esse mapeamento transformou o DNA em um mapa legível, essencial para o diagnóstico de doenças genéticas e o desenvolvimento de terapias personalizadas (Góes, A. C. D. S., & Oliveira, B. V. X. D. et., al 2014).

A estrutura do DNA é composta por quatro bases nitrogenadas, classificadas de acordo com sua complexidade molecular em purinas e pirimidinas (Figura 7). As purinas,

Adenina (A) e Guanina (G), apresentam uma estrutura de dois anéis, enquanto as pirimidinas, Citosina (C) e Timina (T), formam moléculas de um anel simples. A estabilidade da conformação em dupla hélice é garantida pelas pontes de hidrogênio, que mantêm a complementaridade entre as cadeias: a Adenina emparelha-se à Timina mediante uma dupla ligação, ao passo que a Guanina estabelece uma tripla ligação com a Citosina. Esse sistema de pareamento específico é fundamental não apenas para a integridade estrutural da molécula, mas também para a precisão na replicação e transmissão da informação genética (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2026).

Figura 7 – Estrutura química dos nucleotídeos do DNA. Classificação das bases nitrogenadas em purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (citosina e timina), componentes fundamentais da estrutura molecular.



Fonte: Adaptado de UFSC (2026).

VIGILÂNCIA GENÔMICA EM TEMPO REAL: JAQUELINE GOES E O SEQUENCIAMENTO DO SARS-COV-2

O avanço do monitoramento genético em tempo real no Brasil alcançou um marco histórico durante a pandemia de COVID-19, sob a liderança técnica da pesquisadora Jaqueline Goes de Jesus. Em um esforço conjunto entre o Instituto Adolfo Lutz e a USP, a equipe coordenada por Goes de Jesus e Claudio Tavares Sacchi conseguiu concluir o sequenciamento completo do genoma viral do segundo paciente brasileiro em apenas 24 horas. Este trabalho foi viabilizado pela infraestrutura do Centro Conjunto Brasil-Reino Unido (Cadde), que originalmente preparava pesquisadores para o monitoramento de arboviroses, como dengue e zika, mas que rapidamente adaptou seus protocolos para responder à emergência sanitária global.

A análise liderada por Jaqueline Goes de Jesus revelou dados epidemiológicos cruciais ao identificar que os genomas isolados nos dois primeiros casos brasileiros apresentavam linhagens distintas: enquanto o primeiro assemelhava-se ao vírus sequenciado na Alemanha, o segundo apresentava maior proximidade com o genoma identificado na Inglaterra. Essas variações, ambas diferentes das sequências originais chinesas, foram fundamentais para demonstrar que a transmissão do coronavírus já estava estabelecida de forma interna na Europa antes de chegar ao Brasil. A agilidade e a precisão do protocolo estabelecido pela pesquisadora e sua equipe foram tão significativas que atraíram a atenção de cientistas internacionais, consolidando o Brasil como uma referência na vigilância genômica em tempo real.

Para organizar a vasta abrangência desse campo, a biotecnologia é didaticamente classificada por um sistema de cores que identifica suas áreas de aplicação técnica e industrial. Essa taxonomia permite distinguir, por exemplo, a Biotecnologia Vermelha (saúde e fármacos) da Verde (agricultura e OGMs), além de setores estratégicos como a Branca (processos industriais e biomateriais), a Azul (recursos marinhos e limnologia) e a Cinza (saneamento e biorremediação ambiental). Essa padronização é fundamental para a governança científica, pois facilita a criação de marcos regulatórios específicos, a gestão de patentes e a comunicação interdisciplinar entre pesquisadores, indústrias e órgãos de bioética.

Tabela 2: A segmentação da biotecnologia em cores não reflete apenas uma distinção de mercado, mas sim a aplicação de paradigmas técnicos específicos. Enquanto a biotecnologia vermelha fundamenta-se na manipulação de ácidos nucleicos para fins terapêuticos, a biotecnologia branca prioriza a otimização cinética de enzimas em biorreatores industriais, demonstrando a versatilidade do campo frente a diferentes desafios globais.

Cor	Área de Atuação	Mecanismo Técnico Principal / Ferramentas
Vermelha	Saúde e Medicina	Tecnologia do DNA recombinante, terapia gênica, anticorpos monoclonais e vacinas de mRNA.
Verde	Agrícola	Transgenia (via <i>Agrobacterium</i>), edição genômica (CRISPR-Cas9) e cultura de tecidos vegetais.
Branca	Industrial	Biocatálise enzimática, fermentação de precisão e engenharia metabólica para bioprocessos.
Amarela	Alimentar e Nutrição	Modificação de vias biossintéticas para biofortificação e controle microbiológico de alimentos.
Azul	Marinha	Prospecção de metabólitos secundários e biopolímeros em organismos extremófilos aquáticos.
Cinza	Ambiental	Biorremediação (bioaumentação e bioestimulação) e tratamento biológico de efluentes.
Marrom	Zonas Áridas	Manejo genético de espécies xerófitas e biotecnologia veterinária em solos degradados.
Dourada	Bioinformática	Algoritmos de alinhamento de sequências, modelagem proteica e análise de Big Data genômico.
Violeta	Ética e Direito	Propriedade intelectual (patenteamento de sequências) e marcos regulatórios de biossegurança.
Laranja	Educacional	Divulgação científica e pedagogia aplicada às ciências biotecnológicas.
Preta	Bioterrorismo	Investigação forense molecular e desenvolvimento de contramedidas contra armas biológicas.

CONCLUSÃO

Quando mencionamos a biotecnologia, em sua natureza intrinsecamente multidisciplinar permite que, através da manipulação de microrganismos, células e biomoléculas, sejam desenvolvidas soluções para desafios globais urgentes. A versatilidade deste campo é evidenciada pela sua classificação cromática, que organiza aplicações que variam desde a medicina de precisão e o enfrentamento de patógenos letais (Biotecnologia Vermelha) até a recuperação de ecossistemas degradados por compostos xenobióticos (Biotecnologia Cinza) e a otimização da produtividade agrícola sustentável (Biotecnologia Verde).

O avanço contínuo de ferramentas como a edição genômica, a biocatálise industrial e a bioinformática reafirma o papel da biotecnologia como uma "tecnologia da esperança". Contudo, a eficácia dessas inovações é indissociável de uma governança ética rigorosa e de marcos regulatórios (Biotecnologia Violeta) que garantam a biossegurança. Em última análise, a integração harmoniosa entre as diversas vertentes biotecnológicas da prospecção marinha à segurança alimentar — não apenas redefine os limites da intervenção humana na natureza, mas estabelece a base para um desenvolvimento socioeconômico resiliente e tecnicamente avançado.

A trajetória da biotecnologia, desde a descoberta acidental da lise bacteriana por Alexander Fleming até o sequenciamento genômico ultraveloz realizado pela Dra. Jaqueline Goes de Jesus, revela um continuum de refinamento técnico e metodológico. O que antes levava décadas para ser compreendido em termos de estrutura molecular como observado nos esforços multidisciplinares para elucidar a dupla hélice do DNA, hoje é processado em escalas de horas, graças à automação do sequenciamento e à robustez dos protocolos de bioinformática. A biotecnologia consolidou-se não apenas como uma ferramenta diagnóstica, mas como uma ciência pragmática capaz de responder em tempo real a desafios globais, transformando a informação genética em soluções terapêuticas e vacinais precisas.

O legado de figuras como Rosalind Franklin e o rigor dos novos pesquisadores brasileiros demonstram que a soberania científica reside na capacidade de mapear a vida em sua unidade fundamental. A transição da biotecnologia empírica para a era da vigilância genômica e da edição gênica define um novo paradigma onde a biologia molecular, a engenharia química e a computação convergem. Assim, o futuro da medicina e da bioprospecção depende da manutenção desse ecossistema interdisciplinar, garantindo que o "código da vida" continue sendo decifrado em benefício da saúde pública e do desenvolvimento tecnológico global.

REFERÊNCIAS

- Gupta V, Sengupta M, Prakash J, Tripathy BC. An Introduction to Biotechnology. Basic and Applied Aspects of Biotechnology. 2016 Oct 23;1–21. doi: 10.1007/978-981-10-0875-7_1. PMCID: PMC7119977.
- Gonçalves, Ana Carolina & Santos, Breno Arles & Tonini, William & Souza, Carla. (2025). As Múltiplas Cores da Biotecnologia: um Arco-Íris de Aplicações. Revista de Gestão e Secretariado. 16. e4891. 10.7769/gesec.v16i5.4891.
- Capa, NOSSA (2009). Antony van Leeuwenhoek – inventor do específico. J Bras Patol Med Lab , 45 (2).
- Gest H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. Notes Rec R Soc Lond. 2004 May;58(2):187-201. doi: 10.1098/rsnr.2004.0055. PMID: 15209075.
- James J. Van Leeuwenhoek's ontdekking van bacteriën: een blik te ver vooruit [Van Leeuwenhoek's discovery of bacteria: a look too far ahead]. Ned Tijdschr Geneesk. 2004 Dec 25;148(52):2590-4. Dutch. PMID: 15646862.
- Smith KA. Louis pasteur, the father of immunology? Front Immunol. 2012 Apr 10;3:68. doi: 10.3389/fimmu.2012.00068. PMID: 22566949; PMCID: PMC3342039.
- Kyle RA, Shampo MA. Eduard Buchner. JAMA. 1981 May 22-29;245(20):2096. doi: 10.1001/ja-ma.245.20.2096. PMID: 7014942.
- Bennett, JW, & Chung, KT (2001). Alexander Fleming e a descoberta da penicilina.
- Teive, HA (2016). No centenário do nascimento de Francis HC Crick – da física à genética e à neurociência. Arquivos de Neuro-Psiquiatria , 74 (4), 351-353.
- Mayor, F. (1992). As biotecnologias no início dos anos noventa: êxitos, perspectivas e desafios. Estudos Avançados, 6, 07-28.
- Ferro, E. S. (2010). Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. estudos avançados, 24(70), 109-121.
- Medeiros, F. N. D. S. (2013). Fora da ordem natural: a natureza nos discursos sobre a clonagem e a pesquisa com células-tronco em jornais brasileiros. História, Ciências, Saúde-Manguinhos, 20(Suppl 1), 1185-1201.
- Góes, A. C. D. S., & Oliveira, B. V. X. D. (2014). Projeto Genoma Humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista Ciência Hoje. Ciência & Educação (Bauru), 20, 561-577.
- THE BRITISH MUSEUM. Painted wooden model group: four figures preparing food and beer. VI Dinastia (c. 2345–2181 a.C.). Disponível em: <https://www.britishmuseum.org/collection/ima-ge/68404001>. Acesso em: 24 abr. 2026.

VERKOLJE, Jan. Retrato de Antonie van Leeuwenhoek. 1686. 1 original de arte, óleo sobre tela, 56 x 47,5 cm. Rijksmuseum, Amsterdã. Disponível em: <https://www.rijksmuseum.nl/pt/colecao/SK-A-957>. Acesso em: 24 abr. 2026.

EDELFEIT, Albert. Louis Pasteur. 1885. 1 original de arte, óleo sobre tela, 154 cm × 126 cm. Musée d'Orsay, Paris. Disponível em: <https://www.musee-orsay.fr/pt/obras/louis-pasteur-1885>. Acesso em: 24 abr. 2026.

FAMIGLIA CRISTIANA. Alexander Fleming: lo scienziato che con la penicillina ha cambiato il mondo. Disponível em: <https://www.famigliacristiana.it/attualita/alexander-fleming-lo-scienziato-che-con-la-penicillina-ha-cambiato-il-mondo-xscmv7jy>. Acesso em: 24 abr. 2026.

BROWN, A. Barrington. James Watson and Francis Crick with their DNA model in 1953. 1953. Disponível em: <https://www.fotoarena.com.br/detalhes/foto?id=H400%2F0041&b=spl&ta=ima-gens>. Acesso em: 24 abr. 2026.

MARCOLIN, Neldson. A matéria desvendada. Revista Pesquisa FAPESP, São Paulo, ed. 218, abr. 2014. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/materia-desvendada/>. Acesso em: 24 abr. 2026.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC). **Estrutura do DNA**. Florianópolis: UFSC, [2026]. Disponível em: <https://geneticacomportamento.ufsc.br/biologiamolecular/es-trutura-do-dna/>. Acesso em: 24 abr. 2026.

MORTE CELULAR: UMA VISÃO GERAL

Renata de Almeida

Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

Durante o ciclo de vida, a morte celular faz parte de um evento biologicamente irreversível. Esse é um processo fisiológico essencial em grande parte dos organismos, sendo de grande importância na manutenção da regulação da resposta imune, no desenvolvimento embrionário e na homeostase tecidual (Kerr et al., 1972; Green, 2019).

Ultimamente, houve grandes avanços no entendimento em relação a morte celular, o que possibilitou caracterizar diferentes tipos de morte celular, como a apoptose, necroptose, autofagia e piroptose, bem como auxiliou identificar alguns genes associados a esses processos. Porém, informações distintas entre os diferentes tipos de morte celular e como ela se aplica no contexto das doenças são questões pouco exploradas (Green, 2019).

Embora tenham grande contribuições nos últimos tempos, muitas lacunas ainda existem acerca desse campo. Dados evidenciam que a morte celular possui um processo complexo, onde vários reguladores conduzem a manutenção do equilíbrio do microambiente celular, com isso modula a transição entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, bem como na transição entre sobrevivência e morte (Galluzzi et al., 2018; Gree, 2019).

A intensificação das averiguações sobre os mecanismos regulatórios que cerne a morte celular indica um potencial direcionamento para futuras investigações científicas (Shen et al, 2016). Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo destacar os mecanismos envolvidos na desregulação do equilíbrio entre diferentes destinos celulares, oferecendo uma base teórica para a compreensão da modulação da morte celular.

2 DEFINIÇÃO

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem. No desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas a morte, contribuindo para a formação dos órgãos e tecidos (Kerr et al., 1972).

A morte celular tem por definição a degeneração irreversível de funções celulares vitais (principalmente produção de ATP e conservação da homeostase redox) culminando na perda da integridade celular (permeabilização permanente da membrana plasmática ou fragmentação celular) (Kerr et al., 1972).

Podemos dividir a morte celular em três grupos: morte celular accidental, morte celular regulada e morte celular programada. A primeira delas, morte celular accidental caracteriza-se pela morte celular praticamente instantânea e incontrolável que corresponde a desmontagem física da membrana plasmática causada por sinais físicos, químicos ou mecânicos extremos. Já a morte celular regulada consiste em uma forma de morte celular que resulta da ativação de um ou mais módulos de transdução de sinal e pode, portanto, ser modulada farmacológica ou geneticamente (pelo menos cineticamente e até certo ponto). E a morte celular programada é uma forma particular de morte celular regulada que ocorre em ambientes estritamente fisiológicos, ou seja, não está relacionada com distúrbios da homeostase e, portanto, não ocorre no contexto de má adaptação ao estresse (Galluzzi et al., 2018).

3 CLASSIFICAÇÃO

Quanto a classificação da morte celular temos necrose e morte celular programada onde:

- Necrose – Se caracteriza por um tipo de morte celular não programada e é frequentemente causada por lesão traumática.
- Morte celular programada – Se caracteriza por uma forma controlada de morte celular, resulta de uma série de eventos moleculares e ocorre devido a resposta a vários sinais fisiológicos ou de desenvolvimento (Galluzzi, et al., 2018).

Além disso, a morte celular é classificada de acordo com a sua morfologia macroscópica e mecanismos pelos quais as células mortas e seus fragmentos são liberados. Dessa forma, ela é classificada: apoptose, autofagia e necrose (Galluzzi et al., 2018). A seguir falaremos sobre cada uma delas e apresentaremos suas principais características.

Apoptose – Nome vem do Grego: “apo”, que significa folha, e “ptosis”, que significa “cair” (D'Arcy, 2019). A apoptose ocorre fisiologicamente durante o desenvolvimento embrionário e o envelhecimento, desempenhando papel fundamental na manutenção da homeostase tecidual por meio do controle das populações celulares. Além disso, atua como um importante mecanismo de defesa, sendo ativada em resposta a agentes nocivos, danos

celulares decorrentes de doenças ou durante reações imunológicas. Embora exista uma ampla variedade de estímulos, tanto fisiológicos quanto patológicos, capazes de induzir a apoptose, a resposta celular não é uniforme. Diferentes tipos celulares podem apresentar sensibilidades distintas a um mesmo estímulo, de modo que nem todas as células necessariamente desencadearão o processo apoptótico sob as mesmas condições (Elmore, 2007). Ela se caracteriza morfológicamente por apresentar condensação citoplasmática e nuclear, fragmentação de DNA, formação de corpos apoptóticos que são fagocitados e degradados nos lisossomos e exposição a fosfatidilserina (D'Arcy, 2019). A apoptose vai ocorrer principalmente através de duas vias, a via intrínseca (mitocondrial) e a extrínseca (receptores de morte). A primeira delas, intrínseca, é desencadeada por fatores internos como danos no DNA, estresse oxidativo, hipóxia, proteínas mal dobradas e muitos outros (McIlwain, et al, 2015; D'Arcy, 2019). Em resposta ao estresse intracelular, a ativação de proteínas BH3 pró-apoptóticas inibe proteínas antiapoptóticas, permitindo que BAX e BAK formem poros mitocondriais e liberem citocromo C no citosol. O citocromo C liberado forma um apoptossomo com fator ativador de protease apoptótica-1 (Apaf-1) e, por sua vez, ativa a caspase-9, levando à degradação de componentes intracelulares e à indução de apoptose (D'Arcy, 2019). Em seguida temos a via extrínseca que é ativada por ligantes extracelulares (fator de necrose tumoral [TNF]- α e ligante Fas [FasL]) que se ligam aos receptores de morte, que seriam, por sua vez, receptores TNF e Fas, respectivamente. Após os ligantes extracelulares se ligarem aos receptores de morte, complexos de sinalização indutores de morte (DISCs) são formados e recrutam e ativam caspases iniciadoras, como caspase-8 e caspase-10. Essas caspases iniciadoras então clivam e ativam caspases efetoras, como caspase-3, -6 e -7, levando a degradação de componentes intracelulares e à indução de apoptose (Ashkenazi & Dixit, 1998; Elmore, 2007).

Autofagia – Nome vem do grego: “auto” que significa próprio e “fagia” que significa de-vorador. Esse tipo de morte celular leva a reciclagem de moléculas intracelulares e manutenção da homeostase. Possui como características morfológicas e bioquímicas a condensação parcial da cromatina, aumento dos vacúolos autofágicos, sem escada para o DNA, aumento da atividade do lisossoma e Caspase independente. Já foram identificados três tipos distintos de autofagia, sejam eles a macroautofagia, microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e autose. Na macroautofagia, diante de condições diversas, como estresse oxidativo, exposição a agentes tóxicos ou privação de nutrientes, a autofagia pode se tornar desregulada e resultar em morte celular. Nela há formação de membranas duplas que englobam organelas e componentes citoplasmáticos que, por sua

vez, se fundem com lisossomos para formar autolisossomos. E as enzimas lisossomais vão degradar o conteúdo do autolisossoma. Já a microautofagia é caracterizada pelo engolfamento de organelas e componentes citoplasmáticos direto no lisossomo e a degradação dos componentes celulares pela digestão lisossômica. A autofagia mediada por chaperonas se caracteriza pela degradação de proteínas específicas via proteínas chaperonas que as transportam para os lisossomos, ocorrendo a degradação completa da proteína. Essa degradação ocorre, pois, a proteína HSC70 presente em lisossomos, reconhece o substrato e faz com que tenha internalização no lúmen lisossomal através de um receptor de membrana chamado LAMP2A, local onde a proteína deve se degradar por completo (Sever & Demir, 2017). A autose é caracterizada por um tipo específico de morte celular genética e apresenta morfologias diferentes das células apoptóticas e necróticas. Tendo como características mais marcante a resultante expansão focal do espaço perinuclear induzida pela presença de Na⁺,K⁺-ATPase ativa, a separação da membrana nuclear interna e externa e o resgate é realizado pela inibição da Na⁺,K⁺-ATPase, seja pelos glicosídeos cardíacos ou pelo *knockdown* (Liu & Levine, 2015; Galluzzi L, et al., 2018).

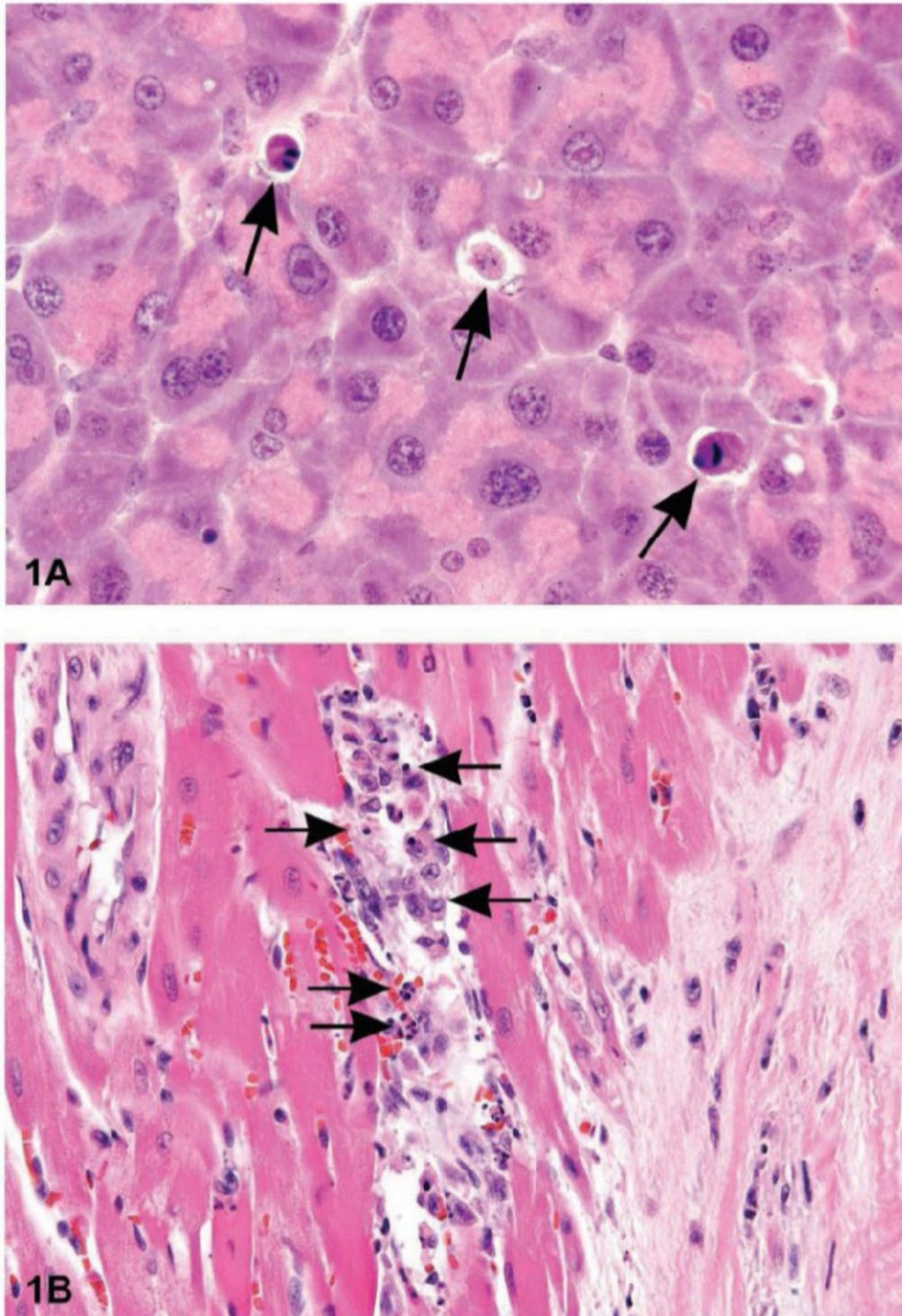
Necrose - O termo “necrose” vem das palavras gregas “nekros”, que significa morto ou cadáver, e “osis”, que significa processo, referindo-se especificamente a destruição e degeneração. A necrose é uma forma patológica e descontrolada de morte celular, marcada por inchaço celular, ruptura da membrana, dilatação da membrana nuclear, condensação de cromatina leve a moderada, variação das estruturas autofágicas e liberação de conteúdo intracelular, causando inflamação e dano tecidual. A necrose pode ser desencadeada por estímulos extracelulares, como a ligação do TNF- α ao seu receptor de morte TNFR1 na membrana plasmática. A ativação desse receptor promove o recrutamento de proteínas adaptadoras, como TRADD, resultando na ativação subsequente das quinases associadas ao receptor, especialmente RIPK1. Após sua ativação, RIPK1 interage com RIPK3, formando um complexo multiproteico no qual RIPK3 é ativado por fosforilação. Esse complexo, conhecido como necrossoma, promove a fosforilação da proteína MLKL. Uma vez fosforilada, MLKL sofre oligomerização e se transloca para a membrana plasmática, onde forma estruturas semelhantes a poros. Esses complexos interagem com fosfatidilinosítídeos da membrana, levando à sua permeabilização e consequente ruptura celular. Como resultado, ocorre a liberação de biomoléculas intracelulares denominadas padrões moleculares associados a dano (DAMPs), que podem desencadear resposta inflamatória no tecido adjacente (D'Arcy, 2019).

4 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

A análise morfológica celular constitui uma ferramenta essencial para a avaliação do tamanho, da forma, da arquitetura e da organização estrutural das células. Essa abordagem é amplamente empregada tanto em diagnósticos patológicos quanto em investigações biológicas, contribuindo para a identificação de alterações celulares associadas a processos fisiológicos e patológicos (Yu, et L, 2013; Marshall, 2016). Aqui falaremos um pouco sobre os principais métodos de análise morfológica celular: microscopia óptica; microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica.

Microscopia óptica - É uma técnica de coloração de tecidos que utiliza corantes para evidenciar estruturas do organismo. A hematoxilina é um corante básico que cora substâncias ácidas, como o DNA do núcleo de uma célula. A eosina é um corante ácido que cora substâncias básicas, como o citoplasma da célula (Elmore, 2007). Na figura 1 temos um exemplo de coloração realizada com hematoxilina e eosina no tecido de camundongo.

Figura 1: Lâmina com coloração com hematoxilina e eosina



1A – Pâncreas do camundongo: setas representam células apoptóticas; citoplasma condensado e núcleos picnóticos. 1B - miocárdio de rato: setas indicam células apoptóticas e núcleo fragmentado. Adaptado de “Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495-516”.

Secções marcadas com azul de toluidina – O azul de toluidina, pertencente ao grupo das tiazinas, é um corante parcialmente solúvel em água e álcool, que tem a capacidade de marcar seletivamente componentes ácidos. Ele apresenta grande afinidade por ácidos nucleicos, logo ele tem a capacidade de se ligar ao material nuclear de tecidos com alto teor de RNA e DNA (Sridharan & Shankar, 2012). Na figura 2 temos um exemplo de uma lâmina com o corte transversal de um camundongo corada com azul de toluidina

Figura 2: Lâmina com coloração de azul de toluidina



Corte transversal do nervo ciático de um rato corado com azul de toluidina. Nele é possível ver cortes em diferentes ampliações (10X e 20X).

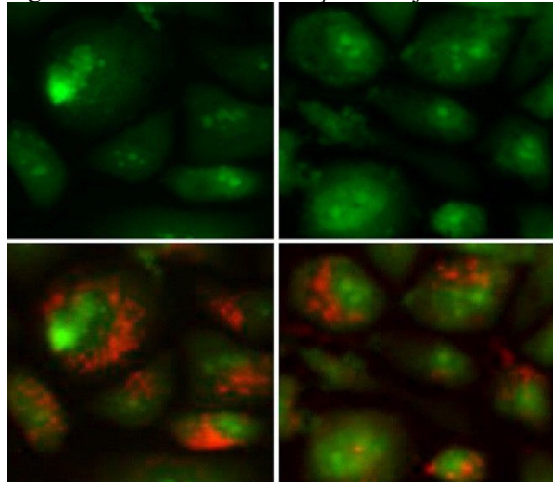
Adaptado de “Ghnenis AB, Czaikowski RE, Zhang ZJ, Bushman JS. Toluidine Blue Staining of Resin-Embedded Sections for Evaluation of Peripheral Nerve Morphology. J Vis Exp. 2018 Jul 3;(137):58031”.

Microscopia de fluorescência – É uma ferramenta fundamental de imagem para pesquisadores que disponibiliza imagens de alta resolução de contraste molecular auxiliando na compreensão de processos biológicos em nível celular (Datta et al., 2020; Hickey et al., 2021).

Um dos corantes utilizados na microscopia de fluorescência é a laranja de acridina que é um corante catiônico capaz de se intercalar aos ácidos nucleicos, promovendo a marcação tanto de DNA quanto de RNA, onde ela emite fluorescência verde ao se ligar ao DNA de fita dupla e vermelho/laranja ao se ligar ao RNA ou DNA de fita simples. Embora seja amplamente utilizada para avaliação morfológica e detecção de alterações nucleares, esse corante não permite diferenciar, de forma precisa, células viáveis de células não viáveis. Entretanto, por outro lado, o brometo de etídio é um agente intercalante de ácidos nucleicos que apresenta permeabilidade seletiva, penetrando apenas em células com comprometimento da integridade da membrana plasmática. Dessa forma, é utilizado como marcador de células com perda de viabilidade celular (Damas-Souza et al., 2019). Na figura

3 é possível observar a marcação do corante de laranja de acridina marcando o citoplasma e nucléolo em verde.

Figura 3: Lâmina com coloração laranja de acridina.



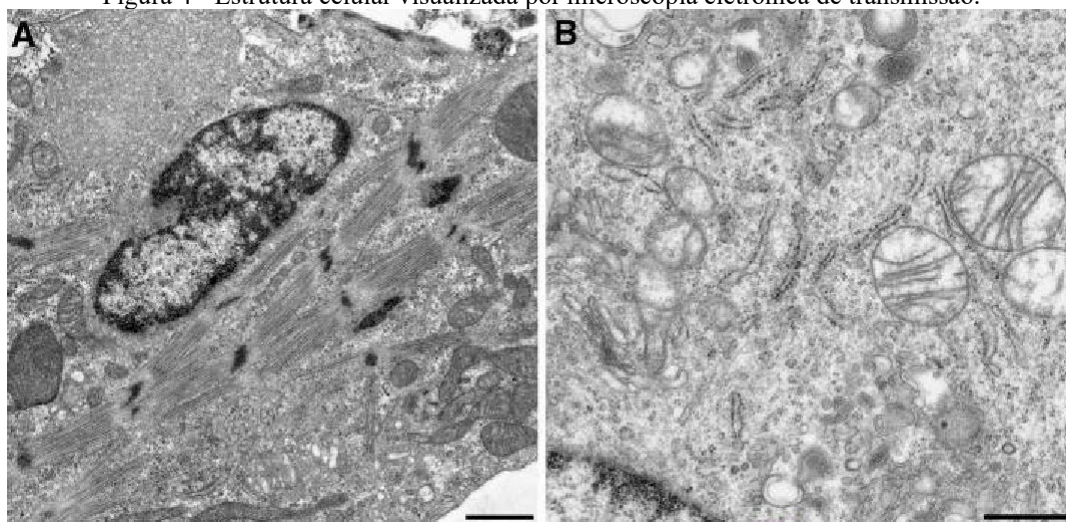
A coloração com laranja de acridina foi utilizada para detectar os vacúolos autofágicos. Na coloração com laranja de acridina, o citoplasma e o nucléolo fluorescem em verde, enquanto os compartimentos ácidos fluorescem em vermelho vivo ou vermelho-alaranjado.

Adaptado de: “Shin SW, Kim SY, Park JW. Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(2):451-457”.

Microscopia eletrônica – é uma tecnologia que foi utilizada pela primeira vez na década de 1940 sendo muito importante para a biologia celular. Sua aplicação envolve a obtenção de cortes finos e sua resolução pode atingir subnanométrica (Winey et al., 2014).

Abaixo (figura 4) temos imagens da complexidade da estrutura celular vista em microscopia de transmissão (MET). As amostras foram preparadas através da fixação química convencional.

Figura 4 - Estrutura celular visualizada por microscopia eletrônica de transmissão.



(A) Organização do citoesqueleto de actina-miosina em cardiomiócito cultivado, preparado por fixação química convencional. Barra de escala: 1 μ m. (B) Ultraestrutura de organelas citoplasmáticas em macrófago de camundongo submetido à fixação química convencional. Barra de escala: 700 nm.

Adaptado de “Winey M, Meehl JB, O’Toole ET, Giddings TH Jr. Conventional transmission electron microscopy. Mol Biol Cell. 2014 Feb;25(3):319-23”.

5 CONCLUSÃO

A morte celular regulada faz parte de um processo central na biologia dos organismos multicelulares, onde tem importante função na modulação das respostas inflamatórias e imunológicas e homeostase tecidual. Ademais, a fisiopatologia de várias doenças está estritamente associada a desregulação.

Compreender os diferentes tipos de morte celular regulada e seu impacto no micro-ambiente, seja ele local ou sistêmico, principalmente em situação de estresse, expande a perspectiva sobre a sua complexidade funcional e relevância clínica. Nesse contexto, novas estratégias terapêuticas estão surgindo com a expectativa de modular os processos específicos, levando em consideração os efeitos biológicos distintos.

Contudo, os estudos relacionados a interferências sobre os mediadores liberados no processo de morte celular, como padrões moleculares associados a dano (DAMPs), constitui um método promissor para atenuar as respostas inflamatórias e otimizar os resultados clínicos a longo prazo. Portanto, se aprofundar nos conhecimentos dos mecanismos regulatórios da morte celular firmar-se como pilar central para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281(5381):1305-1308. doi:10.1126/science.281.5381.1305
- D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-592. doi:10.1002/cbin.11137
- Damas-Souza DM, Nunes R, Carvalho HF. An improved acridine orange staining of DNA/RNA. *Acta Histochem*. 2019;121(4):450-454. doi:10.1016/j.acthis.2019.03.010
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.
- Datta R, Heaster TM, Sharick JT, Gillette AA, Skala MC. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *J Biomed Opt*. 2020 May;25(7):1-43. doi: 10.1117/1.JBO.25.7.071203. PMID: 32406215; PMCID: PMC7219965.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
- Green DR. The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. *Cell*. 2019;177(5):1094-1107. doi:10.1016/j.cell.2019.04.024
- Ghnenis AB, Czaikowski RE, Zhang ZJ, Bushman JS. Toluidine Blue Staining of Resin-Embedded Sections for Evaluation of Peripheral Nerve Morphology. *J Vis Exp*. 2018 Jul 3;(137):58031. doi: 10.3791/58031. PMID: 30035773; PMCID: PMC6102041.
- Hickey SM, Ung B, Bader C, Brooks R, Lazniewska J, Johnson IRD, Sorvina A, Logan J, Martini C, Moore CR, Karageorgos L, Sweetman MJ, Brooks DA. Fluorescence Microscopy- An Outline of Hardware, Biological Handling, and Fluorophore Considerations. *Cells*. 2021 Dec 23;11(1):35. doi: 10.3390/cells11010035. PMID: 35011596; PMCID: PMC8750338.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-257. doi:10.1038/bjc.1972.33
- Liu Y, Levine B. Autophagy and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ*. 2015 Mar;22(3):367-76. doi: 10.1038/cdd.2014.143. Epub 2014 Sep 26. PMID: 25257169; PMCID: PMC4326571.
- Marshall WF. Cell geometry: how cells count and measure size. *Annu Rev Biophys*. 2016;45:49-64.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr 1;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656. Erratum in: *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Apr 01;7(4):a026716. doi: 10.1101/cshperspect.a026716. PMID: 23545416; PMCID: PMC3683896.

Sever ON, Demir OG. Autophagy: cell death or survive mechanism. *J Oncol Sci.* 2017;3(2):37-44. doi:10.1016/j.jons.2017.07.001.

Shin SW, Kim SY, Park JW. Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(2):451-457. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.10.014

Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012 May;16(2):251-5. doi: 10.4103/0973-029X.99081. PMID: 22923899; PMCID: PMC3424943.

Winey M, Meehl JB, O'Toole ET, Giddings TH Jr. Conventional transmission electron microscopy. *Mol Biol Cell.* 2014 Feb;25(3):319-23. doi: 10.1091/mbc.E12-12-0863. PMID: 24482357; PMCID: PMC3907272.

Yu H, Lim KP, Xiong S, Tan LP, Shim W. Functional morphometric analysis in cellular behaviors: shape and size matter. *Adv Healthc Mater.* 2013;2(9):1188-1197. doi:10.1002/adhm.201300053.

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR: EXPLORANDO RESAZURINA E MTT NA BIOTECNOLOGIA

Caroline de Souza Ferreira Pereira

Universidade Federal Fluminense - Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde, Faculdade de Farmácia, Rua Mário Viana, 523 - Santa Rosa, CEP 24241-000, Niterói, RJ, Brasil.
Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz Av. Brasil 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

Os ensaios citotoxicidade e de viabilidade celular apresentam um papel fundamental na avaliação de efeitos citotóxicos de diversas químicas, e na triagem de fármacos. A quantificação da proliferação e viabilidade celular são princípios para diversos ensaios *in vitro*, investigando as respostas celulares a condições externas. A importância desses ensaios compreende a sua reprodutibilidade, baixo custo e rapidez, em que se tornam ferramentas amplamente eficientes na avaliação de um grande volume de amostras (KHALEF et al., 2024).

A viabilidade celular está relacionada com a quantidade de células saudáveis em uma determinada amostra. Por isso, os métodos de viabilidade celular observam células individuais e populações inteiras. A análise populacional é considerada mais rápida, mas apresenta resultados menos detalhados quando comparado com avaliações de células únicas (STODDART, 2011).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a análise da viabilidade celular, como por exemplo, testes colorimétricos simples, bem como estudos de células individuais aprofundadas. Estes ensaios constituem em diferentes funções celulares, como, permeabilidade da membrana, adesão celular, atividade metabólica, atividade enzimática, atividade de captação de nucleotídeos, absorção de corantes, geração de ATP (adenosina 5'-trifosfato), síntese de coenzimas, e síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) (KHALEF et al., 2024).

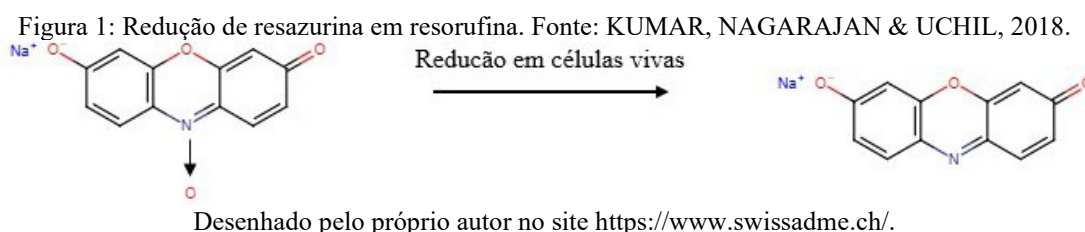
O ensaio de exclusão do corante azul de tripano foi um dos primeiros métodos para avaliação da viabilidade celular e ainda é extremamente utilizado atualmente. Este método consiste no princípio em que as células viáveis, ou seja, com a membrana plasmática intacta, o corante não permeia. Enquanto isso, células mortas aparecem azuis absorvendo

o azul de tripano, pois sua membrana não consegue controlar a passagem de macromoléculas. Para este ensaio, é necessário que as células estejam em suspensão, sejam visualizadas e contadas ao microscópio, com a utilização da câmara de Neubauer, ou pela contagem em dispositivos automatizados. Com isso, é possível calcular o número total de células, bem como porcentagem de células viáveis em uma população (STODDART, 2011).

Alguns ensaios metabólicos que podem ser citados são os ensaios de resazurina, sais de tetrazólio, ensaio de MTT, XTT, MTS, WST, calceína-AM, ensaio de ATP, ensaio de lactato desidrogenase etc. Enquanto os ensaios de exclusão de corantes são ensaios com azul de tripan, ensaio de eosina, ensaio de eritrosina B. E ensaios de absorção de corantes são ensaios com vermelho neutro, Janus Green B etc. E ensaios de BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina) e captação de timidina marcada com trítio são citados como ensaios de síntese de DNA (KHALEF et al., 2024).

2 RESAZURINA

A resazurina é um indicador da capacidade metabólica, descoberta por Weselsky e utilizada desde o final da década de 1920, com a finalidade de avaliar a infestação bacteriana do leite. A partir de então, esse corante redox tem sido usado como indicador do metabolismo ativo em culturas de células em diferentes aplicações, como por exemplo, proliferação em cultura, citotoxicidade ou estudos de viabilidade celular. Este ensaio baseia-se na redução intracelular da resazurina em resorufina por células viáveis e metabolicamente ativas (Figura 1), cuja redução é descrita utilizando NADPH e NADH como fonte de elétrons (PRÄBST et al., 2017).



A resazurina pode ser dissolvida em soluções fisiológicas, permitindo a utilização direta em culturas de células. Sua solução apresenta a cor de azul intensa, e nenhuma ou pouca fluorescência intrínseca, em que a resazurina se difunde pelas membranas celulares, e é reduzida, metabolicamente, por células viáveis ao produto fluorescente de cor rosa, resorufina que também é permeável. A principal vantagem deste ensaio, quando comparado

com ensaios em sais de tetrazólio, é caracterizado por ser um produto hidrossolúvel, e fluorescente, além dos custos baixos e a possibilidade da combinação com outros ensaios (PRÄBST et al., 2017).

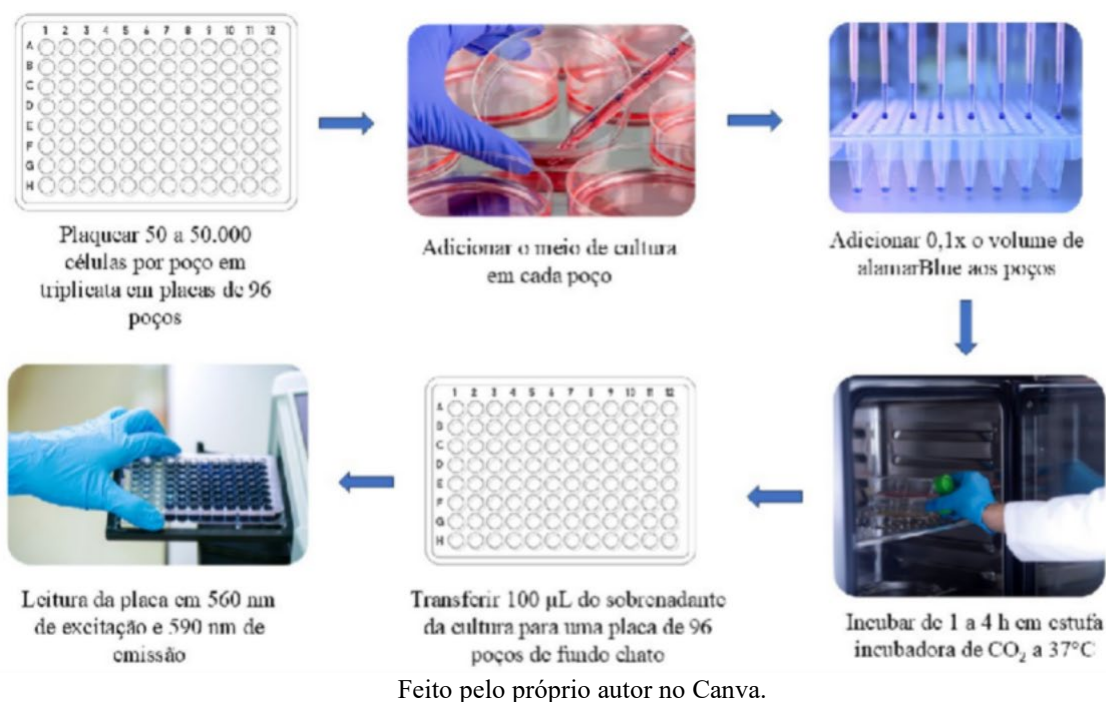
Os testes com resazurina são conhecidos por serem mais confiáveis e sensíveis do que ensaios de corantes de tetrazólio, no entanto, diversas condições precisam ser consideradas antes de realizar o ensaio com resazurina. A resorufina, quando excitada em comprimento de onda de 579 nm, emite um sinal fluorescente em 584 nm. Além disso, o máximo de absorbância da resazurina está em 605 nm, e da resorufina em 573 nm, entretanto, somente a resorufina pode ser analisada de modo fluorimétrico, diferentemente da resazurina (PRÄBST et al., 2017).

Além disso, a curva de aumento da resorufina apresenta uma faixa linear limitada, cuja faixa é dependente do pH, da concentração inicial de resazurina e da temperatura. Esses critérios devem ser constantes, a fim de evitar a presença de artefatos, principalmente durante a medição e incubação. A redução da resazurina a resorufina, em determinados casos, não é a etapa final da reação, em que a resorufina pode ser reduzida a di-hidroresorufina, cujo composto é altamente tóxico para as células, e não exibe fluorescência (PRÄBST et al., 2017).

A respeito das vantagens deste método, pode-se observar a ausência de toxicidade, não ocasionar lise celular, apresentar alta sensibilidade, sua leitura pode ser realizada por absorbância e/ou fluorescência, é escalável, e pode ser utilizado em diversos modelos celulares. Dentre as suas desvantagens, destacam-se a sua sensibilidade e à luminosidade, alguns compostos que estão sendo testados podem afetar a sensibilidade da técnica, além, da necessidade de equipamentos específicos para a leitura (GUTERRES et al., 2024).

Sobre o protocolo de ensaio de resazurina em placas de cultura de tecidos de 96 poços, inicialmente plaqueia-se de 50 a 50.000 células por poço em triplicata, utilizando células tratadas como poços controle, além de poços de controle sem células. De acordo com o volume do meio de cultura, previamente adicionado, adicionar 0,1 x o volume de resazurina ao poço. Posteriormente, incubar de 1 a 4 horas a 37°C em uma incubadora com CO₂ e após o período de incubação, transferir 100 µL do sobrenadante da cultura para uma placa de 96 poços de fundo chato, e seguir para a leitura em leitor de placas (Figura 2) (KUMAR, NAGARAJAN & UCHIL, 2018).

Figura 2: Esquema ilustrativo do ensaio de Resazurina. Fonte: KUMAR, NAGARAJAN & UCHIL, 2018.



Dentre suas primeiras aplicações, destaca-se o estudo de Newbould (1967), em que foi realizado um estudo *in vitro* quantitativo, para avaliar a interação entre leucócitos de leite bovino e estafilococos, observando a redução da resazurina no leite integral normal, comparando com a presença de leucócitos em outro leite, bem como sua capacidade de multiplicação (NEWBOULD, 1967). Além disso, o estudo de De Jong & Woodief (1977) demonstrou a redução da resazurina em resorufina em folhas de tabaco, apresentando ampla atividade específica em diversas desidrogenases importantes ligadas a nucleotídeos de piridina. O ensaio obteve uma sensibilidade com alta especificidade de substrato, além de baixo ruído de fundo, os quais foram possibilitados pela utilização de preparações enzimáticas diluídas (DE JONG & WOODLIEF, 1977).

Para determinação da concentração inibitória mínima de fármacos contra os microrganismos, a técnica de microdiluição em caldo é classificada como padrão ouro e assim, avaliando *in vitro*, a suscetibilidade fúngica. No estudo de Rosa e colaboradores (2019), a resazurina foi utilizada como indicadora de crescimento de *Sporothrix brasiliensis*, em microdiluição em caldo, no entanto, não demonstrou ser um ensaio eficaz neste estudo pois não houve alteração na coloração da resazurina (ROCA et al., 2019).

Mycobacterium tuberculosis, que causa a tuberculose, é um grave problema de saúde pública mundial. O teste tuberculínico cutâneo é um dos métodos de diagnóstico da tuberculose latente, classificando os pacientes em não reativos ou reativos, e se baseia na

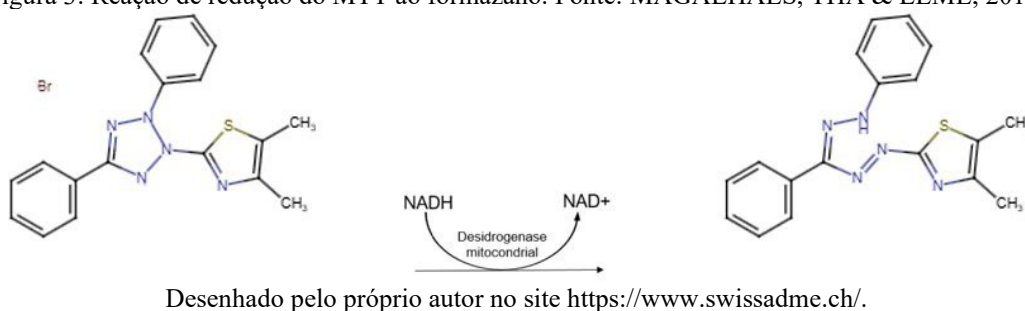
contagem manual, em placas de Petri, de unidades formadoras de colônias para avaliar crescimento ou morte bacteriana, mas é um processo demorado. Com isso, no estudo de Castro (2017), com a finalidade de otimizar tempo e custos necessários, a resazurina foi utilizada para avaliar a atividade microbida de células mononucleares de sangue periférico, no entanto, houve divergências ao comparar o método tradicionalmente utilizado com a utilização da resazurina (CASTRO, 2017).

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, cuja doença é negligenciada e ainda atinge milhões de indivíduos (ROSSI, SOUZA & RAMIREZ, 2024). No estudo de Rólon e colaboradores (2006), o uso da resazurina teve a finalidade de medir a citotoxicidade de compostos contra o protozoário *T. cruzi*. Para validar este ensaio, os autores ajustaram as condições experimentais, como por exemplo, o tempo de incubação, a concentração do corante, o número de parasitas, tendo em consideração o limite inferior de detecção, bem como a linearidade. Além disso, as medições foram comparadas com a contagem manual microscópica, tendo resultados similares, e assim demonstrando que o ensaio de resazurina pode ser utilizado para a triagem de novos possíveis compostos tripanocidas (RÓLON et al., 2006).

3 MTT

Mosmann (1983) foi o primeiro a descrever o ensaio de MTT, brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil tetrazólio, em que as células viáveis convertem um sal de tetrazólio solúvel em um precipitado de formazan insolúvel (Figura 3). Os cristais de formazan apresentam cor púrpura e sua densidade óptica pode ser analisada em espectrofotômetro de microplacas, enquanto o sal de tetrazólio possui coloração amarelada. No estudo de Twentyman & Luscombe (1987), a aplicação deste ensaio com MTT foi para analisar a resposta de linhagens celulares frente a drogas citotóxicas, assim como a capacidade de diferentes compostos modular resistência em determinadas linhagens celulares. Este ensaio tem como objetivo analisar a viabilidade das células em cultivo, assim como a citotoxicidade, além de estudos de proliferação em biologia celular (TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987; DANTAS, 2016).

Figura 3: Reação de redução do MTT ao formazano. Fonte: MAGALHÃES, THÁ & LEME, 2018.



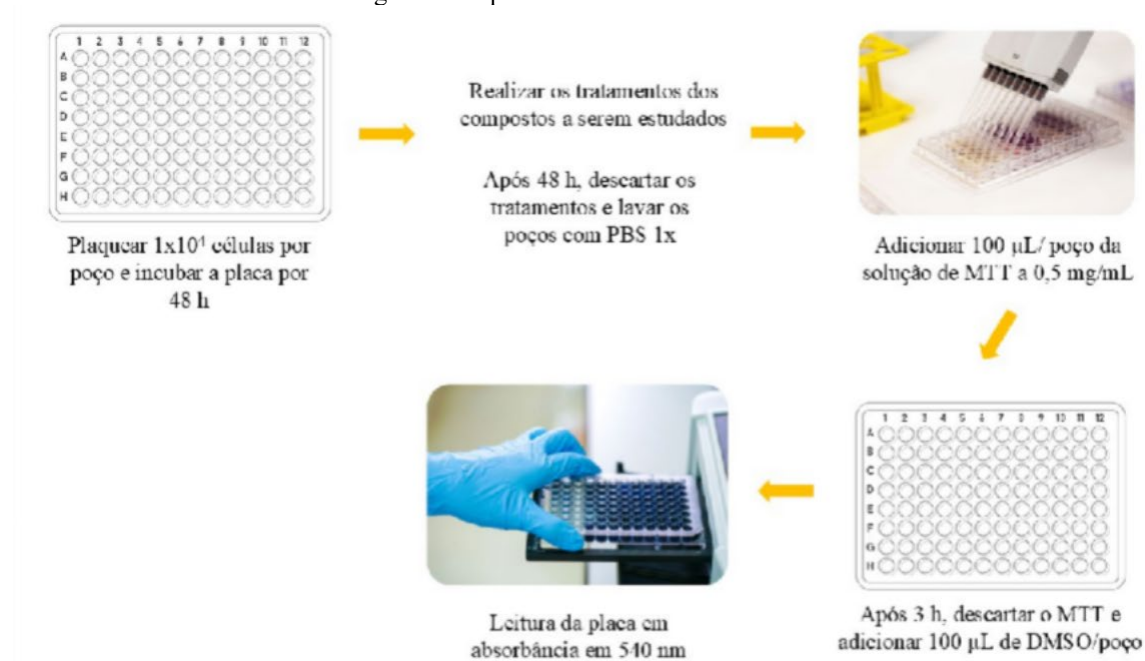
Dentre suas diversas aplicações, no estudo de Aziz, Ahlswede & Enbergs (2005), o MTT foi utilizado para analisar a viabilidade de esperma equino, comparando a eficiência deste ensaio com a citometria de fluxo, buscando uma alternativa simples e de baixo custo. Diferentes métodos podem ser utilizados para avaliação da qualidade de amostras de sêmen, em que a metodologia mais comum é a análise visual da porcentagem de espermatozoides móveis. Embora seja um método de baixo custo e rápido, é subjetivo e pode sofrer influência do pesquisador ao realizar a contagem (AZIZ, AHLWEDE & ENBERGS, 2005).

Dentre as diversas metodologias, destaca-se a citometria de fluxo, devido a avaliação, de forma rápida e objetiva, de células individualmente, além da estimativa de milhares de células por amostra, de forma qualitativa e quantitativa. Outros métodos, baseiam-se na análise computadorizada da motilidade dos espermatozoides, em que o sistema utiliza computador, câmera e software para análise e registro dessa motilidade. Além disso, o método que avalia a atividade redutora de espermatozoides é uma das formas de verificar a atividade metabólica dos espermatozoides, reduzindo corantes específicos, como por exemplo, azul de metileno e resazurina utilizados na avaliação da qualidade do sêmen de touro e javali, respectivamente (AZIZ, AHLWEDE & ENBERGS, 2005).

O ensaio de MTT, através da avaliação da análise da atividade de desidrogenases mitocondriais, quantifica o dano ocasionado no metabolismo celular de glicídeos. Sendo assim, este ensaio é consideravelmente utilizado devido sua sensibilidade na determinação de agentes potencialmente citotóxicos. A respeito do seu protocolo para a utilização, é recomendado, primeiramente que as células sejam plaqueadas em placas de 96 poços, e após 48 horas de tratamento com os compostos de interesse, descarta-se esses tratamentos com o uso da pipeta multicanal, e depois esses poços serão lavados com solução de PBS. Após a lavagem, adiciona-se 100 µL de MTT na concentração de 0,5 mg/mL em cada poço, em que a placa ficará em incubação por três horas, a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período,

o MTT será descartado e será adicionado 100 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) por poço. Por fim, será realizada a leitura em absorbância da placa com o filtro de 540 nm em espectrofotômetro de microplacas (Figura 4) (MAGALHÃES, THÁ & LEME, 2018).

Figura 4: Esquema ilustrativo do ensaio de MTT.



Fonte: MAGALHÃES, THÁ & LEME, 2018.
Feito pelo próprio autor no Canva.

Nanomateriais são utilizados em diferentes aplicações, como por exemplo, na medicina, biologia e química. Com essa utilização, a toxicidade de nanopartículas não é amplamente conhecida, o que justifica a busca pela segurança ocupacional, principalmente para identificar os possíveis riscos pela exposição de trabalhadores de indústrias às nanopartículas. Alguns ensaios foram utilizados para identificar essas possíveis interferências das nanopartículas, como por exemplo, vermelho neutro, Alamar Blue, WST-1 (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio), e MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). No estudo de Almutary & Sanderson (2016), foram testados dois tipos de ensaios de citotoxicidade (MTT e cristal violeta) para averiguar a interferência de oito nanopartículas, dentre elas, nanopartículas de ouro, negro de fumo, dióxido de silício, oligomérico poliédrico e pontos quânticos de sulfeto de cádmio. Com isso, observa-se a versatilidade da utilização do ensaio de MTT. No entanto, é necessária uma escolha criteriosa do método a ser utilizado, tendo em vista que, no caso

deste estudo, houve alterações nas medições de densidade óptica pela presença de determinadas nanopartículas (ALMUTARY & SANDERSON, 2016).

Além disso, o MTT pode ser utilizado em protocolos para avaliação microbiológica, como por exemplo, avaliação da formação de biofilme, avaliação indireta da quantificação de compostos antibacterianos, bem como a determinação de bactérias multirresistentes. Ou seja, a aplicação deste teste permite aumentar a sensibilidade, assim como pode ser um método adicional, ou até mesmo alternativo, para a avaliação da concentração inibitória mínima, em que o MTT poderia ser adicionado em medições de turbidez padrão. Também pode ser empregado na avaliação do crescimento de microrganismos em meios solidificados, em que posteriormente, as zonas de inibição poderiam ser medidas, com exatidão pela intensidade de saturação do formazan na cultura (GRELA, KOZŁOWSKA & GRABOWIECKA, 2018).

No entanto, utilizando os protocolos atuais no ensaio de MTT, células normais e sem tratamento, apresentam grânulos intracelulares de formazan, além disso, depósitos extracelulares de formazan podem induzir resultados falso-positivos, com graves erros na avaliação da viabilidade das células. Estudos anteriores demonstraram, através de microscopia confocal com detecção por luz retroespalhada, que a membranas plasmática, retículo endoplasmático, e o citosol são possíveis sítios de redução do MTT em células de mamífero, ou seja, a maior parte dos depósitos de formazan não se localizavam nas mitocôndrias (STOCKERT et al., 2018).

A respeito dos mecanismos de redução e compartimentalização intracelular dos sais de tetrazólio, estudos anteriores constataram a participação de diferentes organelas, como lisossomos, mitocôndrias, membrana plasmática e endossomos, demonstrando que não é um processo exclusivo de um único compartimento celular. Embora o formazan derivado do MTT não apresenta fluorescência detectável em determinados solventes orgânicos, observa-se emissão significativa quando o composto se encontra em meios de maior viscosidade. A natureza lipofílica do formazan de MTT favorece sua associação a compartimentos ricos em lipídios. Foi demonstrada captação do formazano em gotículas lipídicas e no aparelho de Golgi em células HeLa tratadas com emulsão de óleo de girassol (STOCKERT et al., 2018).

No estudo de Pascua-Maestro e colaboradores (2018), foi demonstrada a utilização do MTT em experimentos *in vivo*, com larvas de *Drosophila*. Primeiramente, os autores estudaram a evolução temporal da acumulação e localização intracelular do MTT, através

da microscopia confocal. Após detectarem a formação de formazan com citômetro de fluxo, determinaram o estado metabólico de diferentes populações de células submetidas ao estresse oxidativo. Posteriormente, aplicaram o ensaio em larvas de *Drosophila melanogaster*, em que foi observado o acúmulo restrito ao corpo gorduroso das larvas, cujo acúmulo não afetou o fornecimento de energia do órgão, bem como no funcionamento metabólico. Com isso, o ensaio de MTT poderia ser utilizado na avaliação de efeitos de modificações genéticas que modificam processos biológicos pertinentes (Pascua-Maestro et al., 2018).

O ensaio de viabilidade celular com MTT também é utilizado na determinação de perfis de quimiossensibilidade em pacientes com neoplasias hematológicas quanto na triagem inicial de potenciais agentes quimioterápicos. A quimioterapia citotóxica permanece como principal estratégia terapêutica para neoplasias hematológicas. Nesse contexto, ensaios baseados em sais de tetrazólio vêm sendo utilizados para avaliar a sensibilidade de blastos leucêmicos a agentes antineoplásicos, além de desempenharem papel relevante na triagem pré-clínica de compostos em linhagens celulares. O ensaio colorimétrico com MTT, ao comparar com outras metodologias clássicas, apresenta rapidez, simplicidade e fácil adaptabilidade. Assim, o estudo de Marks e colaboradores (1992) indicou o MTT como uma ferramenta válida para avaliação de quimiossensibilidade em modelos de neoplasias hematológicas, mesmo na presença de casos de resistência à fármacos, sendo mediados — ou não — por glicoproteína P (Marks et al., 1992).

Portanto, é possível observar que os ensaios de viabilidade celular utilizando MTT e resazurina continuam como ferramentas aplicadas na pesquisa biotecnológica, farmacológica e toxicológica, sendo alternativas acessíveis, reprodutíveis e sensíveis para a avaliação da atividade metabólica celular. A resazurina destaca-se por sua baixa toxicidade, apresentar versatilidade analítica, além de não apresentar característica destrutiva. Enquanto o MTT, apesar de sua grande aplicabilidade, apresenta características relacionadas à formação do formazan que podem impactar na coleta dos dados. Contudo, a escolha do método a ser utilizado deve ser feita de forma criteriosa e consciente das vantagens e desvantagens de cada método (Quadro 1).

Quadro 1. Características dos ensaios de Resazurina e MTT.

Ensaio	Vantagens	Desvantagens
Resazurina	Sensibilidade alta Não tóxico Escalonável Não ocasiona lise celular Leitura por absorbância e/ou fluorescência Utilização em diferentes tipos celulares	Sensibilidade à luminosidade Necessidade de equipamentos específicos para leitura Os compostos a serem testados podem interferir na sensibilidade do ensaio
MTT	Econômico Utilizável em diversos tipos celulares Simples Sensibilidade às mudanças metabólicas celulares	Induz lise celular Necessário equipamento para leitura Apresenta componentes tóxicos Os compostos a serem testados podem interferir na sensibilidade do ensaio

Fonte: Guterres et al. (2024).

REFERÊNCIAS

Almutary, A., & Sanderson, B. J. (2016). The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. *International journal of toxicology*, 35(4), 454–462.

Aziz DM, Ahlswede L, Enbergs H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. *Theriogenology*. 2005 Oct 1;64(6):1350-6.

Beatriz Mendes Roca, Vanice Rodrigues Poester, Antonella Souza Mattei, Gabriel Baracy Klafke, Ivy Bastos Ramis, Melissa Orzechowski Xavier. Avaliação do uso da resazurina em teste de suscetibilidade in vitro frente a *Sporothrix brasiliensis*. *Vittalle - Revista de Ciências da Saúde*, v. 31, n. 2 (2019) 32-37.

DANTAS, RODRIGO TAVARES. INJÚRIA RENAL INDUZIDA PELO VENENO DE *Bothrops insularis* E O PAPEL DA MOLÉCULA KIM-1 COMO BIOMARCADOR PRECOCE. Tese, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

DE CASTRO, C.H.D.F. PADRONIZAÇÃO E ANÁLISE DA ATIVIDADE MICROBICIDA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* UTILIZANDO A RESAZURINA. TCC, UFES, Vitória, 2017.

De Jong DW, Woodlief WG. Fluorimetric assay of tobacco leaf dehydrogenases with resazurin. *Biochim Biophys Acta*. 1977 Oct 13;484(2):249-59.

Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. *Acta Histochem*. 2018 May;120(4):303-311.

GUTERRES, I. Z.; DAI, I. P.; BAUER, Y. G.; et al. Ensaios de citotoxicidade in vitro como alternativa ao uso de animais no desenvolvimento biotecnológico de produtos. 2024. DOI: 10.56041/9786599841859-4.

Khalef L, Lydia R, Filicia K, Moussa B. Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments. *Cell Biochem Funct*. 2024 Apr;42(3):e4007.

Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 Jun 1;2018(6).

Magalhães, W. L. E; Emanoela Lundgren Thá, E. L.; Leme, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Comunicado Técnico nº 427. Embrapa, 2018.

Marks DC, Belov L, Davey MW, Davey RA, Kidman AD. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells. *Leuk Res*. 1992 Dec;16(12):1165-73.

Newbould FH. Some effects of the source of bovine milk leucocytes and strain of *staphylococcus* on their interaction in vitro. *Can J Comp Med Vet Sci*. 1967 Dec;31(12):303-8.

Pascua-Maestro R, Corraliza-Gomez M, Diez-Hermano S, Perez-Segurado C, Ganfornina MD, Sanchez D. The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. *Acta Histochem*. 2018 Apr;120(3):179-186.

Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1-17.

Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res*. 2006 Jul;99(2):103-7.

Rossi, I.V.; de Souza, D.A.S.; Ramirez, M.I. The End Justifies the Means: Chagas Disease from a Perspective of the Host–*Trypanosoma cruzi* Interaction. *Life* 2024, 14, 488.

Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018 Apr;120(3):159-167.

Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1-6.

Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*. 1987 Sep;56(3):279-85.

AValiação DA CITOTOXICIDADE CELULAR: TÉCNICA DE LIBERAÇÃO DE LDH E ENSAIO COM PI

Geovana Espindola Jardim

Universidade Federal Fluminense - Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia, Niterói, RJ, Brasil.

Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO

A avaliação da citotoxicidade celular é uma etapa importante em estudos *in vitro*, especialmente na análise de fármacos, toxinas, nanopartículas e novos compostos bioativos. Entre os métodos que são mais utilizados, destacam-se a técnica de liberação da lactato desidrogenase (LDH) e o ensaio de captação de iodeto de propídeo (PI), ambos baseados na integridade da membrana plasmática como marcador de viabilidade celular. O ensaio de LDH ocorre quando há liberação da enzima lactato desidrogenase para o meio extracelular após o comprometimento da membrana plasmática. A LDH é uma enzima citosólica estável, presente em praticamente todos os tipos celulares, e sua detecção no sobrenadante indica dano celular ou morte celular tardia. A quantificação ocorre por meio de uma reação enzimática que converte lactato em piruvato, resultando em um produto colorimétrico que é proporcional à quantidade de LDH liberada. É um método amplamente utilizado por sua simplicidade, reprodutibilidade e aplicabilidade em ensaios de alto rendimento. Entretanto, o ensaio de LDH não permite distinguir tipos específicos de morte celular e pode sofrer interferências relacionadas à liberação basal da enzima ou à estabilidade da LDH no meio de cultura. Por sua vez, o ensaio com iodeto de propídeo (PI) baseia-se no uso de um corante fluorescente impermeável à membrana plasmática íntegra. O PI se liga ao DNA por intercalação entre as bases nitrogenadas, emitindo fluorescência intensa apenas em células cuja membrana foi comprometida. Dessa forma, o ensaio permite a identificação direta de células mortas. A análise pode ser realizada por microscopia de fluorescência, citometria de fluxo ou sistemas automatizados de imagem, possibilitando a avaliação célula a célula e a combinação com outros marcadores, como Annexina V. De forma complementar, os ensaios de LDH e PI fornecem informações consistentes sobre a citotoxicidade celular. Enquanto o LDH oferece uma visão global do dano celular em populações celulares, o PI permite a identificação direta e individualizada de células com perda de integridade de membrana. Assim, a utilização combinada dessas técnicas contribui para uma análise mais robusta e confiável dos efeitos citotóxicos induzidos por diferentes agentes experimentais.

1 INTRODUÇÃO

A citotoxicidade refere-se à capacidade de um agente físico, químico ou biológico de induzir efeitos prejudiciais sobre as células, comprometendo sua viabilidade, integridade estrutural e/ou funcionalidade. Esse conceito é empregado na toxicologia, para a avaliação da segurança e dos potenciais efeitos adversos de fármacos, compostos químicos, biomateriais e substâncias bioativas. A análise da citotoxicidade permite

compreender como diferentes estímulos interferem na homeostase celular e nos mecanismos responsáveis pela manutenção da sobrevivência celular (Jiang et al., 2022).

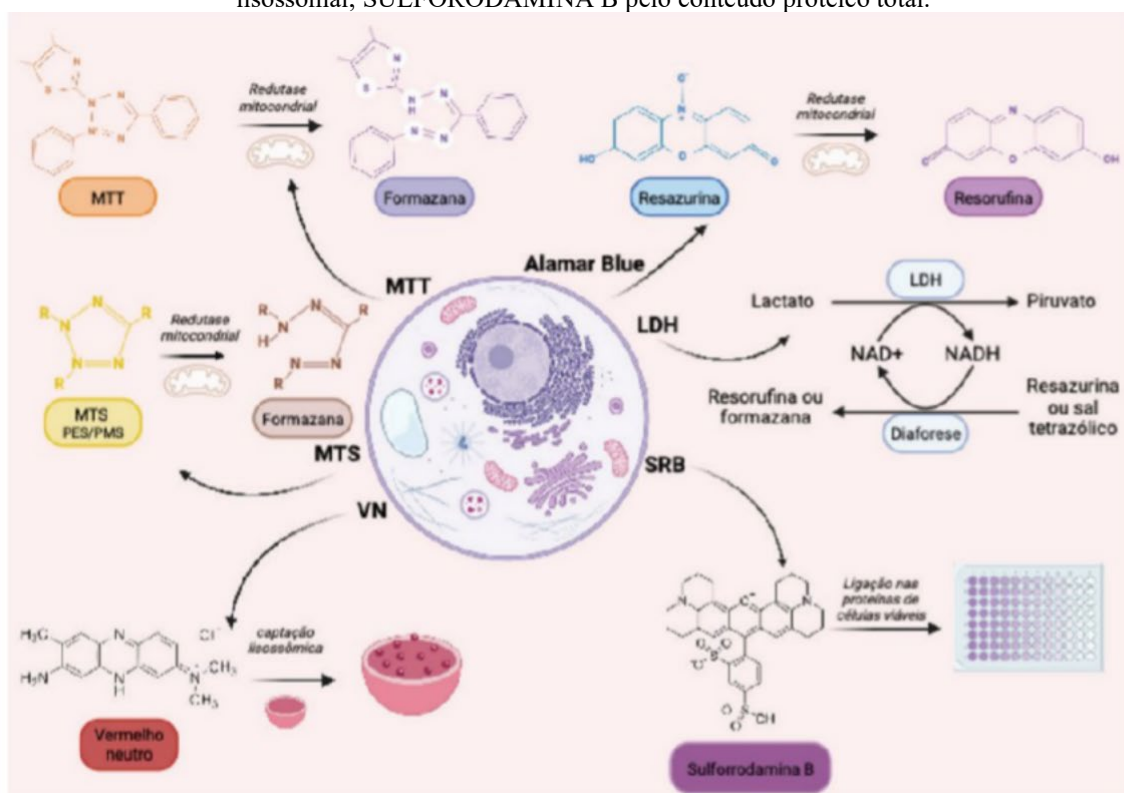
A exposição das células a agentes citotóxicos pode desencadear uma série de alterações bioquímicas e morfológicas, que desencadeiam em processos de morte celular. A apoptose é caracterizada como um processo de morte celular programada e altamente regulada, no qual a célula ativa vias específicas que resultam em condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos, geralmente sem provocar resposta inflamatória significativa. Em contraste, a necrose ocorre como consequência de danos celulares severos e irreversíveis, levando à perda abrupta da integridade da membrana plasmática, liberação do conteúdo intracelular e ativação de processos inflamatórios no tecido adjacente. A necroptose é uma forma regulada de morte celular que compartilha características morfológicas com a necrose, mas é mediada por vias moleculares específicas, envolvendo principalmente as proteínas RIPK1, RIPK3 e MLKL. Por sua vez, a piroptose é uma forma inflamatória de morte celular programada, comumente associada à ativação do inflamassoma e das caspases inflamatórias, como a caspase-1. Esse processo leva à formação de poros na membrana plasmática por meio da ação da gasdermina D, resultando em inchaço celular, lise e na liberação de citocinas como IL-1 β e IL-18, que são pró-inflamatórias (Gabriel et al., 2017; Patologia básica p.1; Grivicich et al., 2007).

Os ensaios *in vitro* consistem na avaliação da citotoxicidade, que é uma etapa fundamental para determinar a segurança de substâncias antes de sua aplicação em modelos mais complexos. São experimentos realizados fora do organismo vivo, em que se utiliza cultura de células e tecidos controlados em placas, garrafas ou outros recipientes adequados para cultura celular. São técnicas que simulam processos biológicos e apresentam vantagens importantes, como maior controle das condições experimentais, reprodutibilidade, menor custo e alternativa ética, possibilitando redução de animais. Esses métodos baseiam-se na análise de diferentes parâmetros celulares, permitindo a detecção precoce ou tardia de danos celulares induzidos por agentes citotóxicos (Rogerio et al., 2003; Doke e Dhawale, 2015)

Os métodos *in vitro* para avaliação da citotoxicidade podem ser classificados de acordo com o mecanismo celular avaliado. Ensaio baseado na atividade metabólica, como MTT, XTT, WST-1 e resazurina, avaliam a capacidade das células viáveis de reduzir substratos, refletindo a integridade funcional das mitocôndrias. Já os ensaios que avaliam a

integridade da membrana plasmática, como a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e a captação de iodeto de propídio (PI), são mais utilizados para detectar perda de permeabilidade da membrana, característica de necrose ou morte celular tardia. De maneira visual, a figura 1 proporciona uma explicação visual dos métodos *in vitro* de ensaios citotóxicos e onde atuam nos componentes celulares.

Figura 1: Representação esquemática de ensaios que avaliam citotoxicidade *in vitro* colorimétricos. Os seguintes ensaios atuam em diferentes componentes celulares. MTT, MTS e ALAMAR BLUE/RESAZURINA com atividade metabólica mitocondrial; LDH atividade enzimática; VERMELHO NEUTRO pela integridade lisossomal; SULFORODAMINA B pelo conteúdo proteico total.



Fonte: GUTERRES et al., 2024

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* possibilita uma compreensão dos mecanismos de ação de diferentes agentes sobre as células, permitindo a distinção entre alterações funcionais reversíveis e danos celulares irreversíveis. Além disso, cada método de avaliação apresenta limitações específicas, como a incapacidade de diferenciar os tipos de morte celular ou a susceptibilidade à interferência de compostos testados. Dessa forma, a utilização combinada de diferentes ensaios é recomendada para uma análise mais abrangente e confiável da citotoxicidade. Essa abordagem integrada permite uma melhor compreensão dos efeitos celulares induzidos e contribui para o alcance de resultados mais específicos e interpretáveis.

2 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A enzima intracelular Lactato Desidrogenase (LDH), é expressa em células sanguíneas e cardíacas, por exemplo, e em casos de dano à membrana celular, são liberadas para o meio extracelular. Essa enzima é importante no processo de produção de energia no organismo animal e é composta por quatro subunidades que formam 5 isoenzimas. Como observado na figura 2, estruturalmente, possuem subunidades diferentes. A subunidade H (cardíaca) e M (muscular), e são encontradas em tecidos diferentes, o que facilita o diagnóstico da origem de lesões teciduais (Torres et al., 2009).

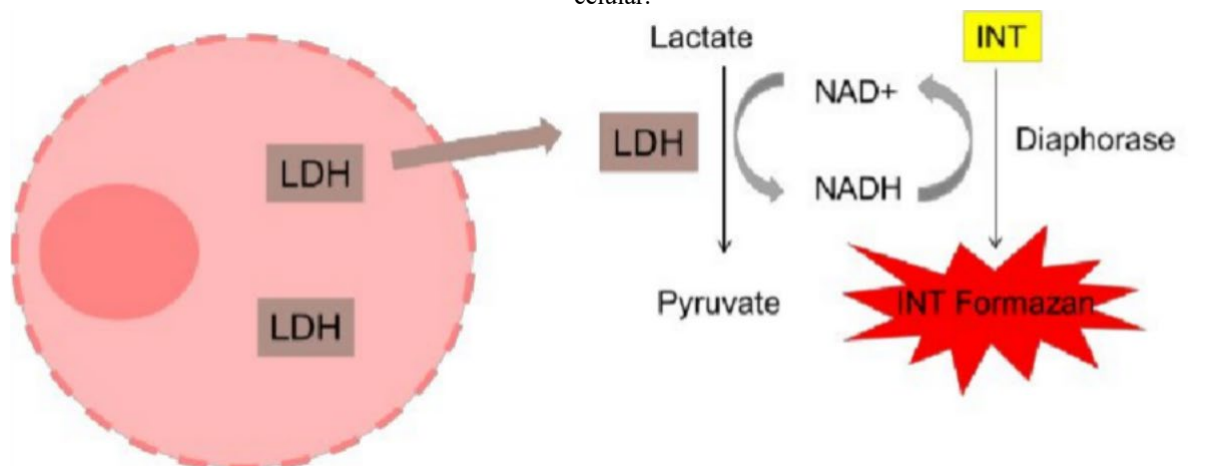
Figura 2: Demonstração das 5 isoenzimas de LDH e os tecidos onde são encontradas

ISOENZIMA	FONTE PRIMÁRIA
LDH 1 (HHHH)	Músculo cardíaco e Eritrócito
LDH 2 (HHHM)	Sistema reticuloendotelial
LDH 3 (HHMM)	Pulmões
LDH 4 (HMMM)	Placenta, pâncreas e rins
LDH 5 (MMMM)	Fígado e músculo esquelético

Fonte: Criada pelo autor pela plataforma de designer, CANVA. Adaptado de BIOMEDICINA PADRÃO, 2014.

Na figura 3 demonstra a reação que ocorre no ensaio de LDH, em que mede a atividade total da enzima lactato desidrogenase a fim de observar dano celular. O ensaio é realizado por kits biológicos e seguido o protocolo, para avaliar a conversão de lactato em piruvato na presença da enzima com redução paralela de NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), e a formação de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido). Um sal de tetrazólio, o INT (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio), é convertido em formazan vermelho, gerando um produto colorido solúvel em água, sendo quantificada espectrofotometricamente a 490 nm. A quantidade de produto formado é proporcional à concentração de LDH liberada no meio de cultura (Decker & Lohmann-Matthes, 1988; P. Kumar et al., 2018; Parhamifar et al., 2019).

Figura 3: Esquematização de como ocorre a reação enzimática de LDH, ensaio utilizado para avaliação de citotoxicidade *in vitro*. Uma célula com membrana danificada, libera a enzima lactato desidrogenase (LDH) que catalisa a conversão da lactato em piruvato, promovendo então a redução de NAD^+ em NADH. Posteriormente, na presença da enzima diaforase, o NADH reduz o sal tetrazólio (INT), formando o produto colorido INT-formazan, cuja intensidade é proporcional à quantidade de LDH liberada e, consequentemente, ao grau de dano celular.



Fonte: FOREST, Valérie, et al., 2015.

O método de LDH é uma técnica simples e rápida, onde as células em cultura são expostas à substância ou ao fármaco em teste. Após o período de exposição, uma alíquota do meio de cultura é coletada. A reação enzimática é iniciada pela adição de substrato e cofatores enzimáticos. Após o tempo de incubação, a reação é interrompida e a absorbância é medida em um espectrofotômetro. A absorbância medida é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada, quanto maior a absorbância, maior a citotoxicidade avaliada. A depender do kit utilizado, os tons podem variar para vermelho ou amarelo (Kumar et al., 2018; Parhamifar et al., 2019).

O ensaio de LDH oferece diversos benefícios na avaliação da citotoxicidade em culturas celulares e na pesquisa biotecnológica. Alguns dos principais benefícios incluem simplicidade e facilidade de execução, sensibilidade, reprodutibilidade, avaliação quantitativa e baixo custo. E a aplicação do ensaio pode variar, além de servir para avaliação da citotoxicidade celular, pode servir em pesquisas de câncer, estudos inflamatórios e avaliação de peptídeos bioativos (Decker & Lohmann-Matthes, 1988).

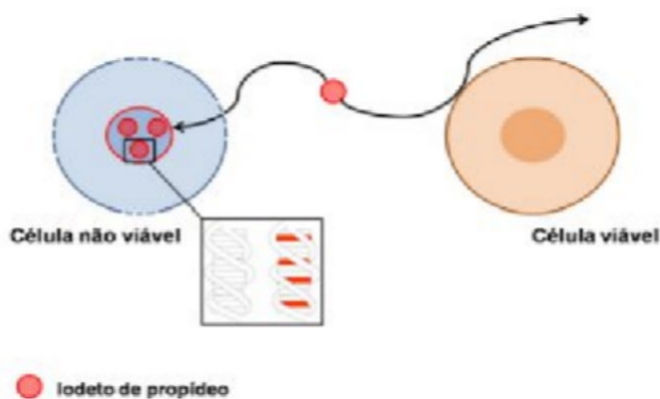
3 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDEO (PI)

O iodeto de propídeo (PI) é um corante fluorescente intercalante de ácidos nucleicos, pertencente à classe dos compostos fenantridínicos. É uma molécula catiônica, hidrofílica e de alto peso molecular. Tais características impedem sua entrada através da membrana plasmática, contudo, uma vez no interior da célula, o PI se intercala entre as

bases nitrogenadas do DNA e do RNA. Quando ligado aos ácidos nucleicos, o PI apresenta um aumento significativo de fluorescência, emitindo luz quando excitado, na figura 4 há uma esquematização de como ocorre essa captação da molécula de iodeto de propídeo pelo DNA. Essa propriedade torna o PI particularmente útil como marcador de células mortas, uma vez que apenas células com membranas comprometidas permitem sua entrada e consequente ligação ao material genético (Mullen, 2004; Yang; Xiang; Xu, 2025).

O ensaio de PI é amplamente utilizado na área de toxicologia, sendo considerado um método para a identificação de morte celular ou dano irreversível à membrana. O princípio fundamental deste ensaio baseia-se no fato de que células viáveis apresentam membranas plasmáticas íntegras, as quais atuam como barreira seletiva, impedindo a entrada de moléculas hidrofílicas e carregadas, como o PI. Contudo, células que sofreram danos estruturais na membrana, característica comum em processos de necrose, apoptose tardia e outros tipos de morte celular, tornam-se permeáveis para a entrada desse corante no interior da célula. Assim, a captação do PI ocorre exclusivamente em células com perda de integridade da membrana plasmática, permitindo a distinção entre células viáveis e células inviáveis. Pode ainda ser combinado com outros marcadores, como anexina V, para uma caracterização mais detalhada dos mecanismos de morte celular envolvidos (Crowley, et al., 2016a; Crowley, et al., 2016b)

Figura 4: Esquema do ensaio de viabilidade celular com iodeto de propídeo (PI). A molécula de PI é um corante intercalante de DNA que não consegue atravessar a membrana plasmática de células íntegras. Assim, em células viáveis, não há reação e contato do PI com o DNA. Em células não viáveis, cuja membrana plasmática está comprometida, o corante consegue se ligar ao DNA e emite fluorescência. A intensidade do sinal fluorescente então, será proporcional ao número de células com perda na integridade da membrana, fornecendo a informação de forma quantitativa da morte celular.



Fonte: DUARTE, Sâmia Sousa; GONÇALVES, Juan Carlos Ramos., 2020.

Inicialmente, as células são cultivadas em condições adequadas de temperatura, atmosfera e meio de cultura, de acordo com o tipo celular utilizado. Após atingirem a densidade desejada, as células são submetidas aos tratamentos experimentais, sendo então expostas a agentes citotóxicos, fármacos, nanopartículas, peptídeos, compostos químicos ou estímulos inflamatórios, por períodos previamente determinados. Após o tratamento, o iodeto de propídeo é adicionado e incubado por um curto período, normalmente entre 5 e 15 minutos, protegida da luz, para evitar a fotodegradação do corante. É importante ressaltar que controles adequados devem ser incluídos para validar a interpretação dos resultados, como o uso de controle negativo, sendo células não tratadas, e controle positivo, sendo células expostas a um agente citotóxico. A leitura das células coradas com PI é avaliada em comprimentos de onda que podem variar entre os valores 300-600 nm para excitação e 600-700 nm para emissão (Crowley, et al., 2016a; Freshney, 2010).

A interpretação dos resultados do ensaio de captação de PI baseia-se na relação direta entre a fluorescência detectada e a integridade da membrana plasmática. Células que não apresentam fluorescência vermelha são consideradas viáveis, enquanto aquelas que exibem marcação positiva para PI são classificadas como inviáveis ou em estágios avançados de morte celular. Os dados podem ser expressos como porcentagem de células PI-positivas em relação ao total de células analisadas, o que permite comparações entre diferentes condições experimentais. Um aumento significativo na captação de PI indica maior citotoxicidade do agente testado e maior comprometimento da membrana celular (Silva et al., 2019; Santos et al., 2018; Riccardi, Nicoletti, 2006).

O ensaio de captação de iodeto de propídeo apresenta diversas vantagens que justificam sua ampla utilização em estudos de citotoxicidade. Entre elas, destaca-se sua simplicidade metodológica, rapidez de execução e baixo custo, quando comparado a ensaios mais complexos. Possui também uma alta sensibilidade para detecção de danos à membrana plasmática, permitindo a identificação clara de células inviáveis. Além disso, o PI é compatível com diferentes técnicas analíticas, como microscopia, citometria de fluxo e leitura fluorimétrica, oferecendo grande versatilidade experimental (Marsh, 2007).

Uma desvantagem desse ensaio é sua incapacidade de detectar eventos iniciais de apoptose, uma vez que o PI só penetra em células com membrana comprometida. Dessa forma, células em apoptose precoce são classificadas como viáveis, o que pode subestimar a citotoxicidade real de um tratamento. Além de ter possibilidade de interferências experimentais, especialmente em estudos envolvendo nanopartículas, compostos

fluorescentes ou materiais que alteram a permeabilidade da membrana de forma transitória. O PI se liga tanto ao DNA quanto ao RNA, o que pode gerar superestimação da fluorescência caso não haja controle adequado, como o uso de RNase em determinadas aplicações (Rieger ET AL., 2011; Crowley et al., 2016b).

4 COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DE LDH E PI

No quadro apresentado abaixo, observa-se uma comparação entre dois métodos utilizados para avaliação de morte celular: o ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) e o ensaio com iodeto de propídeo (PI). Como indicador da viabilidade celular, ambos se baseiam pela integridade da membrana plasmática, contudo os princípios, forma de detecção e aplicação experimental são diferentes.

No ensaio de LDH quantifica a liberação da enzima lactato desidrogenase para o meio extracelular após dano à membrana celular. Como a LDH é uma enzima citosólica, sua presença no sobrenadante reflete perda de integridade da membrana, sendo medida por absorbância em ensaios colorimétricos. É uma abordagem simples, rápida e de fácil execução, utilizada para triagem de citotoxicidade em diferentes tratamentos. No entanto, apresenta limitações, como a possível interferência de LDH pré-existente no meio e a incapacidade de distinguir estágios iniciais de morte celular.

O ensaio com iodeto de propídeo (PI) é um método direto baseado na penetração de um corante fluorescente em células com a membrana plasmática comprometida. O PI se intercala ao DNA, emitindo fluorescência proporcional ao dano celular, o que permite análise em nível individual, frequentemente por citometria de fluxo ou microscopia. Esse método é mais específico para detecção de células mortas ou em estágios avançados de morte, embora também não consegue diferenciar, isoladamente, entre apoptose tardia e necrose.

Resumidamente, enquanto o ensaio de LDH fornece uma medida mais ampla de citotoxicidade no meio extracelular, o ensaio com PI permite uma avaliação mais detalhada e quantitativa em nível celular. A escolha entre os métodos, ou a utilização combinada de ambos, vai depender do objetivo experimental, sendo comum sua aplicação complementar para uma análise mais específica da viabilidade e morte celular.

Quadro 1: Comparação dos ensaios de avaliação da toxicidade celular, *in vitro*, a técnica de liberação de LDH e o ensaio com PI.

	Ensaio da Lactato Desidrogenase LDH	Ensaio com Iodeto de Propídeo (PI)
Princípio básico	Mede a liberação de LDH pela célula para o meio extracelular, indicando dano ou ruptura da membrana.	Corante que se liga ao DNA em células com membrana comprometida, sinalizando morte celular.
Tipo de marcador	Enzimático (atividade enzimática de LDH no sobrenadante).	Corante fluorescente (intercala o DNA).
Resultado obtido	Absorbância (teste enzimático) proporcional à quantidade de LDH.	Fluorescência por célula pela intensidade de PI.
Sensibilidade ao estágio de morte celular	Detecta células que perderam a integridade da membrana.	Detecta comprometimento da estrutura da membrana.
Necessita células vivas intactas?	Não, mede LDH liberado no meio.	Sim, para diferenciar células viáveis vs. não viáveis (começa a marcar quando a membrana está rompida).
Vantagens principais	Simples e rápida. Não requer equipamento sofisticado e pode ser feita em placas de 96 poços.	Permite discriminação célula a célula e possui alta especificidade para morte celular.
Limitações principais	Pode ser influenciada por LDH extracelular pré-existente	Só detecta células com membrana comprometida (não distingue apoptose precoce)
Aplicações comuns	Avaliar citotoxicidade induzida por drogas, toxinas, tratamentos	Avaliar morte celular em populações específicas, análise por citometria ou imagem

REFERÊNCIAS

GUTERRES, Iara Zanella et al. Ensaios de citotoxicidade in vitro como alternativa ao uso de animais no desenvolvimento biotecnológico de produtos. Capítulo 4, DOI: 10.56041/9786599841859-4

FOREST, Valérie, et al. "Adsorção da enzima lactato desidrogenase em nanotubos de carbono: Como obter resultados precisos para a citotoxicidade desses nanomateriais." *Langmuir* 31.12 (2015): 3635-3643.

BIOMEDICINA PADRÃO, Questão de concurso comentada #2 – Bioquímica, 2014.

DUARTE, Sâmia Sousa; GONÇALVES, Juan Carlos Ramos. Ensaio do Iodeto de Propídeo. *Cultivo de células*, p. 141.

MULLEN, P. Flow Cytometric DNA Analysis of Human Cancer Cell Lines. In: LANGDON, Simon, P. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 88: *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2004, p. 247-255.

YANG, Y.; XIANG, Y.; XU, M. From red to green: The propidium iodide-permeable membrane of *Shewanella* decoloration is S12 is repairable. *Scientific Reports*, v. 5, n. November, p. 2-6, 2015.

CROWLEY, L. C.; SCOTT, A. P.; MARFELL, B. J.; BOUGHABA, J. A.; CHOJNOWSKI, G. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2016, n. 7, p. 647-651, 2016a.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2016, n. 11, p. 953-957, 2016b.

FRESHNEY, R.I. Quantitation. In: FRESHNEY, R. Ian. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Sixth Edition. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010. p. 335- 363.

SILVA, D. K. F.; DUARTE, S. S.; LISBOA, T. M. H.; FERREIRA, R. C.; LOPES, A. L. O.; CARVALHO, D. C. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DA SILVA, P. M.; SEGUNDO, M. A. S. P.; MOURA, R. O.; MEDEIROS, K. C. P.; SOBRAL, M.V. Antitumor effect of a novel spiro-acridine compound is associated with up-regulation of Th1-type responses and antiangiogenic action. *Molecules*, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2019.

SANTOS, J.; BRITO, M.; FERREIRA, R.; MOURA, A. P.; SOUSA, T.; BATISTA, T.; MANGUEIRA, V.; LEITE, F.; CRUZ, R.; VIEIRA, G.; LIRA, B.; ATHAYDE-FILHO, P.; SOUZA, H.; COSTA, N.; VERAS, R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAGALHÃES, H.; SOBRAL, M. Th1-biased immunomodulation and in vivo antitumor effect of a novel piperine analogue. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 9, 2594, 2018.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. J Vis Exp. 2011 Apr 24;(50):2597. doi: 10.3791/2597. PMID: 21540825; PMCID: PMC3169266.

MARSH, Wendy. Propidium. 2007.

ROGERO, Sizue Ota et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Materials Research, v. 6, p. 317-320, 2003.

GABRIEL, Gabriela Hadler et al. Definições e mecanismos moleculares em morte celular. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 14, n. 26, p. 214-234, 2017.

PATOLOGIA, INTRODUÇÃO À. Lesão Celular, Morte Celular e Adaptações. Robbins Patologia Básica9: Robbins Patologia Básica, p. 1.

GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; DA ROCHA, Adriana Brondani. Morte celular por apoptose. Revista brasileira de cancerologia, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

TORRES, Sonia H. et al. Isoenzimas de lactatodeshidrogenasa en el músculo esquelético de pacientes con EPOC. Archivos de Bronconeumología, v. 45, n. 2, p. 75-80, 2009.

Decker, T. & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. Journal of Immunological Methods, 115(1). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9)

Kumar, S., Kumar, A., Mamidi, P., Tiwari, A., Kumar, S., Mayavannan, A., Mudulli, S., Singh, A. K., Subudhi, B. B. & Chattopadhyay, S. (2018). Chikungunya virus nsP1 interacts directly with nsP2 and modulates its ATPase activity. Scientific Reports, 8(1), 1045. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19295-0>

Parhamifar, L., Andersen, H. & Moghimi, S. M. (2019). Lactate dehydrogenase assay for assessment of polycation cytotoxicity. In Methods in Molecular Biology (Vol. 1943). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9092-4_18

DESVENDANDO A GENOTOXICOLOGIA DE CÉLULAS ÚNICA: ENSAIOS COMETA E TUNEL COMO PILARES DA ANÁLISE INTEGRADA DE DANO E DESTINO CELULAR

Isabelle Soares Menezes

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPG-CAPS), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Santa Rosa – Niterói 24241-000, RJ, Brasil.

Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-360, RJ, Brasil.

1 O PARADIGMA DA ESTABILIDADE GENÔMICA E A NECESSIDADE DE MONITORAMENTO EM NÍVEL CELULAR

A integridade do material genético é a fundação da funcionalidade e da sobrevivência celular, atuando como o pilar mais crítico da homeostase de organismos multicelulares. O DNA, na sua estrutura de dupla hélice, é continuamente desafiado por um vasto espectro de insultos que ameaçam a precisão da replicação e a estabilidade cromossômica. A origem desses agentes genotóxicos é bifásica: por um lado, o metabolismo celular gera subprodutos reativos, e por outro, o organismo é exposto a estressores ambientais e terapêuticos. O acúmulo de danos não reparados resulta em instabilidade genômica, um fenômeno intrinsecamente ligado à carcinogênese, às doenças neurodegenerativas e ao envelhecimento prematuro (Hanahan and Weinberg 2011; Moraes 2012). Portanto, a capacidade de detectar, mapear e quantificar o dano ao DNA em tempo real e em nível de célula única tornou-se indispensável para a toxicologia preditiva, o biomonitoramento e a oncologia translacional.

A Dentre os danos mais críticos induzidos endogenamente, destacam-se as lesões oxidativas, primariamente geradas pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) provenientes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A 8-oxo-7,8-diidroguanina (8-oxoG) é a lesão prototípica dessa classe, reconhecida por sua alta propensão a induzir transversões G:C → T:A se não for prontamente corrigida pelo Reparo por Excisão de Base (BER). Similarmente, a hidrólise espontânea da ligação N-glicosídica resulta na formação de sítios apurínicos/apirimidínicos (APs), regiões desprovidas de base que comprometem a integridade da fita. Exogenamente, a exposição à radiação ionizante (RI) impõe o dano mais deletério, as Quebras de Fita Dupla (DSBs), que se caracterizam pelo rompimento simultâneo de ambas as fitas de DNA e são significativamente mais difíceis de reparar do que as Quebras de Fita Simples (SSBs). A complexidade do cenário de dano exige

metodologias que não apenas quantifiquem as quebras, mas também as diferenciem em termos de sua natureza química e do seu impacto biológico no destino celular, sendo os ensaios Cometa e TUNEL os pilares desta análise dual (Figura 1) (Chen et al., 2024; Moraes, 2012).

Figura 1: A imagem ilustra o mecanismo fundamental e as principais adaptações metodológicas do Ensaio Cometa. **Parte A (O Princípio):** Apresenta o fluxo de trabalho vertical para a execução básica do ensaio 1. **Célula Isolada em ágar:** Representação da imobilização de uma célula individual em uma matriz de agarose. **2. Lise:** Ilustração da desintegração das membranas celular e nuclear por ação de detergentes e alta concentração salina. Este processo remove a maioria das proteínas (ex: histonas), resultando na formação do Nucleoide, uma estrutura de DNA desnudado e super-enrolado ancorado à matriz nuclear residual. **3. Eletroforese:** Demonstração da aplicação de um campo elétrico. Fragmentos de DNA com carga negativa migram em direção ao polo positivo (+). O DNA intacto permanece no nucleóide (cabeça), enquanto o DNA quebrado migra, formando a “cauda” do cometa. **4.** Apresentação de uma micrografia representativa em falsa cor (verde sobre fundo preto), evidenciando a morfologia típica de um cometa com as legendas indicando a Cabeça (DNA Intacto) e a Cauda (Fragmentos de DNA). **Parte B (Variantes do ensaio Cometa):** Exibe três colunas comparativas que detalham as diferentes condições experimentais para detectar tipos específicos de dano ao DNA. Cada coluna inclui um diagrama molecular do DNA, uma micrografia representativa do cometa resultante e a lista de danos detectados. **Cometa Alcalino (pH ≥ 13):** Utiliza condições de pH extremo para induzir a desnaturação do DNA (separação em fita simples). Esta condição permite a detecção de Quebras de Fita Simples (SSBs), Quebras de Fita Dupla (DSBs) e a conversão de Sítios Lábeis a Álcali (APs) em quebras adicionais. O cometa resultante tipicamente apresenta uma cauda longa devido à alta densidade de quebras detectadas. **Cometa Neutro (pH ~ 8):** Realizado em pH fisiológico, mantendo a estrutura de dupla hélice do DNA (sem desnaturação). Esta variante é calibrada para a detecção predominante de Quebras de Fita Dupla (DSBs), resultando em cometas com caudas menores em comparação ao protocolo alcalino. **Cometa Enzimático (FPG):** Demonstra o uso de enzimas de reparo como sondas moleculares. O diagrama mostra a enzima Formamidopirimidina-DNA Glicosilase (FPG) reconhecendo e clivando uma lesão oxidativa específica (ex: 8-oxoG, esfera vermelha), criando um sítio AP que é posteriormente convertido em quebra. O cometa resultante apresenta uma cauda aumentada em relação ao controle sem enzima, quantificando a frequência de lesões oxidativas específicas.

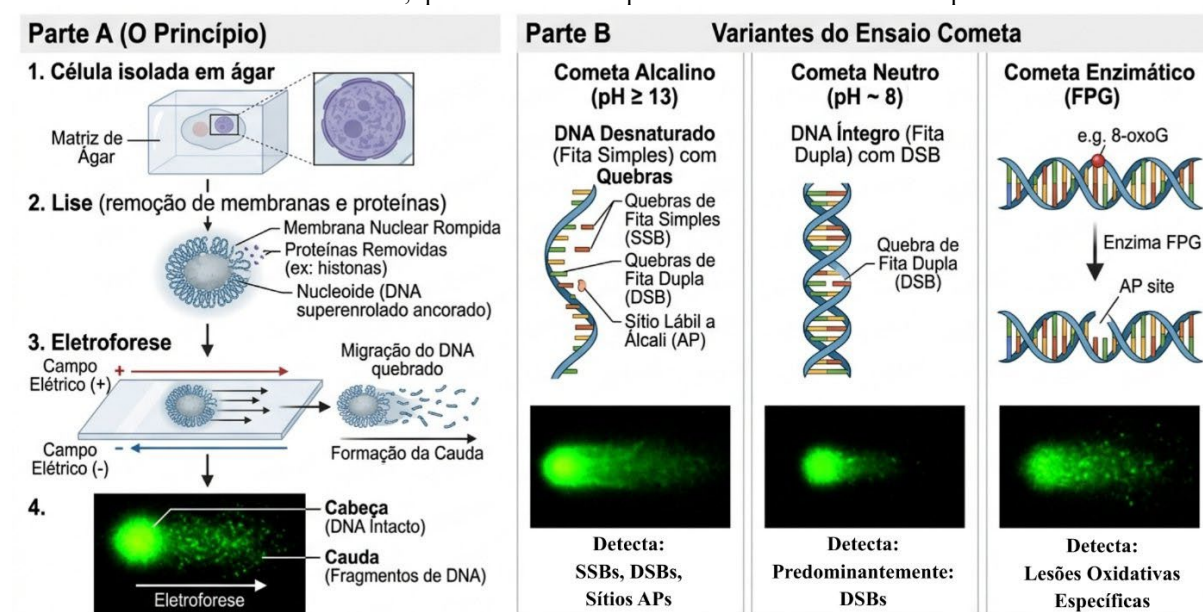


Imagem criada pela autora no site Canva.com.

2 O ENSAIO COMETA (SINGLE-CELL GEL ELETROPHORESIS): DISSERTANDO A INTEGRIDADE GENÔMICA PELA ELETROFORESE

O Ensaio Cometa, ou Eletroforese em Gel de Célula Única (SCGE), é a técnica de referência na genotoxicologia para a medição de danos primários ao DNA, incluindo SSBs, DSBs, e sítios lábeis a álcalis, com uma sensibilidade notável que permite a detecção de aproximadamente uma SSB por 10^6 pares de bases (Langie et al. 2015). O princípio do ensaio reside na migração eletroforética de fragmentos de DNA a partir de um núcleo desnudado e descompactado, cujas características formam uma imagem remanescente de um cometa: uma "cabeça" de DNA intacto e uma "cauda" de DNA quebrado. A cinética dessa migração é determinada pelo tamanho e pelo número de quebras, estabelecendo uma relação de proporcionalidade direta entre o dano e a extensão da cauda (Pu et al., 2015).

3 DA CÉLULA À LISE: A GÊNESE DO NUCLEOIDE ANCORADO

O procedimento do SCGE começa com a imobilização de células em uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA) sobre uma lâmina de microscopia especialmente tratada. A etapa crítica subsequente é a lise celular, onde as células são submetidas a uma solução de alta concentração salina, frequentemente contendo 2.5 M de cloreto de sódio, 100 mM de Na_2EDTA e detergentes como Triton X-100, mantida em ambiente frio (tipicamente 4°C). O objetivo desta lise é desintegrar as membranas celular e nuclear, removendo a vasta maioria das proteínas celulares, incluindo as histonas e outras proteínas não-histonas que organizam a cromatina. O resultado desta digestão é a formação do nucleóide, uma estrutura de DNA desnudado que, embora desproteínizado, mantém uma conformação de *loop* super-enrolado ancorada à matriz nuclear residual. A integridade estrutural e o grau de super-helicoidização do DNA neste nucleóide definem sua capacidade de resistir à migração eletroforética subsequente (Pu et al., 2015).

4 O PROTOCOLO ALCALINO ($\text{pH} \geq 13$): A CHAVE DA SENSIBILIDADE E O REPARO POR EXCISÃO DE BASE

A alta sensibilidade do SCGE é atribuída, sobretudo, ao protocolo alcalino, que requer a incubação do nucleóide por um período estendido (geralmente 20 a 60 minutos) em uma solução alcalina forte (NaOH e Na_2EDTA com pH tipicamente ≥ 13). Esta exposição à alcalinidade extrema cumpre duas funções bioquímicas vitais para a detecção de danos: (Pu et al., 2015; Azqueta and Collins, 2013).

Em primeiro lugar, o ambiente alcalino provoca a desnaturação do DNA, resultando na separação das duas fitas. Nas regiões onde existia uma Quebra de Fita Simples (SSB) ou uma Quebra de Fita Dupla (DSB), o desenrolamento das fitas expõe os fragmentos de fita simples. Em segundo lugar, e de maior importância mecanística, a alcalinidade promove a conversão de sítios lábeis a álcalis em SSBs (Collins 2004). Os sítios abásicos (APs), formados pela perda de bases por hidrólise ou pela ação de DNA glicosilases (como a OGG1 no início do BER), são instáveis e prontamente clivados sob $\text{pH} \geq 13$. Desta forma, o SCGE alcalino não apenas quantifica as quebras preexistentes, mas também estima a densidade de sítios APs, que são intermediários chave do reparo do DNA. Consequentemente, a cauda do Cometa alcalino representa a soma de SSBs, DSBs e a concentração de sítios lábeis a álcalis (Bankoglu et al., 2021; Lorenzo et al., 2013).

5 O PROTOCOLO NEUTRO (PH ~ 8): ESPECIFICIDADE PARA QUEBRAS DE FITA DUPLA

Em contraste com a multifuncionalidade do protocolo alcalino, o SCGE neutro, realizado em tampões de pH fisiológico (tipicamente pH 7.4 a 8.0), é especificamente calibrado para a detecção predominante de Quebras de Fita Dupla (DSBs). Neste protocolo, a dupla fita do DNA não é desnaturada pela alcalinidade; as pontes de hidrogênio são mantidas. A migração eletroforética seletiva sob condições neutras é creditada à separação de fragmentos lineares de DNA de dupla fita resultantes de DSBs (Speit and Hartmann 2012). Embora a sensibilidade seja intrinsecamente menor que a do protocolo alcalino — dada a menor frequência de DSBs em comparação com SSBs e sítios APs —, o SCGE neutro é indispensável em estudos de radiotoxicologia ou na avaliação da eficácia de inibidores de reparo de DSBs (como o NHEJ), fornecendo uma medida direta do dano mais letal (Speit and Rothfuss, 2012).

6 O COMETA ENZIMÁTICO: DECIFRANDO A QUALIDADE DO DANO OXIDATIVO

A versatilidade do SCGE é ampliada pela incorporação de enzimas que agem como sondas de danos químicos específicos. O Cometa Enzimático permite o mapeamento quantitativo de lesões de base que não são quebras per se, mas que são substratos para enzimas de reparo. A técnica mais empregada nesta variante envolve a Formamidopirimidina-DNA Glicosilase (FPG), que possui a capacidade bifuncional de

reconhecer purinas oxidadas (como a 8-oxoG) e, subsequentemente, clivar o esqueleto fosfodiéster no sítio AP resultante. O aumento da cauda do Cometa observado após o tratamento com FPG, em comparação com um tratamento de controle sem a enzima, corresponde diretamente à frequência de lesões oxidativas. De forma análoga, a Endonuclease III (Nth) pode ser utilizada para detectar pirimidinas oxidadas. Esta abordagem enzimática transforma o SCGE de um mero contador de quebras em uma poderosa ferramenta para a avaliação da qualidade do dano, essencial para estudos de estresse oxidativo e biomonitoramento (Collins 2004).

7 A CINÉTICA DO REPARO: O SCGE COMO CRONÔMETRO CELULAR

A aplicação do SCGE para o estudo da cinética de reparo é talvez a sua maior contribuição para a biologia do dano ao DNA. Ao expor as células a um agente genotóxico e, em seguida, permitir a recuperação celular em meio fresco por períodos definidos (e.g., 0, 10, 30, 60 minutos), o ensaio registra a redução progressiva do comprimento e do Momento da Cauda. Essa diminuição da cauda reflete diretamente a selagem de SSBs e de sítios APs (intermediários do BER) pela maquinaria de reparo, notavelmente as DNA polimerases e DNA ligases. Taxas de reparo lentas ou ineficientes identificam populações celulares com potencial de instabilidade genômica aumentada, fornecendo *insights* preditivos cruciais em oncologia, onde a deficiência no reparo pode ser explorada terapeuticamente, um conceito conhecido como letalidade sintética (Li et al. 2021).

8 O ENSAIO TUNEL: A SONDA ENZIMÁTICA DA APOPTOSE E DA FRAGMENTAÇÃO LETAL

O Ensaio TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) é uma metodologia de marcação de quebras de DNA que, embora tecnicamente capaz de identificar Quebras de Fita Simples (SSBs), é classicamente empregada como um biomarcador robusto e quantitativo da morte celular programada (apoptose). O TUNEL é um ensaio de resultado, avaliando o estágio final da cascata de degradação do DNA, e não o dano primário em células viáveis (Figura 2) (Moore et al., 2021).

Figura 2: A imagem ilustra a base bioquímica e a aplicação prática do ensaio TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*), uma metodologia para detectar a fragmentação maciça do DNA que ocorre durante a morte celular programada (apoptose). **Lado Esquerdo (Contexto Celular):** Apresenta uma célula em estágios avançados de apoptose. O núcleo central é mostrado sofrendo picnose (condensação extrema da cromatina) e fragmentação, formando múltiplos corpos apoptóticos que brotam da célula. Uma lupa amplia a borda de um núcleo condensado, revelando a Cromatina Condensada densamente compactada. **Lado Direito (Mecanismos Molecular):** Um diagrama de fluxo vertical detalha o processo em nível molecular. **1. Clivagem por CAD (DNase Ativada por Caspases):** Mostra a dupla hélice de DNA sendo cortada pela enzima CAD (uma endonuclease ativada pela cascata de caspases durante a apoptose). CAD realiza clivagens internucleossomais, gerando múltiplos fragmentos de DNA com extremidades 3'-OH livres. **2. Ação da Tdt (Terminal Deoxinucleotidil Transferase):** Demonstra a atividade da enzima Tdt, uma polimerase de DNA não-dependente de molde. A Tdt é mostrada adicionando ativamente nucleotídeos marcados (dUTP-Fluoróforo, representados por esferas verdes brilhantes) especificamente nas extremidades 3'-OH livres expostas pela CAD. **Painel Inferior (Resultado Visível):** Duas micrografias simuladas de microscopia de fluorescência demonstram a interpretação do ensaio. **Célula Viável (TUNEL Negativa):** Mostra núcleos íntegros e ovais corados em azul pelo contracolorante nuclear (ex: DAPI), sem sinal verde. Isso reflete o *background* da técnica, onde *nicks* isolados de reparo geram sinal insignificantes. **Célula Apoptótica (TUNEL Positiva):** Mostra núcleos fragmentados e condensados brilhando intensamente em verde. A alta densidade de quebras satura o núcleo com fluoróforo, indicando Alta Fragmentação de DNA, o marcador determinante do destino celular apoptótico.

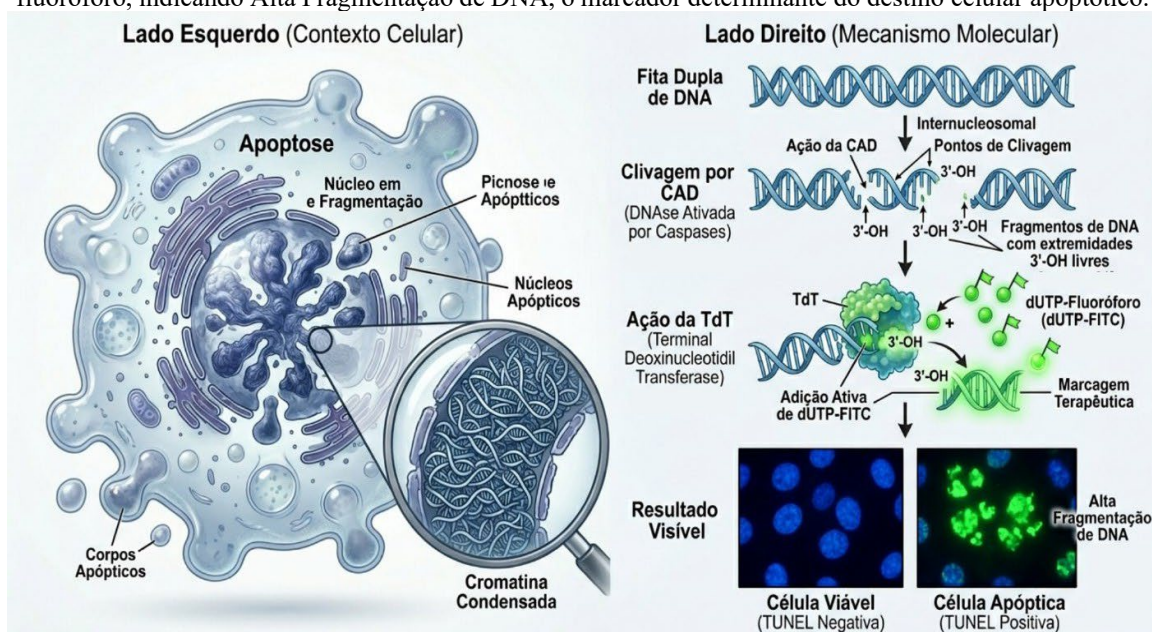


Imagem criada pela autora no site Canva.com.

9 O PRINCÍPIO CATALÍTICO DA TDT E A CLIVAGEM INTERNUCLEOSSOMAL

O mecanismo central do ensaio TUNEL reside na atividade da enzima Terminal Deoxinucleotidil Transferase (Tdt). Esta polimerase de DNA não-dependente de molde possui a capacidade única de adicionar desoxinucleotídeos à extremidade 3'-hidroxila (3'-OH) livre de uma fita de DNA. O mecanismo central do ensaio TUNEL reside na atividade da enzima Terminal Deoxinucleotidil Transferase (Tdt). Esta polimerase de DNA não-dependente de molde possui a capacidade única de adicionar desoxinucleotídeos à extremidade 3'-hidroxila (3'-OH) livre de uma fita de DNA.

Durante a fase de execução da apoptose, a ativação da cascata de caspases culmina na ativação da DNase Ativada por Caspases (CAD). A CAD migra para o núcleo e cliva o DNA em sítios específicos entre os nucleossomos, resultando em fragmentos de DNA de tamanho regular, tipicamente múltiplos de 180 pares de bases. Este evento de clivagem internucleossomal gera uma enorme quantidade de extremidades 3'OH livres. No protocolo TUNEL, estas extremidades 3'OH servem como substrato para a TdT, que catalisa a incorporação de dUTP que foi previamente marcado com um fluoróforo (e.g., FITC) ou biotina. A alta densidade de quebras na célula apoptótica satura o núcleo com fluorescência, permitindo uma quantificação inequívoca por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (Moore et al., 2021; Ribeiro et al., 2017).

10 DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA: *NICK* FISIOLÓGICO VS. FRAGMENTAÇÃO LETAL

A distinção entre o sinal Cometa e o sinal TUNEL é fundamental para a interpretação mecanística. Embora a TdT possa, teoricamente, marcar qualquer SSB (o *nick*), o *nick* temporário e isolado gerado pela via do Reparo por Excisão de Base (BER) em uma célula viável resulta em um sinal TUNEL insignificante, que geralmente se perde no *background* da técnica. O sinal TUNEL positivo e clinicamente relevante reflete a fragmentação maciça e letal do DNA catalisada pela CAD, que indica um ponto de não retorno no destino celular (Naselli et al. 2024).

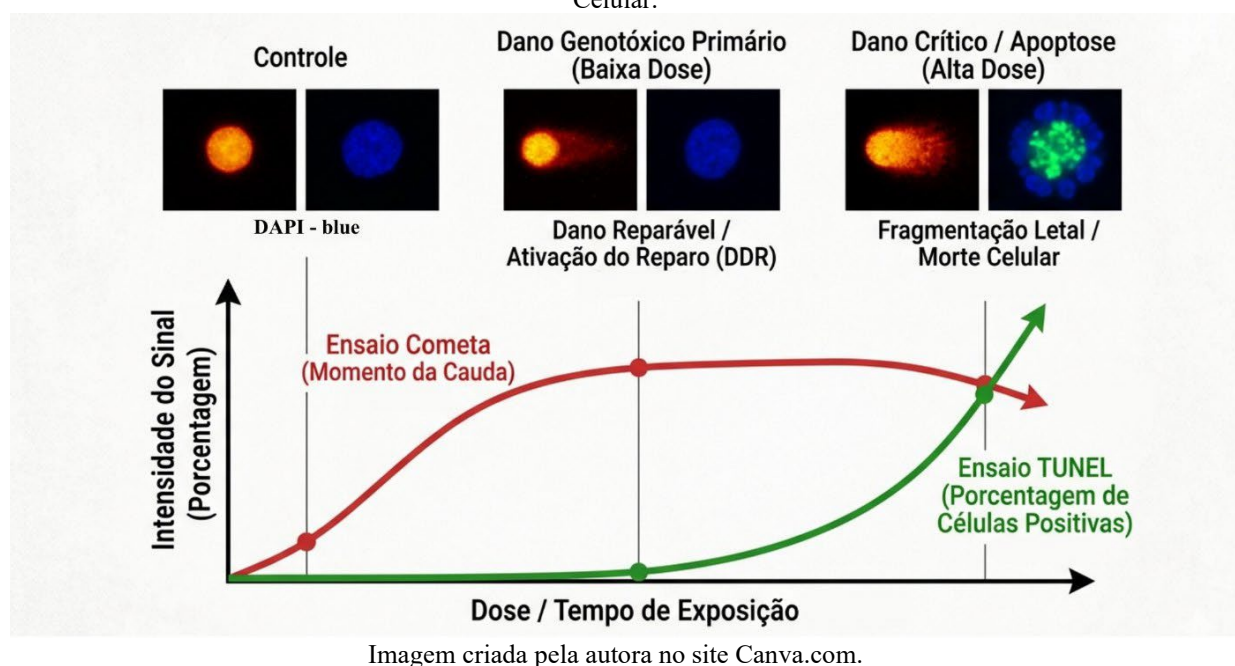
Portanto, o TUNEL não é um ensaio de genotoxicidade primária, mas sim um marcador de citotoxicidade por apoptose. Sua aplicação é inestimável na avaliação da eficácia de agentes indutores de morte celular, como quimioterápicos, e na área de toxicologia reprodutiva, onde a integridade do DNA em espermatozoides é um indicador crítico da qualidade gamética. A alta fragmentação do DNA espermático, detectada pelo TUNEL, correlaciona-se com infertilidade e falhas no desenvolvimento embrionário inicial (Moore et al., 2021).

11 O CENÁRIO INTEGRADO: SINERGIA METODOLÓGICA E DISCRIMINAÇÃO MECANÍSTICA

A análise combinada e coordenada dos ensaios Cometa e TUNEL em um mesmo sistema experimental fornece uma resolução biológica muito superior àquela obtida com o uso isolado de qualquer uma das técnicas. Essa sinergia permite a discriminação entre o

dano inicial (genotoxicidade) e as consequências celulares (citotoxicidade) em função da dose e do tempo de exposição (Figura 3) (Naselli et al., 2024).

Figura 3: A imagem ilustra a sinergia metodológica entre o ensaio Cometa e o ensaio TUNEL, demonstrando como a análise combinada permite discriminar entre o dano inicial ao DNA (genotoxicidade) e as consequências celulares finais (citotoxicidade por apoptose) em função da dose e do tempo de exposição. **Gráfico conceitual (Painel Inferior):** Apresenta o mapeamento da resposta celular no espaço dose-tempo. A linha vermelha representa o sinal do Ensaio Cometa (Momento da Cauda), um marcador de dano primário ao DNA. O sinal sobe rapidamente em doses baixas, refletindo a indução de SSBs e sítio APs, atinge um patamar e pode cair ligeiramente em doses letais. A linha verde representa o sinal do Ensaio TUNEL (Porcentagem de Células Positivas), um biomarcador de morte celular programada (apoptose). O sinal permanece baixo em doses baixas e sobe drasticamente em doses altas (letais), indicando fragmentação maciça do DNA. Os eixos são rotulados como “Intensidade do Sinal (Porcentagem)” (Y) e “Dose / Tempo de Exposição” (X). **Cenários Representativos (Painel Superior):** Mostra micrografias simuladas em falsa cor de células correspondentes a diferentes pontos do gráfico. **1. Controle:** Células não tratadas, mostrando um núcleo de Cometa sem cauda e um núcleo de TUNEL negativo (corado em azul pelo contracolorante nuclear, ex: DAPI). **2. Dano Genotóxico Primário (Baixa Dose):** Corresponde ao ponto de divergência entre as curvas. Observa-se um cometa com cauda evidente (alto Momento da Cauda), indicando indução de quebras, mas um núcleo de TUNEL negativo. Este cenário representa Dano Reparável / Ativação do Reparo (DDR), onde a célula está engajada na resposta ao dano. **3. Dano Crítico / Apoptose (Alta Dose):** Corresponde à zona de dominância do sinal TUNEL. Observa-se um cometa tipo “ouriço” (*hedgehog*), onde quase todo o DNA migrou para a cauda. O núcleo correspondente no ensaio TUNEL é fortemente positivo (brilhando em verde, ex: FITC), indicando Fragmentação Letal / Morte Celular.



12 MAPEAMENTO DA RESPOSTA CELULAR NO ESPAÇO DOSE-TEMPO

A genotoxicologia moderna utiliza a dualidade Cometa-TUNEL para criar um mapa de destino celular que se desenrola no espaço dose-tempo. Em concentrações baixas e tempos curtos, um agente tipicamente induz um aumento significativo no Momento da Cauda do Cometa (refletindo SSBs e sítios APs), enquanto o sinal TUNEL permanece ao

nível basal. Este é o cenário de Dano Genotóxico Primário e Ativação do Reparo. A célula está engajada na DDR e é potencialmente capaz de reverter o dano (Moore et al., 2021; Mitchell et al., 2011; Santonastaso et al., 2019; Naselli et al., 2024).

À medida que a dose ou o tempo de exposição aumentam, pode-se observar uma progressiva diminuição da capacidade de reparo (SCGE de Reparo), acompanhada por um aumento incipiente na positividade do TUNEL. Este cenário indica que o dano atingiu o limiar de Dano Crítico e Transição para Apoptose. O acúmulo de dano irreversível ou a falha do *checkpoint* do ciclo celular levam à ativação da via intrínseca de morte (Bankoglu et al. 2021).

Em concentrações letais, o resultado é dominado por um alto sinal TUNEL (alta porcentagem de células apoptóticas). Curiosamente, o padrão do Cometa pode, nesta fase, mudar para o tipo "ouriço" (onde quase todo o DNA migra para a cauda), mas a interpretação desse Cometa é dominada pelo fato de a célula estar morta, e não pelo dano primário. A alta intensidade do TUNEL, nestes casos, é o marcador determinante do destino celular (Santonastaso et al., 2019; Naselli et al., 2024).

A descordância mais informativa ocorre quando se observa um Cometa persistentemente alto (deficiência de reparo) em células que permanecem TUNEL negativas (sobreviventes). Este resultado aponta para células com falhas no *checkpoint* apoptótico ou com vias de reparo comprometidas, que sobrevivem com uma carga genômica danificada, o que é um fator de risco primário para a transformação maligna (Moore et al., 2021; Mitchell et al., 2011).

13 O DUO COMETA-GAMA H2AX: A TRIANGULAÇÃO DO DANO

Para refinar a detecção e o reparo de Quebras de Fita Dupla (DSBs) em células viáveis, a estratégia mais avançada é combinar o SCGE alcalino ou neutro com a marcação de γ -H2AX (fosforilação da histona H2AX). A histona H2AX é fosforilada na serina 139 em megabases de DNA adjacentes a uma DSB pela ação das quinases ATM e ATR. Esses focos de γ -H2AX são facilmente visualizados por imunofluorescência e atuam como andaimes para o recrutamento de proteínas do DDR.

A combinação fornece uma triangulação: o SCGE (Eletroforese) mede a migração total do DNA quebrado; a contagem de focos de γ -H2AX (Imunofluorescência) mede o número de DSBs (dano qualitativo); e o TUNEL (Marcação Enzimática) mede o destino celular. Uma célula com cauda de Cometa e focos de γ -H2AX, mas TUNEL negativa, está

viva e reparando ativamente. Uma célula com alto TUNEL e γ -H2AX pode estar em apoptose induzida por DSBs, com a fragmentação sobrepujando o reparo. Esta sinergia de técnicas biofísicas, enzimáticas e imunológicas estabelece o padrão-ouro na genotoxicologia mecanística (Chen et al. 2024).

14 PERSPECTIVAS DE ALTO RENDIMENTO E IMPLICAÇÕES TRANSLACIONAIS

Apesar da sua robustez estabelecida, o futuro dos ensaios Cometa e TUNEL depende da superação das suas limitações históricas e da integração em fluxos de trabalho de alta produtividade para atender às demandas da toxicologia regulatória e da medicina personalizada (Figura 4).

Figura 4: Este infográfico ilustra a evolução tecnológica e a aplicação clínica do ensaio Cometa, destacando como a automatização e a análise digital estão transformando a técnica em uma ferramenta robusta para a medicina personalizada. **Seção A (High-Throughput – HT):** Demonstra a transição de métodos manuais para plataformas de alta produtividade. **Esquerda:** Representação do “gargalo histórico”. Um ícone de uma lâmina de microscópio Manual com um “X” vermelho, rotulada como Manual/Subjetivo, simbolizando o viés significativo e a baixa taxa de rendimento da pontuação visual tradicional. **Seta de Transição:** Indica a evolução para a automatização. **Direita:** Ilustração de uma plataforma de *High-Throughput* (HT). Um braço robótico é mostrado processando uma placa de 96 poços, automatizando a preparação de células e a eletroforese. Abaixo, uma tela representa um software de análise de imagem automática que utiliza algoritmos de visão computacional para identificar contornos digitais coloridos ao redor da cabeça e da cauda de múltiplos cometas simultaneamente. Esta padronização estrita de protocolos e métricas resulta no SCGE de Alto Rendimento e Padronizado. **Seção B (Aplicações na Medicina de Precisão):** Apresenta o fluxo horizontal do aplicação clínica do ensaio Cometa para guiar o tratamento do câncer. **1. Ícones do Paciente:** Inicia com o paciente com câncer. **2. Biópsia:** Seta para o ícone de uma amostra de tecido e tubo de sangue, representando a coleta de Biópsia / Células Tumoriais Circulantes. **3. Teste Laboratorial:** Seta para um ícone de placa de 96 poços com um gráfico de linhas e DNA, rotulado como Cinética de Reparo ex vivo (Ensaio Cometa). Este teste mede a “assinatura de reparo” individual do paciente, validando o SCGE como uma ferramenta *ex vivo*. **4. Resultados e Tratamento:** Uma seta direcional aponta para dois caminhos terapêuticos possíveis com base na cinética de reparo: **Caminho 1: Reparo Eficiente:** Seta para um ícone de tratamento padrão, com a legenda indicando o tratamento padrão. **Caminho 2: Reparo Deficiente (ex: BRCA mutado):** Seta para um ícone detalhado de uma pílula específica (ex: inibidor de PARP), indicando que o reparo deficiente de DSBs torna os tumores hipersensíveis a essa terapia. A legenda final resume este conceito com Letalidade Sintética Guiada por Biomarcador.

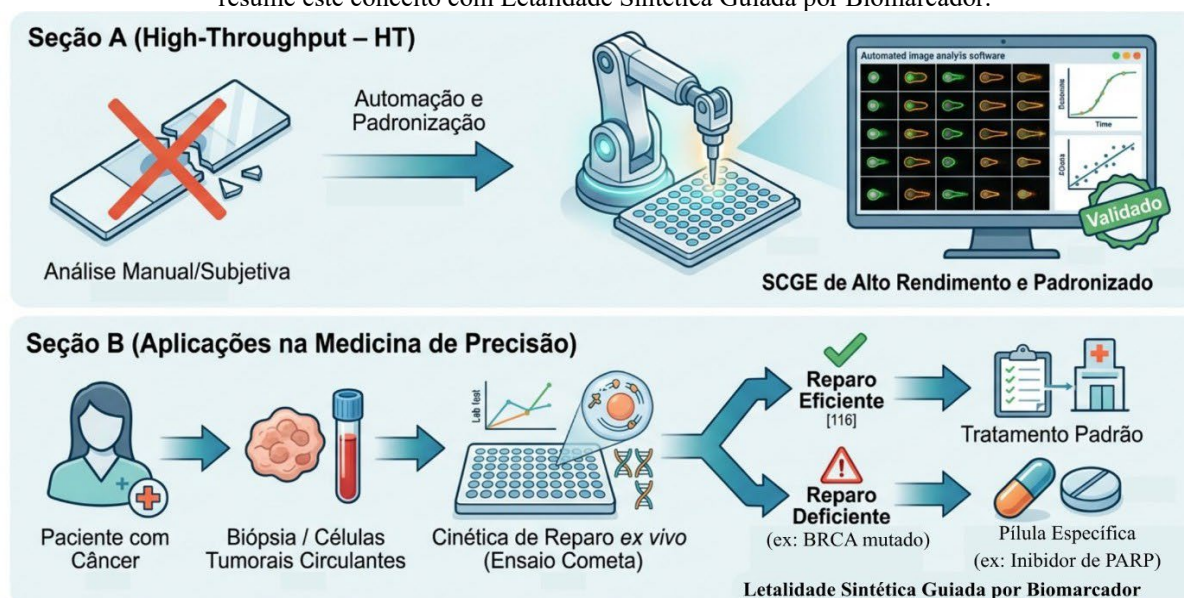


Imagem criada pela autora no site Canva.com.

15 AUTOMATIZAÇÃO E ANÁLISE DIGITAL DO ENSAIO COMETA

Historicamente, o principal gargalo do Ensaio Cometa era a subjetividade da pontuação visual e a baixa taxa de rendimento. A análise manual de imagens introduzia um viés significativo, e a variação inter-laboratorial era uma preocupação constante. A resposta a este desafio reside na adoção de plataformas de automatização completas. O desenvolvimento de *softwares* de análise de imagem baseados em algoritmos avançados de visão computacional, capazes de identificar automaticamente as fronteiras da cabeça e da cauda, e calcular métricas como a Porcentagem de DNA na Cauda (métrica considerada a mais robusta) e o Comprimento da Cauda, revolucionou a reprodutibilidade.

Plataformas de *High-Throughput (HT)* agora permitem o processamento robotizado de lâminas de 96 poços, onde a preparação das células e a incorporação na agarose são automatizadas. O SCGE de *HT* permite o escaneamento e a análise de milhares de células por experimento em curtos períodos de tempo, aumentando o poder estatístico e validando a utilização do ensaio em triagem de compostos genotóxicos e na avaliação de grandes coortes de biomonitoramento humano (Langie et al. 2015). A padronização estrita de protocolos e métricas, liderada por grupos internacionais, garante que o SCGE continue a ser uma técnica insubstituível.

16 O REFINAMENTO DO TUNEL E AS NOVAS SONDAGENS DE REPARO

O ensaio TUNEL também encontra refinamento ao ser integrado com citometria de fluxo. A combinação do sinal de fluorescência do TUNEL com o corante de exclusão de viabilidade (como o Iodeto de Propídio) e a marcação de anticorpos contra proteínas de reparo permite a classificação em quadrantes de células viáveis, apoptóticas precoces, apoptóticas tardias e necróticas. A diferenciação entre apoptose e necrose é crucial, pois a necrose, uma forma de morte celular desregulada, induz a lise celular e a degradação do DNA sem a clivagem internucleossomal característica, mas resultando em *nicks* que podem ser marcados. O TUNEL de alto sinal, contudo, permanece o marcador mais forte da apoptose mediado pela CAD (Moore et al. 2021).

As fronteiras atuais da genotoxicologia exploram o conceito de sondagem de danos específicos para além do Cometa Enzimático. O desenvolvimento de sondas fluorescentes que se ligam especificamente a adultos de DNA ou a intermediários de reparo permite a visualização *in vivo* da localização e da progressão do reparo, fornecendo uma camada de detalhe que complementa a quantificação de quebras dos ensaios SCGE e TUNEL.

17 IMPACTO NA MEDICINA DE PRECISÃO E NA CARCINOGÊNESE

Em última análise, o valor mais proeminente da dupla Cometa-TUNEL reside na sua aplicação na medicina de precisão. A capacidade de medir a capacidade individual de reparo de um paciente — a sua "assinatura de reparo" — tem um impacto direto no tratamento do câncer. Tumores que apresentam um reparo deficiente de DSBs (e.g., mutações em BRCA1/BRCA2) são hipersensíveis a inibidores de PARP, o que leva à letalidade sintética. O SCGE tem sido validado como uma ferramenta *ex vivo* para prever

essa sensibilidade, expondo células tumorais circulantes ou linfócitos a agentes quimioterápicos e avaliando a cinética de reparo antes de iniciar o tratamento *in vivo*.

A compreensão da dinâmica entre o dano primário (Cometa), o mecanismo de reparo (SCGE de Reparo, Cometa Enzimático) e o destino celular (TUNEL) é essencial para o desenvolvimento de terapias que visam o DDR. Tais terapias representam a próxima geração de abordagens oncológicas, onde o dano é induzido e o reparo é intencionalmente bloqueado para empurrar as células cancerosas para a morte celular, transformando os ensaios Cometa e TUNEL de meras ferramentas de diagnóstico em guias estratégicos para a terapia (Alhmoud et al. 2020). Estes ensaios, portanto, não são relíquias metodológicas, mas sim pilares dinâmicos da pesquisa em genotoxicologia, constantemente aprimorados e integrados para desvendar as complexas vias que governam a vida e a morte celular.

REFERÊNCIAS

- Alhmoud M, Ali A S M, Al-Sayari F M, Abdelrahman R F (2020) Targeting DNA damage response and repair for cancer therapy. *Cancers* 12(11) 3122.
- Bankoglu E, Sargin S, Sezgin O, Saydam G, Turel S (2021) DNA damage induced by chemotherapeutic agents in acute myeloid leukemia cells: A comparative study of comet assay and flow cytometry. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 141 111754.
- Chen Z, Zhang J, Li H, Yang M, Wang X (2024) DNA damage and repair in cancer therapy: Recent advances and challenges. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 43 11.
- Collins A R (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 26 249-261.
- Hanahan D, Weinberg R A (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5) 646-674.
- Langie S A S, Azqueta A, Collins A R (2015) The comet assay: past, present, and future. *Frontiers in Genetics* 6 266.
- Li L, Liu Y, Yang M, Li P, Xu X (2021) DNA repair mechanisms as therapeutic targets for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 114.
- Moore L, Kretzschmar K, Sayer A, Gane E J, Moore G E (2021) TUNEL assay for apoptosis detection: A review of its applications, limitations, and recent advances. *Histochemistry and Cell Biology* 156 361-377.
- Moraes R M (2012) DNA Repair and Human Disease. IntechOpen.
- Naselli F, Santonastaso V, Micali S, Papi A (2024) The TUNEL assay for DNA fragmentation: A new perspective in genotoxicity testing. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 270 115783.
- Pu W, Gao X, Lv Q, Xu D (2015) Single-cell gel electrophoresis (comet assay) in assessing DNA damage induced by genotoxic agents. *Journal of Visualized Experiments* 95 e52261.
- Speit G, Hartmann A (2012) The comet assay: a sensitive test for the detection of DNA damage in living cells. *Biological Chemistry* 389(11) 1421-1428.

EXPLORANDO A BIOTECNOLOGIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS: DA BIOQUÍMICA VEGETAL ÀS DINÂMICAS DE MERCADO

Rebecca Leal Caetano

Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
Laboratório de Educação em Ambiente e Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

1 INTRODUÇÃO: O REFINO QUÍMICO DA NATUREZA

Diferente dos animais, as plantas enfrentam o desafio da imobilidade (BORGES & AMORIM, 2020; ZANETTI, 2024). Para sobreviverem a estresses bióticos (herbívoros e patógenos) e abióticos (seca, radiação UV e variações térmicas), elas converteram limitações físicas em virtudes químicas (BORGES & AMORIM, 2020; REZENDE et al., 2016). Este fenômeno é orquestrado pelo metabolismo secundário, ou metabolismo especializado, que, ao contrário do primário — focado em funções vitais básicas como respiração e crescimento —, expressa a individualidade biológica de cada espécie (TAIZ & ZEIGER, 2006; BORGES & AMORIM, 2020; REZENDE et al., 2016).

Historicamente, o ser humano aprendeu a decifrar esse código químico (VIOLANTE, 2008; ZANETTI, 2024). Desde os papiros de Ebers no Antigo Egito, que descreviam o uso da hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), até os tratados médicos indianos da medicina Ayurvédica, os óleos essenciais (OEs) têm sido pilares da farmácia natural (CARVALHO, 2016). Hoje, esses "princípios ativos" representam a vanguarda da biotecnologia, atuando como elos entre a biodiversidade e a inovação industrial (BORGES, 2013; SILVA, 2016; ZANETTI, 2024).

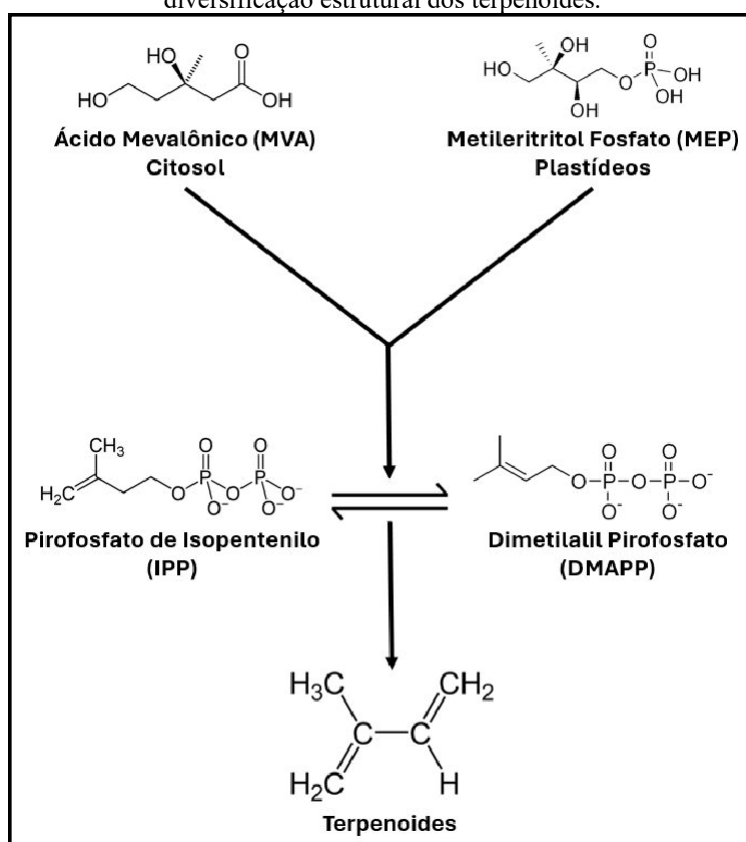
2 ARQUITETURA BIOQUÍMICA: A ROTA DOS TERPENOS

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, predominantemente compostas por terpenoides, uma classe química vasta com mais de 55 mil moléculas identificadas (BORGES & AMORIM, 2020; ZANETTI, 2024). Estruturalmente, eles são construídos a partir de unidades básicas de cinco carbonos (C5), conhecidas como isopentenil difosfato (IPP) (BORGES & AMORIM, 2020; VIZZOTTO et al., 2010). A biossíntese dessas moléculas ocorre em compartimentos celulares específicos e segue duas rotas metabólicas principais (Figura 1) que se comunicam entre si (BORGES & AMORIM, 2020; REZENDE et al., 2016):

Rota do Ácido Mevalônico (MVA): localizada no citoplasma, utiliza o Acetil-CoA como precursor para formar sesquiterpenos e triterpenos (como as saponinas, conhecidas por suas propriedades detergentes e de defesa).

Rota do Metileritritol Fosfato (MEP): ocorre nos cloroplastos e plastídeos, partindo de intermediários da glicólise para sintetizar monoterpenos (os componentes mais comuns dos aromas) e carotenoides.

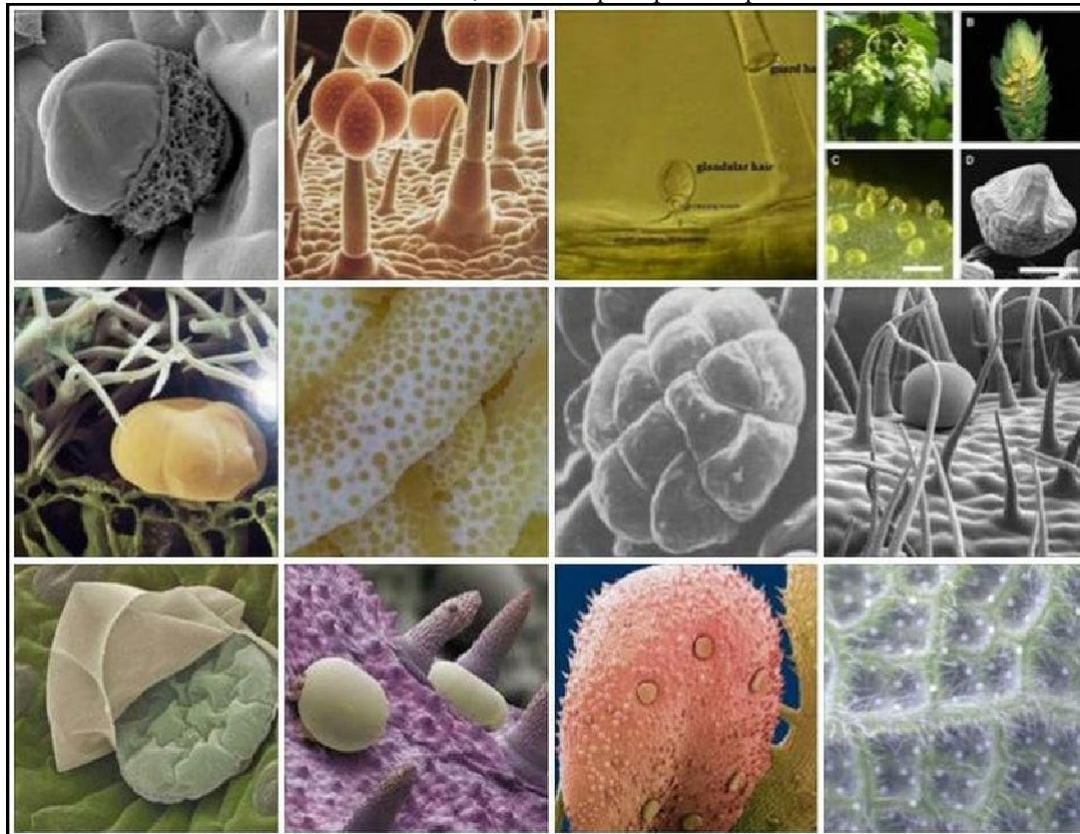
Figura 1: Esquema simplificado das duas vias biossintéticas responsáveis pela formação de terpenoides: a via do ácido mevalônico (MVA), que ocorre no citosol, e a via do metileritritol fosfato (MEP), localizada nos plastídeos. Ambas convergem para a produção dos precursores universais pirofosfato de isopentenilo (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que atuam como unidades básicas de cinco carbonos para a síntese e diversificação estrutural dos terpenoides.



Essa dualidade permite que a planta gerencie suas defesas de forma dinâmica (REZENDE et al., 2016; BORGES & AMORIM, 2020). Os monoterpenos (C10), por exemplo, são leves, voláteis e que podem ser extraídos de glândulas secretora presentes na superfície de folhas e flores ou no interior de raízes, caules e talos de espécies vegetais (Figura 2) (VIZZOTTO et al., 2010; BORGES & AMORIM, 2020). Essa classe de substâncias é ideal para a sinalização aérea ou repelência imediata de insetos (VIZZOTTO et al., 2010; TAIZ et al., 2017), enquanto substâncias mais complexas, como as saponinas

(triterpenos), atuam na destruição de membranas de invasores microbianos (VIZZOTTO et al., 2010; ZANETTI, 2024).

Figura 2: Micrografias de glândulas de óleo essencial. Os óleos essenciais são liberados dessas glândulas por estruturas ou tubos semelhantes a cabelos, à medida que a parte da planta é tocada ou estimulada.



Fonte: Komehsa essentials.

Essas rotas não apenas produzem o odor característico das plantas (SIMÕES, 2003; PICHERSKY, 2002; BORGES & AMORIM, 2020), mas funcionam como uma **"modelagem molecular evolucionária"** (WINK & SCHIMMER, 1999), onde cada molécula, como o mentol ou o limoneno, desempenha um papel ecológico estratégico, seja atraindo polinizadores ou repelindo invasores (VIZZOTO et al., 2010) por meio de **toxicidade seletiva** (BORGES & AMORIM, 2020).

3 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO RESPOSTA A ESTRESSES

A produção de OEs é altamente dinâmica e sensível ao ambiente (FIGUEIREDO et al., 2008; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Pesquisas com o gênero *Eucalyptus*, por exemplo, demonstram que condições de estresse hídrico alteram significativamente o metaboloma das raízes e folhas (BORGES, 2013; VALDÉS et al., 2013). Em situações de seca, as plantas podem aumentar a concentração de metabólitos secundários para realizar

o ajuste osmótico, protegendo as membranas celulares contra danos oxidativos (TAIZ & ZEIGER, 2006; BORGES & AMORIM, 2020; SHVALEVA et al., 2005).

Além disso, os OEs atuam como fitoalexinas, antibióticos naturais produzidos em resposta a infecções microbianas (VIZZOTTO et al., 2010; REZENDE et al., 2016). Substâncias como os piretroides, presentes em certas flores, são inseticidas naturais poderosos devido à sua baixa persistência ambiental e toxicidade reduzida para mamíferos, tornando-os ideais para uma agricultura biorracional (BORGES & AMORIM, 2020; KHAN et al., 2018; VIZZOTTO et al., 2010).

4 NORMATIZAÇÃO E RIGOR TÉCNICO: O PAPEL DA ISO

Para que um extrato vegetal seja internacionalmente aceito como "óleo essencial", ele deve seguir padrões rigorosos (ISO 9235:2021). De acordo com a norma **ISO 9235**, um OE é estritamente o produto obtido por destilação a vapor, destilação a seco ou processos mecânicos (como a prensagem a frio de cascas de cítricos) (ISO 9235:2021; BIZZO & REZENDE, 2022). Extratos obtidos por solventes ou fluidos supercríticos possuem outras denominações técnicas e não devem ser confundidos com óleos essenciais puros (ISO 9235:2021).

A padronização internacional (especialmente as normas **ISO 3218** e **ISO 4720**) é essencial para evitar equívocos comerciais e garantir que o produto rotulado como "Óleo de Lavanda" (*Lavandula angustifolia*) não contenha variações de outras espécies ou quimiotipos não autorizados (ISO 3218:2014; ISO 4720:2018; ISO 3515:2002; BIZZO & REZENDE, 2022).

No Brasil, o setor enfrenta o desafio da ausência de normas nacionais vigentes, já que as diretrizes da ABNT foram canceladas entre 2010 e 2011 (ABNT, 2022; BIZZO & REZENDE, 2022). Isso exige que produtores sigam rigorosamente os padrões internacionais (**ISO 3218** e **4720**) para garantir a uniformidade qualitativa e quantitativa, evitando que variações edafoclimáticas (solo e clima) comprometam a aceitação do produto no mercado externo (FIGUEIREDO et al., 2008; DA SILVA et al., 2016; BIZZO & REZENDE, 2022).

5 O CENÁRIO ECONÔMICO: BRASIL E O MERCADO GLOBAL

O mercado de óleos essenciais vive um momento de expansão acelerada. Em 2021, o comércio internacional foi avaliado em U\$10,3bilhões, com projeção de atingir U\$ 16 bilhões até o fim de 2026 (BIZZO & REZENDE, 2022).

Embora os EUA e a França sejam atores históricos, a Índia assumiu a liderança global em valor de exportação desde 2017, impulsionada pelo óleo de menta japonesa (BIZZO & REZENDE, 2022).

O Brasil mantém uma posição estratégica ambivalente:

Liderança em Volume: Somos o maior exportador mundial em quantidade, graças ao domínio absoluto do óleo de laranja, que é um subproduto da indústria de sucos.

Competição em Valor: Em termos de faturamento, o Brasil ocupa a quinta posição global. Curiosamente, a Índia superou os EUA desde 2017 como maior exportadora em valor, impulsionada pelo óleo de *Mentha arvensis*.

As principais tendências que impulsionam o crescimento são a substituição de aditivos sintéticos por naturais em alimentos e o "boom" da **aromaterapia**, que cresce cerca de 10% ao ano (BIZZO & REZENDE, 2022; BAIN & COMPANY, 2014). No entanto, a concentração da produção em poucos países e as mudanças climáticas representam riscos constantes ao fornecimento (BIZZO & REZENDE, 2022; HITCHEN & BRUD, 2019).

6 PERFIL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS LÍDERES DE MERCADO (DADOS IFEAT)

Abaixo, detalham-se os óleos mais comercializados globalmente, conforme a *International Federation of Essential Oils and Aroma Trades* (IFEAT) (Anexo 1) (HITCHEN & BRUD, 2019; BIZZO & REZENDE, 2022):

Laranja (*Citrus sinensis*): Líder absoluto com 50.000 a 55.000 toneladas anuais. Rico em limoneno e linalol, possui propriedades relaxantes e é amplamente usado em bebidas e aromatizantes.

Menta Japonesa (*Mentha arvensis*): Movimenta entre 25.000 e 40.000 toneladas, sendo a principal fonte de mentol natural.

Eucalipto (*Eucalyptus globulus*): Comercializa-se entre 5.000 e 11.000 toneladas, com foco em usos medicinais devido ao alto teor de 1,8-cineol.

Limão Siciliano (*Citrus limon*): Com 7.000 a 7.500 toneladas, destaca-se na indústria de bebidas e cosméticos.

Hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*): Entre 4.000 e 4.500 toneladas destinadas à higiene oral e farmacêutica.

Cravo, folhas (*Syzygium aromaticum*): Volume de 2.500 a 4.000 toneladas, com alto teor de eugenol.

Citronela (*Cymbopogon winterianus*): Com 1.500 a 3.000 toneladas, é o repelente natural por excelência, rico em citronelal e geraniol.

7 ESTUDOS DE CASO E BIOPROSPECÇÃO NACIONAL

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, o que abre portas para novos produtos biotecnológicos (SILVA, 2016; MORAIS et al., 2018). A Pimenta Longa (*Piper hispidinervum*), endêmica da Amazônia, é uma alternativa sustentável para a extração de safrol, essencial para fixadores de fragrâncias e pesticidas biorracionais (Anexo 1) (PIRES & ALLEMAN, 2015; BIZZO & HOVELL; REZENDE, 2009).

Outro destaque é a Guapeva (*Pouteria torta*), espécie do Cerrado cujas folhas produzem compostos voláteis como o ácido linoleico, com potencial antimicrobiano e farmacológico promissor (Anexo 1) (MORAIS et al., 2018). O Brasil também possui alta produtividade em espécies exóticas adaptadas (Eucalipto, Citronela e Capim-Limão) (BAIN & COMPANY, 2014). No caso do eucalipto, foram alcançados rendimentos foliares expressivos (1,0 a 1,6%), atendendo tanto o setor medicinal quanto o de perfumaria (BIZZO & HOVELL; REZENDE, 2009).

Entretanto, o caso do Pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) serve como alerta. A exploração predatória do lenho levou a espécie à lista de ameaçadas, impulsionando pesquisas para a extração do óleo a partir de podas de folhas e ramos, garantindo a renovação da fonte (BIZZO & HOVELL; REZENDE, 2009; BIZZO & REZENDE, 2022).

8 GESTÃO INDUSTRIAL E OTIMIZAÇÃO ECONÔMICA

A viabilidade de uma destilaria de óleos essenciais não depende apenas da planta, mas da eficiência do processo (LEAL, 2008; SILVA, 2016). O uso de ferramentas computacionais, como a Programação Linear (Solver) e softwares de suporte à decisão como o EssentialWeb, permitem que o produtor maximize lucros ajustando variáveis de custos agrônomicos e tempo de extração (SILVA, 2016).

Simulações computacionais demonstram que, ao ajustar variáveis como tempo de extração e custos agrônomicos complementares, é possível aumentar a receita bruta em até 2,9% e identificar "folgas" produtivas que poderiam ser convertidas em novos subprodutos, como o hidrolato (água floral) (SILVA, 2016). A comercialização do hidrolato pode representar um incremento direto de 20% sobre o valor do óleo principal, tornando o negócio mais resiliente (SILVA, 2016).

A análise de pimenta longa, por exemplo, demonstrou que a otimização pode aumentar a receita em 2,9% apenas pelo melhor aproveitamento das horas de produção (SILVA, 2016).

9 CONCLUSÃO

A biotecnologia dos óleos essenciais representa uma ponte entre a preservação ambiental e a inovação econômica (BIZZO & REZENDE, 2022). Ao compreendermos como as plantas utilizam os óleos essenciais para sua própria defesa contra estresses hídricos e térmicos (BORGES & AMORIM, 2020; REZENDE et al., 2016), podemos aplicar esses compostos como pesticidas naturais de baixa toxicidade para humanos (BORGES & AMORIM, 2020; VIZZOTTO et al., 2010). O futuro do setor no Brasil reside em superar gargalos logísticos e de padronização (SILVA, 2016; BIZZO & REZENDE, 2022), transformando nossa megadiversidade em cadeias de valor sustentáveis e competitivas no cenário global (BIZZO & REZENDE, 2022).

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Catálogo de normas. Disponível em: www.abntcatalogo.com.br. Acesso em: jan. 2024.

BAIN & COMPANY. Potencial de diversificação da indústria química Brasileira. Relatório 4 – Aromas, Sabores e Fragrâncias. BNDES/FEP/Prospecção. 2014. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/>. Acesso em: nov. 2025.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. *Química Nova*, v. 45, n. 8, p. 949-958, 2022.

BORGES, J. S. Análise comparativa do proteoma e metaboloma de raízes de dois clones de *E. grandis* x *E. camaldulensis*. 2013. 132 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. *Revista Agrotecnologia, Ipameri*, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

CARVALHO, W. R. S. de. Ensaios in vitro para determinação do potencial medicinal de extratos de plantas. In: FURLAN, C. M. (org.). VI Botânica no Inverno. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2016. p. 105-118.

DA SILVA, E. R. et al. Essential oil composition of *Piper hispidinervum* C. DC. and *Piper aduncum* L. from different regions of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, p. 647-652, 2016.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HITCHEN, A.; BRUD, W. S. In: Proceedings of the 50th International Symposium on Essential Oils; Vienna, 2019. (Dados coletados pela International Federation of Essential Oils and Aroma Trades - IFEAT).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 9235:2021: Aromatic natural raw materials – Vocabulary. Genebra: ISO, 2021.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 3218:2014: Essential oils - Principles of nomenclature. Genebra: ISO, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 4720:2018: Essential oils - Nomenclature. Genebra: ISO, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 3515:2002: Oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.). Genebra: ISO, 2002.

KHAN, S. A. et al. In Vitro Manipulations for Value Addition in Potent Herbal Insecticidal Activities of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. In: KUMAR, N. (ed.).

Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants. Singapore: Springer, 2018. p. 395-416.

LEAL, P. F. Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor. 2008. Tese (Doutorado) — Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MORAIS, R. G. de et al. Características fitoquímicas e dos compostos voláteis das folhas de *Pouteria torta* (Mart) Radlk (Sapotaceae). Itapuranga: V Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG, 2018.

PICHERSKY, E. Plant volatiles. *Current Biology*, v. 12, p. R707-R708, 2002.

PIRES, R. J. D. B.; ALLEMAN, L. E. Pimenta longa como nova alternativa de cultivo para pequenos produtores rurais. Rio Branco: Embrapa, 2015.

REZENDE, F. M. de; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; CARVALHO, W. R. S. de. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: FURLAN, C. M. (org.). VI Botânica no Inverno. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2016. p. 93-104.

SHVALEVA, A. L. et al. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiology*, Victoria, v. 26, p. 239-248, 2005.

SILVA, J. H. S. Desenvolvimento e aplicação de ferramentas computacionais para análise econômica da produção de óleos essenciais vinculados à extração por arraste a vapor. 2016. 176 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) — Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VALDÉS, A. E. et al. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. *Journal of Proteomics*, v. 79, p. 263-276, 2013.

VIOLANTE, I. M. P. Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste. 2008. 72 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) — Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Cuiabá, 2008.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

WINK, M.; SCHIMMER, O. Modes of action of defensive secondary metabolites. In: WINK, M. (ed.). Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 17–112.

ZANETTI, N. N. S. Metabolismo secundário de plantas: uma abordagem investigativa de ensino baseada em evidências e contextualização. 2024. 166 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ensino de Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2024.

ANEXO 1: FICHAS TÉCNICAS DOS PRINCIPAIS ÓLEOS ESSENCIAIS

 Fonte: A Botica Orgânica.	➤ Laranja Doce Nomenclatura Botânica: <i>Citrus sinensis</i> (Linnaeus) Osbeck Nomenclatura Vulgar: Laranja doce Técnica de Extração: Processos mecânicos de prensagem a frio do epicarpo Parte da Planta: Casca do fruto Compostos Majoritários: Decanal, octanal, linalol e limoneno Propriedades Terapêuticas: Conhecido como "óleo da alegria"; possui ação relaxante, auxilia no tratamento de insônia, combate toxinas e atua como tônico digestivo e diurético Aplicações Biotecnológicas: Agente de controle contra fungos fitopatogênicos, bactérias e insetos; o limoneno é amplamente utilizado como solvente biodegradável
 Fonte: Herbarium of Midway Harbor.	➤ Menta Japonesa Nomenclatura Botânica: <i>Mentha arvensis</i> Linnaeus Nomenclatura Vulgar: Menta japonesa ou menta do campo Técnica de Extração: Destilação a vapor Parte da Planta: Folhas Compostos Majoritários: Mentol, mentona e neomentol Propriedades Terapêuticas: Auxilia o sistema digestivo (alívio de flatulência e náuseas); no trato respiratório, atua como expectorante em casos de bronquite e sinusite; possui efeito estimulante mental Aplicações Biotecnológicas: Principal fonte mundial para extração de mentol cristalizado; apresenta forte atividade antifúngica
 Fonte: Garden Plants Online.	➤ Eucalipto (Tipo Cineol) Nomenclatura Botânica: <i>Eucalyptus globulus</i> Labill Nomenclatura Vulgar: Eucalipto Técnica de Extração: Destilação a vapor Parte da Planta: Folhas e ramos novos Compostos Majoritários: 1,8-cineol (eucaliptol) e α-pineno Propriedades Terapêuticas: Poderoso descongestionante e expectorante; possui ação analgésica para dores musculares e articulares; auxilia no foco e revitalização mental Aplicações Biotecnológicas: Uso em medicamentos e higiene oral; biopesticida e repelente natural de insetos



➤ Limão Siciliano

Nomenclatura Botânica: *Citrus limon* (Linnaeus) Burm. f.

Nomenclatura Vulgar: Limão siciliano

Técnica de Extração: Prensagem a frio

Parte da Planta: Casca

Compostos Majoritários: Limoneno, β -pineno, γ -terpineno e α -terpineol

Propriedades Terapêuticas: Benéfico para o sistema circulatório (auxilia a pressão arterial); estimulante imunológico; antisséptico para peles oleosas e acneicas.

Aplicações Biotecnológicas: Aromatizante para bebidas e alimentos; controle de patógenos em ambientes



➤ Hortelã-Pimenta

Nomenclatura Botânica: *Mentha x piperita* Linnaeus

Nomenclatura Vulgar: Hortelã-pimenta

Técnica de Extração: Destilação a vapor

Parte da Planta: Folhas

Compostos Majoritários: Mentol, mentona, mentofurano e pulegona

Propriedades Terapêuticas: Promove clareza mental e concentração; combate sintomas de rinite e alergias respiratórias; ação antisséptica e antibacteriana

Aplicações Biotecnológicas: Atividade ovicida e larvicida contra nematódeos gastrointestinais (uso veterinário); combate fungos fitopatogênicos



➤ Cravo (Folhas e Botões)

Nomenclatura Botânica: *Syzygium aromaticum* (Linnaeus) Merr. & L.M.Perry

Nomenclatura Vulgar: Cravo-da-Índia

Técnica de Extração: Destilação a vapor

Parte da Planta: Folhas (mercado internacional) ou botões florais

Compostos Majoritários: Eugenol, acetileugenol e β -cariofileno

Propriedades Terapêuticas: Energizante e revigorante; ação analgésica (especialmente para dores de dente e cabeça); eficaz contra micoses persistentes nas unhas

Aplicações Biotecnológicas: Agente antifúngico e antibacteriano potente; conservante natural na indústria alimentícia



Fonte: Unirio.

➤ Hortelã Verde

Nomenclatura Botânica: *Mentha spicata* Linnaeus

Nomenclatura Vulgar: Hortelã verde ou levante

Técnica de Extração: Destilação a vapor

Parte da Planta: Folhas

Compostos Majoritários: Carvona, limoneno e 1,8-cineol

Propriedades Terapêuticas: Calmante suave; auxilia na digestão e cicatrização de feridas; usado tradicionalmente contra verminoses

Aplicações Biotecnológicas: Bioinseticida; estudos indicam potencial atividade contra linhagens de células cancerígenas



Fonte: Boreali BCL.

➤ Cedro da Virginia

Nomenclatura Botânica: *Juniperus virginiana* Linnaeus

Nomenclatura Vulgar: Cedro

Técnica de Extração: Destilação a vapor

Parte da Planta: Madeira, casca e serragem

Compostos Majoritários: α -cedreno, thujopseno e cedrol

Propriedades Terapêuticas: Promove equilíbrio emocional e sensação de estabilidade; auxilia na meditação; reduz ansiedade e estresse

Aplicações Biotecnológicas: Fixador na perfumaria fina; repelente de traças e insetos de madeira



Fonte: Exonativa.

➤ Citronela

Nomenclatura Botânica: *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor

Nomenclatura Vulgar: Citronela de Java

Técnica de Extração: Destilação a vapor

Parte da Planta: Folhas

Compostos Majoritários: Citronelal e geraniol

Propriedades Terapêuticas: Energizante; amplamente utilizada como repelente natural de insetos; purificadora de ambientes

Aplicações Biotecnológicas: Atividade contra helmintos, carrapatos e fungos; propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias documentadas



Fonte: Farmácia da Natureza.

➤ Pimenta Longa

Nomenclatura Botânica: *Piper hispidinervum* C. DC.

Nomenclatura Vulgar: Pimenta longa

Técnica de Extração: Destilação por arraste a vapor

Parte da Planta: Partes aéreas secas (folhas e ramos finos)

Compostos Majoritários: Saffrol (teores acima de 90%).

Propriedades Terapêuticas: Uso etnofarmacológico em úlceras, diabetes e como analgésico

Aplicações Biotecnológicas: Matéria-prima essencial para a produção de heliotropina (fixador de fragrâncias) e butóxido de piperonila (sinergista de inseticidas biodegradáveis)



Fonte: Viveiro Árvores do Cerrado

➤ Guapeva

Nomenclatura Botânica: *Pouteria torta* (Mart.) Radlk

Nomenclatura Vulgar: Guapeva ou grão-de-galo

Técnica de Extração: Hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger

Parte da Planta: Folhas secas e trituradas

Compostos Majoritários: Ácido linoleico (16,16%), metil linoleato (5,49%) e etil hexadecanoato (4,82%)

Propriedades Terapêuticas: Uso popular como analgésico, estimulante da lactação e no tratamento de náuseas e vômitos

Aplicações Biotecnológicas: Potencial antimicrobiano e citotóxico; base para estudos de padronização de matérias-primas da flora nativa

NAFTOQUINONAS: DA BIOPROSPECÇÃO À NANOTERAPIA – OTIMIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM AÇÃO REDOX E ANTI-TOPOISOMERASE

Isabelle Soares Menezes

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPG-CAPS),
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Santa Rosa – Niterói 24241-000,
RJ, Brasil.

Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA), Instituto Oswaldo Cruz,
Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-360, RJ, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PAPEL CENTRAL DOS PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE FÁRMACOS

A crise de saúde global contemporânea, marcada pelo aumento da resistência a múltiplos fármacos (MDR) em bactérias, fungos e células cancerosas, exige uma reavaliação das fontes de protótipos de fármacos. Neste contexto, os produtos naturais mantêm sua relevância inquestionável, servindo como uma biblioteca química de diversidade estrutural inigualável, a qual inspirou cerca de metade dos agentes terapêuticos aprovados nas últimas décadas. A transição da medicina tradicional para a moderna bioprospecção reafirma a importância de investigar séries químicas com potencial bioativo [1-5].

Entre os metabólitos secundários de origem vegetal e microbiana, as naftoquinonas (NQs) representam uma classe de compostos dicetônicos aromáticos derivados do núcleo naftalênico. Sua presença em famílias botânicas como Bignoniaceae (*Tabebuia*) e Plumbaginaceae (*Plumbago*) (Figura 1) atesta sua importância ecológica como defesa química. Estruturalmente, a 1-4-naftoquinona é o arcabouço mais comum e reativo, caracterizado por uma conformação que facilita a ciclagem redox, o ponto focal de sua notável e promissora atividade biológica [6-9].

Este capítulo oferece um panorama detalhado da aplicação das naftoquinonas na saúde, explorando seus mecanismos de ação molecular contra patologias complexas e delineando o papel transformador das aplicações biotecnológicas na otimização de sua produção e eficácia terapêutica.

As naftoquinonas representam uma classe proeminente de compostos fenólicos, abrangendo derivados de origem natural e análogos sintéticos, cuja arquitetura molecular é definida por um núcleo dicetônico fundamentado na estrutura do naftaleno. Quimicamente,

destacam-se as 1,4-naftoquinonas, as quais se distribuem amplamente na biosfera, ocorrendo em espécimes do reino vegetal, fungos e bactérias. Nestes organismos, tais moléculas exercem funções fisiológicas críticas, atuando predominantemente como transportadores de elétrons em sistemas bioenergéticos, como as cadeias fotossintéticas e respiratórias. Esta competência funcional é intrinsecamente ligada às suas propriedades redox peculiares, viabilizadas pela presença do grupamento dicetônico no anel naftalênico, o que permite a interconversão eficiente entre estados de oxidação e redução [10-11].

Para além do seu papel metabólico central na bioenergética celular, as naftoquinonas são classificadas como metabólitos secundários essenciais aos mecanismos de defesa química. No contexto ecológico e evolutivo, estes compostos operam como agentes de proteção contra fitopatógenos, inibindo a proliferação de bactérias, fungos e microrganismos deletérios à integridade vegetal. A literatura científica corrobora essa multifuncionalidade biológica, evidenciando que as atividades antibacteriana, antifúngica e antiparasitária das naftoquinonas transcendem o âmbito botânico. Tais propriedades conferem a essas moléculas um expressivo potencial farmacológico, demonstrando eficácia não apenas contra patógenos vegetais, mas também frente a agentes etiológicos de doenças que acometem seres humanos e animais [12-13].

Estruturalmente, as naftoquinonas são classificadas de acordo com o posicionamento dos grupos carbonila no anel benzênico, sendo os isômeros mais comuns a 1,4-naftoquinona (para-naftoquinona) e a 1,2-naftoquinona (orto-naftoquinona) [14].

1.2 CLASSIFICAÇÃO E TIPOS PRINCIPAIS

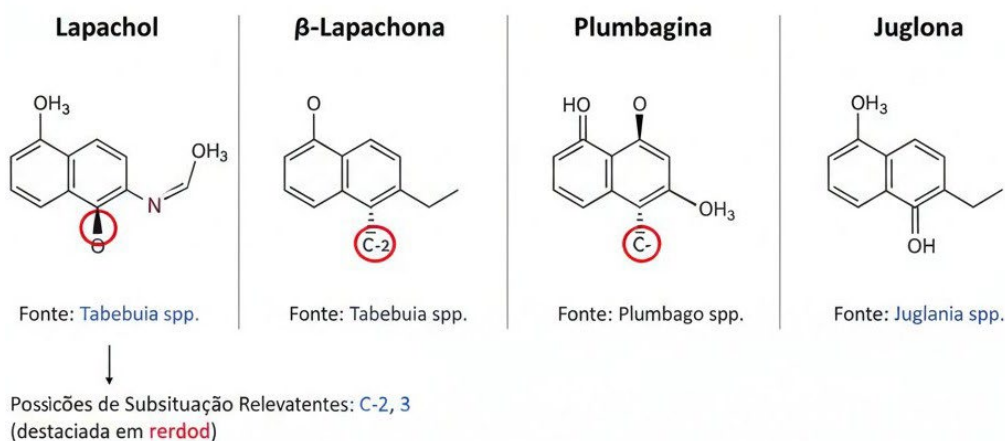
Para uma compreensão taxonômica e química, as naftoquinonas podem ser agrupadas em subcategorias baseadas em seus substituintes e fontes:

- a) Lapachonas: Derivadas principalmente de cerne de árvores do gênero *tabebuia* (Ipês). Destacam-se o Lapachol e a β -Lapachona, conhecidos por suas potentes atividades antitumorais e antivirais [9].
- b) Plumbaginas: Encontradas em plantas da família *Phumbaginaceae*. A Plumbagina é notória por induzir estresse oxidativo e apoptose em células neoplásicas [6].
- c) Junglonas: Típicas de espécies da família *Junglandaceae* (Nogueiras). A Junglona é um exemplo clássico de aleloquímico com propriedades antimicrobianas [6].

- d) Vitaminas K: Representam naftoquinonas essenciais para a coagulação sanguínea humana, sendo a vitamina K1 (filoquinona) de origem vegetal e a K2 (menaquinona) produzida por microrganismos [15].

Figura 1: Diagrama ilustrativo das estruturas químicas de naftoquinonas proeminentes (Lapachol, β -Lapachona, Plumbagina e Juglona) e suas respectivas fontes biológicas (ex: *Tabebuia* spp. e *Plumbago* spp.), destacando as posições de substituição mais relevantes (C-2, C-3).

NAFTOQUINONAS: ESTRUTURAS QUÍMICAS E FONTES BIOLÓGICAS



2 ESPECTRO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E MECANISMOS QUÍMICO-ESTRUTURAIS

A funcionalidade dicetônica do anel quinônico confere às naftoquinonas uma proeminente reatividade eletrofílica e a capacidade de sofrer múltiplas transformações *in vivo*, resultando em um amplo leque de atividades farmacológicas [16-18].

2.1 AÇÃO ANTINEOPLÁSTICA SELETIVA

O principal foco do estudo das naftoquinonas é a oncologia. Sua citotoxicidade é frequentemente seletiva para células tumorais, o que é atribuído primariamente ao seu mecanismo de ciclagem redox. As células cancerosas exibem um metabolismo alterado, com níveis elevados de certas enzimas redutoras (como a NAD(P)H quinona oxidoreductase 1, NQO1). A NQO1 pode reduzir a naftoquinona ao $\cdot$ radical livre semiquinona, que, na presença de oxigênio molecular, rapidamente se reoxida, gerando Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), notadamente o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) [19-21].

O acúmulo descontrolado de EROs supera a capacidade de desintoxicação das células cancerosas, levando ao estresse oxidativo e à subsequente disfunção mitocondrial.

Este dano mitocondrial é o principal gatilho para a via apoptótica intrínseca, que culmina na morte celular programada [22-23].

2.2 MODULAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA

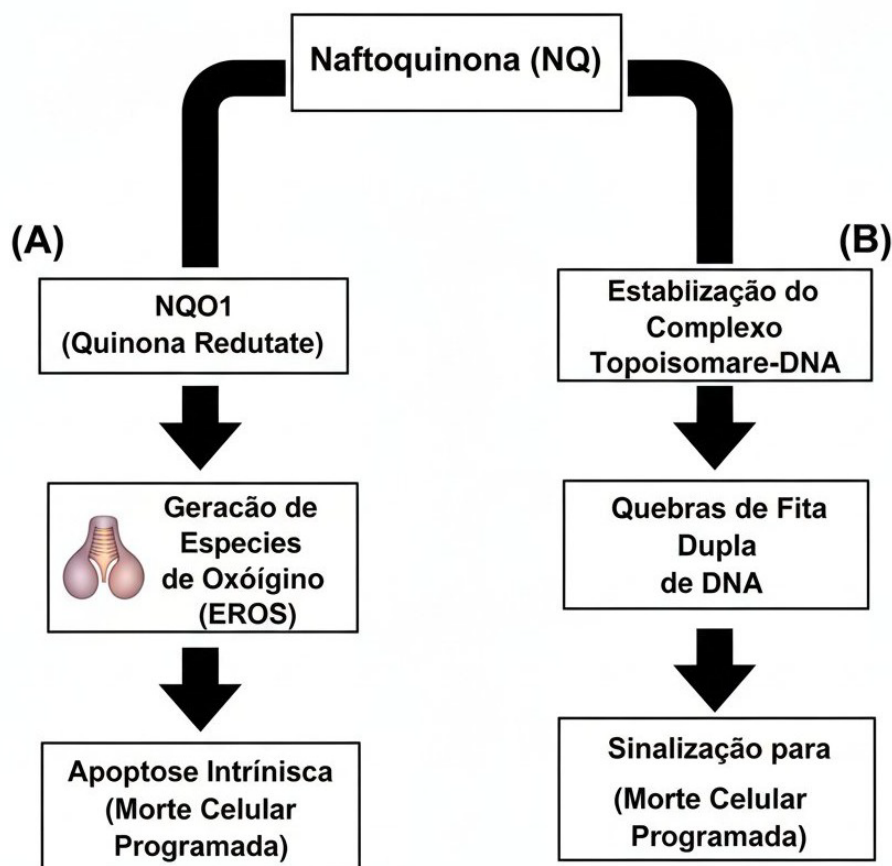
As naftoquinonas e seus derivados, como a β -lapachona, também são reconhecidos como venenos de topoisomerasas. Elas se interagem com o complexo covalente formado pelas enzimas Topoisomerase I e II e o DNA. Ao estabilizar este complexo de clivagem, as naftoquinonas impedem a religação das fitas de DNA, resultando em quebras de fita dupla. Esse dano genômico massivo, não reparável pela célula, é um potente sinal de indução de apoptose, crucial para combater linhagens tumorais com mecanismos de reparo hiperativos [24-25].

2.3 ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIPARASITÁRIA

Além da oncologia, o esqueleto quinônico demonstra potente ação contra agentes infecciosos (Figura 2). A atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiviral) e antiparasitária (antimalárica, antileishmania) das naftoquinonas são igualmente ligadas à sua capacidade de [26]:

- Inibir Enzimas Essenciais: Interromper vias metabólicas críticas do patógeno, como a síntese de ácidos nucleicos ou a respiração [26].
- Gerar EROs: O estresse oxidativo é altamente tóxico para parasitas e microrganismos. O Mebendazol, por exemplo, atua contra *Typanosoma cruzi* em parte através da indução de EROs mediada pelo anel quinônico [26].

Figura 2: Fluxograma detalhando a naftoquinona induzindo a morte celular por duas vias principais: (A) Geração de EROs via NQO1, levando à disfunção mitocondrial e apoptose intrínseca; (B) Estabilização do complexo Topoisomerase-DNA, resultando em quebras de fita dupla e sinalização para apoptose.



3 A BIOTECNOLOGIA COMO PILAR PARA A OTIMIZAÇÃO TERAPÊUTICA

Apesar de seu vasto potencial, as naftoquinonas enfrentam obstáculos no desenvolvimento farmacêutico, notadamente a baixa solubilidade aquosa, a instabilidade metabólica e a toxicidade não-seletiva em altas doses. A biotecnologia moderna oferece as ferramentas necessárias para contornar estas barreiras [27-28].

3.1 PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E ENGENHARIA METABÓLICA

A extração de naftoquinonas de fontes naturais é frequentemente insustentável e de baixo rendimento. A biotecnologia aborda esta limitação através de [29]:

- Culturas de Células Vegetais: O estabelecimento de culturas de células e órgãos em biorreatores permite a produção de metabólitos secundários em condições controladas e escaláveis [29].

- Engenharia Metabólica Microbiana: Esta técnica de biotecnologia moderna (ainda uma criança em termos de potencialidade, conforme a literatura) consiste na manipulação genética de microrganismos hospedeiros (como *Escherichia coli* ou leveduras) para que produzam as naftoquinonas de interesse. A inserção de vias biossintéticas completas permite o fornecimento de compostos puros, constantes e em larga escala [30-32].

3.2 DESIGN RACIONAL E BIOTRANSFORMAÇÃO

A química combinatória aliada ao rastreio de alto rendimento (HTS) e à modelagem *in silico* (QSAR) permite a rápida identificação de análogos otimizados de naftoquinonas. A biotransformação, por sua vez, utiliza enzimas específicas ou microrganismos para realizar modificações químicas precisas no esqueleto da naftoquinona (ex: hidroxilação ou glicosilação). Estas modificações são estratégicas para [33-35]:

- Aumentar drasticamente a solubilidade aquosa e, conseqüentemente, a biodisponibilidade.
- Aumentar a seletividade pelo alvo molecular, reduzindo a toxicidade.
- Melhorar a estabilidade do composto no ambiente biológico.

3.3 NANODIRECIONAMENTO E ENTREGA SELETIVA

A nanobiotecnologia é essencial para a translação clínica das naftoquinonas pouco solúveis. O encapsulamento em nanossistemas (nanopartículas lipídicas, micelas poliméricas ou lipossomas) permite [36-38]:

- Proteção: Blindagem contra a degradação metabólica.
- Direcionamento Passivo: O acúmulo preferencial no tecido tumoral, explorando o Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada (EPR). Essa abordagem localiza a ação citotóxica, minimizando a toxicidade sistêmica do composto.

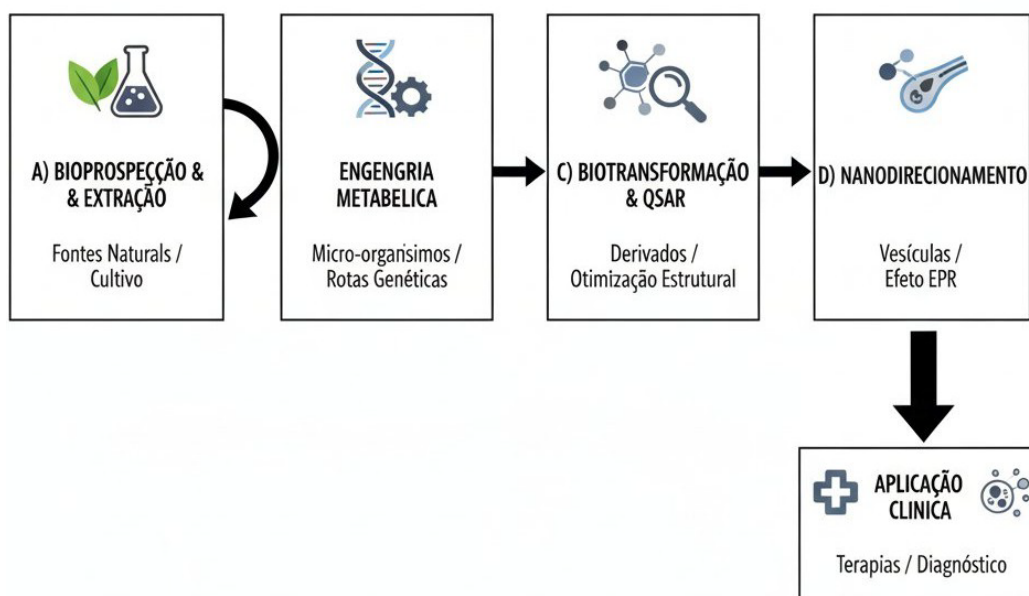
4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As naftoquinonas representam uma classe química de extrema relevância, com mecanismos de ação bem estabelecidos contra patógenos e células tumorais (Figura 3), principalmente através do desequilíbrio redox e da intervenção na integridade do DNA. No

entanto, sua plena realização terapêutica depende intrinsecamente do avanço das técnicas biotecnológicas.

A integração da engenharia metabólica para produção em escala e da nanotecnologia para entrega direcionada está superando as barreiras de solubilidade e toxicidade. O futuro da pesquisa em naftoquinonas focar-se-á na identificação de biomarcadores que prevejam a resposta terapêutica (principalmente em relação à expressão de NQO1) e no desenvolvimento de nanossistemas inteligentes, capazes de liberação controlada do fármaco. Tais esforços são cruciais para transformar esses promissores produtos naturais em agentes quimioterapêuticos clinicamente aprovados.

Figura 3: Diagrama ilustrativo do fluxo mostrando a integração das fases: (A) Bioprospecção/Extração; (B) Engenharia Metabólica para Produção Sustentável; (C) Biotransformação/QSAR para otimização; (D) Nanodirecionamento via Efeito EPR, culminando na Aplicação Clínica.



REFERÊNCIAS

- [1] ATANASOV, Atanas G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.
- [2] CONRADO, Gabrielly Galdino et al. Building natural product-based libraries for drug discovery: Challenges and opportunities from a Brazilian pharmaceutical industry perspective. *Revista brasileira de farmacognosia: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia*, v. 34, n. 4, p. 706–721, 2024.
- [3] DEHELEAN, Cristina Adriana et al. Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 26, n. 4, p. 1109, 2021.
- [4] GONZALEZ-PASTOR, Rebeca et al. Current landscape of methods to evaluate antimicrobial activity of natural extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 28, n. 3, p. 1068, 2023.
- [5] SINGH, Kuldeep et al. Natural products as drug leads: exploring their potential in drug discovery and development. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 398, n. 5, p. 4673–4687, 2025.
- [6] KLOTZ, Lars-Oliver; HOU, Xiaoqing; JACOB, Claus. 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 19, n. 9, p. 14902–14918, 2014.
- [7] MAJIENE, Daiva et al. Comparison of the effect of native 1,4-naphthoquinones plumbagin, menadione, and lawsone on viability, redox status, and mitochondrial functions of C6 glioblastoma cells. *Nutrients*, v. 11, n. 6, p. 1294, 2019.
- [8] PADHYE, Subhash et al. Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs: MEDICINAL PROPERTIES OF PLUMBAGIN. *Medicinal research reviews*, v. 32, n. 6, p. 1131–1158, 2012.
- [9] PINTO, Antônio Ventura; DE CASTRO, Solange Lisboa. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 14, n. 11, p. 4570–4590, 2009.
- [10] NAVARRO-TOVAR, Gabriela et al. The relevance and insights on 1,4-naphthoquinones as antimicrobial and antitumoral molecules: A systematic review. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, v. 16, n. 4, p. 496, 2023.
- [11] ORTIZ-PÉREZ, Eyra et al. Natural and synthetic naphthoquinones as potential anti-infective agents. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 21, n. 22, p. 2046–2069, 2021.
- [12] FUTURO, Débora O. et al. The antifungal activity of naphthoquinones: An integrative review. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 90, n. 1 Suppl 2, p. 1187–1214, 2018.
- [13] DEVI, Soibam Purnima et al. Carnivorous plants as a source of potent bioactive compound: Naphthoquinones. *Tropical Plant Biology*, v. 9, n. 4, p. 267–279, 2016.

- [14] SÁNCHEZ-CALVO, Juan M. et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of naphthoquinone derivatives: a structure–activity relationship study. *Medicinal Chemistry Research: An International Journal for Rapid Communications on Design and Mechanisms of Action of Biologically Active Agents*, v. 25, n. 6, p. 1274–1285, 2016.
- [15] DE SOUZA, Acácio S. et al. Menadione: a platform and a target to valuable compounds synthesis. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 18, p. 381–419, 2022.
- [16] MOHAMMED RAHMOUN, Nadjib et al. Antimicrobial activities of the henna extract and some synthetic naphthoquinones derivatives. *American journal of medical and biological research*, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2013.
- [17] PINTO, C. N. et al. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneimittel-Forschung*, v. 50, n. 12, p. 1120–1128, 2000.
- [18] SAGAR, Ram et al. Efficient synthesis of natural product inspired naphthoquinone-fused glycohybrids and their in silico docking studies. *Synthesis*, v. 56, n. 06, p. 989–998, 2024.
- [19] SHANG, Yu et al. Hydroxyl radical generation mechanism during the redox cycling process of 1,4-naphthoquinone. *Environmental science & technology*, v. 46, n. 5, p. 2935–2942, 2012.
- [20] PIDUGU, Lakshmi Swarna Mukhi et al. A direct interaction between NQO1 and a chemotherapeutic dimeric naphthoquinone. *BMC structural biology*, v. 16, n. 1, p. 1, 2016.
- [21] VERMA, Rajeshwar P. Anti-cancer activities of 1,4-naphthoquinones: a QSAR study. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, v. 6, n. 5, p. 489–499, 2006.
- [22] PARK, Wooram et al. Magneto mitochondrial dysfunction mediated cancer cell death using intracellular magnetic nano-transducers. *Biomaterials science*, v. 9, n. 16, p. 5497–5507, 2021.
- [23] SUMMERS, Daniel W.; DIANTONIO, Aaron; MILBRANDT, Jeffrey. Mitochondrial dysfunction induces Sarm1-dependent cell death in sensory neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 34, n. 28, p. 9338–9350, 2014.
- [24] KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives alpha-lapachone and beta-lapachone. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 47, n. 3, p. 187–198, 2001.
- [25] PARDEE, Arthur B.; LI, You Zhi; LI, Chiang J. Current cancer drug targets, v. 2, n. 3, p. 227–242, 2002.
- [26] KUBATA, Bruno Kilunga et al. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *The journal of experimental medicine*, v. 196, n. 9, p. 1241–1251, 2002.

- [27] KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNÁNDEZ-TREJO, N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 6, n. 1, p. 3–5, 2005.
- [28] RAWAT, Manju et al. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 29, n. 9, p. 1790–1798, 2006.
- [29] RUFFONI, Barbara et al. Plant cell cultures: bioreactors for industrial production. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 698, p. 203–221, 2010.
- [30] WU, Fengli et al. Expanding the repertoire of aromatic chemicals by microbial production: Microbial production of aromatic chemicals. *Journal of chemical technology and biotechnology (Oxford, Oxfordshire: 1986)*, v. 93, n. 10, p. 2804–2816, 2018.
- [31] LU, Mengyao; MOSLEH, Imann; ABBASPOURRAD, Alireza. Engineered microbial routes for human milk oligosaccharides synthesis. *ACS synthetic biology*, v. 10, n. 5, p. 923–938, 2021.
- [32] ZHANG, Zimeng et al. New aspects of microbial vitamin K2 production by expanding the product spectrum. *Microbial cell factories*, v. 20, n. 1, p. 84, 2021.
- [33] ATOMWISE AIMS PROGRAM. AI is a viable alternative to high throughput screening: a 318-target study. *Scientific reports*, v. 14, n. 1, p. 7526, 2024.
- [34] SHANU-WILSON, Julia et al. Biotransformation: Impact and application of metabolism in drug discovery. *ACS medicinal chemistry letters*, v. 11, n. 11, p. 2087–2107, 2020.
- [35] MELO-FILHO, Cleber Camilo; BRAGA, Rodolpho Campos; ANDRADE, Carolina Horta. 3D-QSAR approaches in drug design: perspectives to generate reliable CoMFA models. *Current computer-aided drug design*, v. 10, n. 2, p. 148–159, 2014.
- [36] DING, Shuaishuai et al. Harnessing hafnium-based nanomaterials for cancer diagnosis and therapy. *Small*, v. 19, n. 32, p. e2300341, 2023.
- [37] SINDHWANI, Shrey; CHAN, Warren C. W. Nanotechnology for modern medicine: next step towards clinical translation. *Journal of internal medicine*, v. 290, n. 3, p. 486–498, 2021.
- [38] LIU, Yifan et al. Advances in nanotechnology for enhancing the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs. *Drug design, development and therapy*, v. 18, p. 1469–1495, 2024.

INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA ACOMETIDA POR *Candida albicans*: BUSCA DE ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SEU TRATAMENTO

Luis Fernando Quejada Sanchez

Pós-graduação em ciências e biotecnologia, Universidade Federal Fluminense;
lufeke04@hotmail.com (L.F.Q)

RESUMO

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) ganharam grande relevância nas últimas décadas, pois estão associadas a altos níveis de mortalidade devido ao aumento de pacientes com algum tipo de imunossupressão. Adicionalmente, o uso extensivo de moléculas antifúngicas na agricultura e o aquecimento global têm influenciaram o aumento de casos de resistência às moléculas convencionais e o surgimento de cepas emergentes de difícil diagnóstico e tratamento. A IFI mais comum é a candidíase invasiva. *Candida albicans* continua sendo o agente etiológico mais prevalente graças a fatores de virulência, como o dimorfismo, que lhe conferem a capacidade de colonizar os tecidos do hospedeiro e causar infecção generalizada. Para o tratamento da candidíase invasiva, a seleção de antifúngicos concentra-se em três famílias: azóis, polienos e equinocandinas. Moléculas de última geração como anfotericina B lipossomal, posaconazol e caspofungina são caras e seu acesso é limitado. Portanto o fluconazol ainda é o antifúngico mais utilizado como primeira escolha no tratamento. No entanto, as taxas de resistência são frequentes. Na busca por terapias antifúngicas alternativas, os produtos naturais fitoterápicos e seus derivados têm ganhado grande interesse, contudo, seu mecanismo de ação antifúngico ainda deve ser explorado. No presente capítulo abordamos generalidades sobre a candidíase, seu tratamento e fitoterápicos com uso potencial para o tratamento da infecção fúngica.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza, a maioria deles vivem como saprófitos. Estudos moleculares indicam que existem mais de 1,5 milhões de espécies de fungos na natureza, das quais apenas 300 espécies têm a capacidade de infectar humanos (Blackwell, 2011; Garcia-Solache & Casadevall, 2010; Köhler et al., 2017). Portanto, podemos afirmar que os fungos raramente acometem humanos. Para isso, eles precisam atravessar as barreiras físicas como a pele e as mucosas, ter a capacidade de se adaptar à temperatura corporal, evadir o sistema imune e poder secretar fatores de virulência no interior do hospedeiro (Köhler et al., 2017). Geralmente, este cenário, acontece principalmente em indivíduos imunossuprimidos. Quando o fungo com potencial patogênico consegue entrar na corrente sanguínea, desencadeia um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão de quadros leves até invasivos, com potencial risco de óbito.

Anualmente, as infecções fúngicas invasivas (IFIs) são responsáveis pela internação de mais de um milhão de pacientes nos serviços de saúde em todo o mundo. Além disso,

IFIs estão associados a altas taxas de mortalidade oscilando entre 40-60% (Mane et al., 2016; Peng et al., 2012; Perlin et al., 2017; Robbins et al., 2016; Sanguinetti & Posteraro, 2015). Para o seu tratamento, existe uma gama reduzida de antifúngicos pertencentes a 3 famílias: (i) azóis, que bloqueiam a enzima lanosterol 14- α -demetilase, inibindo a síntese de ergosterol, (ii) polienos, que se ligam irreversivelmente ao ergosterol, formando poros na membrana celular e (iii) equinocandinas que bloqueiam a enzima β -(1,3)-D-glucana sintase causando uma ruptura da parede celular (Ferreira et al., 2017; Mesa-Arango et al., 2014; Pfaller et al., 2007).

Nas últimas duas décadas, o número de casos aumentou drasticamente, principalmente em pacientes imunossuprimidos devido a fatores predisponentes, como internação prolongada em UTI, cirurgias intra-abdominais, quadros avançados de HIV/AIDS, uso de dispositivos médicos para nutrição parenteral e o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro (Arendrup et al., 2011; Calabrese et al., 2013; Pfaller et al., 2007). Estas últimas, afetam a microbiota nativa do indivíduo causando o surgimento de patógenos oportunistas de origem endógena e exógena. Estima-se que o Brasil e a Colômbia têm a maior taxa de incidência de IFIs na América Latina, com uma taxa de 1,96 casos por 1.000 internações, acima das relatadas nos Estados Unidos, com 0,96 casos, e na Europa, com 0,38 casos por 1.000 internações (Nucci et al., 2013). *Candida albicans* continua sendo a espécie predominante, sendo isolada em 43,6% dos casos, seguida por *C. tropicalis* (23,4%), *C. parapsilosis* (13,9%), *C. glabrata* (9,5%), *C. guilliermondii* (3,6%), *C. krusei* (3,3%) e outros (2,7%) (Zuluaga Rodríguez et al., 2010). Ressalta-se que as espécies não-*albicans* representam mais do 50% dos isolamentos, constituindo um grave problema para a saúde pública. Diante desse cenário, é necessário identificar até nível de espécie os agentes etiológicos das candidíases e verificar os perfis de suscetibilidade desses isolamentos clínicos aos antifúngicos disponíveis, pois isso poderia otimizar a terapia antifúngica.

2 CANDIDEMIA E CANDIDÍASE

O gênero *Candida* spp compreende cerca de 150 espécies onde *Candida albicans* tem sido historicamente relatada como a espécie mais predominante em isolamentos clínicos de pacientes com micose invasiva, com uma taxa entre 45-65% (Antinori et al., 2016; Nucci et al., 2013). Nos Estados Unidos, a candidemia é considerada a quarta causa mais comum de doenças da corrente sanguínea adquiridas em hospitais (Sanguinetti & Posteraro, 2015; Williams & Lorenz, 2020)

A candidemia ocorre quando leveduras do gênero *Candida* entram na corrente sanguínea, de onde podem se espalhar para qualquer órgão, causando candidíase disseminada ou invasiva que muitas vezes leva a infecções abdominais e peritoneais, meningites e endocardites. A fonte de infecção pode ser endógena, da microbiota gastrointestinal, da colonização mucocutânea, e exógena, das mãos ou de objetos contaminados (Cortés et al., 2020; Paramythiotou et al., 2014). Os neutrófilos desempenham um papel importante na IFI, pois, diante de um aumento da carga fúngica ou ruptura tecidual, os neutrófilos são recrutados para esses locais de infecção para atacarem as leveduras por meio de diferentes mecanismos, como fagocitose, degranulação para liberação de mediadores tóxicos, produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), portanto, a neutropenia é um dos principais fatores predisponentes para o estabelecimento da candidíase invasiva (CI).

3 *Candida albicans*

C. albicans é encontrada como uma levedura comensal pertencente à microbiota das membranas mucosas, do trato gastrointestinal e do trato (Gonçalves et al., 2016; Köhler et al., 2017; Richardson et al., 2018). No entanto, diante uma queda na imunidade é ela pode proliferar e penetrar nos tecidos do hospedeiro, tornando-se um patógeno oportunista. *C. albicans* é capaz de causar infecções superficiais localizadas das membranas mucosas, como candidíase oral e candidíase vulvovaginal, que comumente progridem para formas recorrentes e crônicas (Gonçalves et al., 2016).

C. albicans possui múltiplos fatores de virulência: O dimorfismo, ou transição de levedura para hifa, é a propriedade mais importante para sua patogenicidade. Essa transição é favorecida por fatores externos como pH neutro, hipóxia e N-acetil-D-glucosamina (Honorato et al., 2022; Kim et al., 2019). Além disso, a secreção de enzimas extracelulares como fosfolipase e proteases aumentam sua capacidade para aderir-se ao epitélio, penetrar e colonizar nos tecidos do hospedeiro. A secreção da toxina candidalisina causa injúria tecidual severo, desencadeando uma resposta inflamatória que recruta as células fagocíticas (Moyes et al., 2016). Contudo, o conteúdo hidrófobo da membrana celular dá a propriedade de sobreviver à fagocitose promovendo o desenvolvimento de lesões crônicas nos tecidos (Van Ende et al., 2019).

4 ABORDAGENS BIOTECNOLÓGICAS

4.1 TRATAMENTOS BASEADOS EM PRODUTOS NATURAIS

O desenvolvimento de um agente antifúngico é um desafio porque há poucos alvos potenciais de ação que não sejam compartilhados pelo fungo e a espécie humana. O antifúngico ideal deve causar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ter baixo custo-benefício e mostrar uma viabilidade farmacocinética alta nos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (Ahn, 2017). Na busca por novos fármacos, as plantas constituem um grande recurso, pois estima-se que uma alta proporção da população mundial ainda utilize plantas ou seus derivados para o tratamento de doenças (Newman et al., 2015). No Brasil, é uma prática antiga introduzida desde os primórdios dos povos indígenas e africanos (Oliveira et al., 2009).

Os principais compostos bioativos são polifenóis, flavonoides triterpenos, fitoesteróis, terpenóides, polissacarídeos, capsaicinóides, carotenóides, tocoferóis, alcalóides e glucosinolatos (Câmara et al., 2021, Talero et al., 2015). A maioria destas moléculas agem como imunomoduladores na defesa contra infecções por *C. albicans*. Participando na modulação das vias inflamatórias e oxidativas e a capacidade de inibir a liberação de IL-6, TNF- α e outros fatores inflamatórios (Cardona et al., 2013, Michelle et al., 2017). Recentemente foi descrita a produção de ROS exacerbado e dano oxidativo como mecanismo de ação contra *C. albicans* em extratos ricos em flavonoides a partir de caju e manga e em derivados purificados da planta *Citrus grandis* e *Kalopanax pictus*. A tabela 1, mostra alguns extratos de plantas e derivados já testados *in-vitro* em *C. albicans*.

Tabela 1. Antecedentes sobre estudos da atividade antifúngica de extratos de planta.

Planta / Composto isolado	Parte	Solvente	MIC	Referência
<i>Anacardium occidentale</i>	Extrato de folhas	Hidroalcoólico	400 $\mu\text{g/mL}$	(Royo et al., 2015)
	Extrato de folhas	etanólico	62,5 $\mu\text{g/mL}$	(Quejada et al., 2024)
	Extrato de folhas	Metanólico	16 – 32 mg/mL	(Ayepola et al., 2009)
<i>Artemisia annua</i>	Partes aéreas	Etanólico	120 $\mu\text{g/mL}$	(Khatoon et al., 2019)
<i>Carica papaya</i>	Fruto	Metanólico	1 $\mu\text{g/mL}$	(Aljuhani et al., 2024)
	Óleo essencial do caroço	NA	4 - 16 $\mu\text{g/mL}$	(He et al., 2017)
<i>Eugenol</i>	Extraído do óleo essencial de canela (<i>Cinnamomum</i> sp.), cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>), manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>) e louro (<i>Laurus nobilis</i>)	NA	500 $\mu\text{g/mL}$	(Lone et al., 2020)
<i>Hydrastis canadensis</i>	Extrato de folhas	Metanólico	160 $\mu\text{g/mL}$ 40 $\mu\text{g/mL}$	(Kolaczowski et al., 2009)

<i>Kalopanaxsaponin A</i>	Saponina extraída de <i>Kalopanax pictus</i>	NA	16 µg/mL	(Li et al., 2020)
<i>Lycopene</i>	Carotenoide de <i>Citrus grandis</i> Obeck	NA	5 µg/mL	(Choi & Lee, 2015)
<i>Piper nigrum</i>	Extrato de fruto	Etanólico	2048 µg/mL	(Bravo-Chaucanés et al., 2022)

3.2 ESTUDOS DE ALVOS TERAPÊUTICOS USANDO CEPAS MUTANTES

Os estudos de genoma completo permitiram criar bases de dados com informação da função de genes essenciais e não essenciais no modelo de levedura em *S. cerevisiae* (Saccharomyces Genome database) e *C. albicans* (Candida Genome database). A partir dessas plataformas, na atualidade existem bibliotecas de cepas com deleção de genes disponíveis para o estudo de novos alvos terapêuticos. Esta ferramenta fornece informações abrangentes sobre a ontologia de genes e proteínas, o que possibilita ensaios de letalidade sintética e haploinsuficiência facilitando a pesquisa para a descoberta de novos alvos terapêuticos e novos fármacos antifúngicos (Robbins et al., 2016; Van den Broeck, 2015; Zimmermann et al., 2018). Para abordar a letalidade sintética, trata-se de testar um novo composto candidato. Este composto deve ser capaz de inibir o crescimento da levedura selvagem, no entanto, a traves da coleção de mutantes é possível observar leveduras modificadas que não foram mortas pelo composto. Desta maneira é possível observar fenótipos de suscetibilidade e resistência a um mesmo composto. Por exemplo, *C. albicans* usa bomba de efluxo para resistir à ação dos antifúngicos, usando mutantes incapazes de expressar os genes das bombas de efluxo é possível observar se o composto perde eficácia na cepa selvagem devido a este mecanismo (Yamawaki et al., 2019).

REFERÊNCIAS

- Ahn, K. (2017). The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Reports*, 50(3), 111–116. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.3.221>
- Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., & Corbellino, M. (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*, 34, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>
- Arendrup, M. C., Maiken, V. I. I., Arendrup, C., Fuursted, K., Gahrn-, B., Jensen, I. M., Knudsen, J. D., Schønheyder, H. C., Semi-, M. T., Maiken, V., Arendrup, C., Bruun, B., Christen-, J. J., Fuursted, K., Johansen, H. K., Kjældgaard, P., Knudsen, J. D., Kristensen, L., Møller, J., ... Echi-, D. S. P. (2011). Candida and Candidaemia Susceptibility and Epidemiology. 1–32.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438. <https://doi.org/https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- Calabrese, E. C., Castellano, S., Santoriello, M., Sgherri, C., Quartacci, M. F., Calucci, L., Warrilow, A. G. S., Lamb, D. C., Kelly, S. L., Milite, C., Granata, I., Sbardella, G., Stefancich, G., Maresca, B., & Porta, A. (2013). Antifungal activity of azole compounds CPA18 and CPA109 against azole-susceptible and -resistant strains of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), 1111–1119. <https://doi.org/10.1093/jac/dks506>
- Cortés, J. A., Ruiz, J. F., Melgarejo-Moreno, L. N., & Lemos, E. V. (2020). Candidemia in Colombia. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 40(1), 195–207. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4400>
- Ferreira, G. F., Baltazar, L. D. M., Ribeiro, J., Santos, A., Monteiro, A. S., Alves, L., Fraga, D. O., Resende-stoianoff, M. A., & Santos, D. A. (2017). The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. (April 2013), 1801–1811. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt114>
- Garcia-Solache, M. A., & Casadevall, A. (2010). Global Warming Will Bring New Fungal Diseases for Mammals. *MBio*, 1(1), 10.1128/mbio.00061-10. <https://doi.org/10.1128/mbio.00061-10>
- Gonçalves, B., Ferreira, C., Alves, C. T., Henriques, M., Azeredo, J., Silva, S., Gonçalves, B., Ferreira, C., Alves, C. T., Azeredo, J., & Silva, S. (2016). Critical Reviews in Microbiology Vulvovaginal candidiasis : Epidemiology , microbiology and risk factors. 7828(October). <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1091805>
- Honorato, L., de Araujo, J. F. D., Ellis, C. C., Piffer, A. C., Pereira, Y., Frases, S., de Sousa Araújo, G. R., Pontes, B., Mendes, M. T., Pereira, M. D., Guimarães, A. J., da Silva, N. M., Vargas, G., Joffe, L., Del Poeta, M., Nosanchuk, J. D., Zamith-Miranda, D., dos Reis, F. C. G., de Oliveira, H. C., ... Nimrichter, L. (2022). Extracellular Vesicles Regulate Biofilm Formation and Yeast-to-Hypha Differentiation in *Candida albicans*. *MBio*, 13(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00301-22>

- Kim, S. W., Joo, Y. J., Chun, Y. J., Park, Y. K., & Kim, J. (2019). Cross-talk between Tor1 and Sch9 regulates hyphae-specific genes or ribosomal protein genes in a mutually exclusive manner in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 112(3), 1041–1057. <https://doi.org/10.1111/mmi.14346>
- Köhler, J. R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A., & Perfect, J. R. (2017). Fungi that infect humans. *The Fungal Kingdom*, 813–843. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch39>
- Mane, A., Vidhate, P., Kusro, C., Waman, V., Saxena, V., Kulkarni-kale, U., & Risbud, A. (2016). Molecular mechanisms associated with Fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* isolates from India. 93–100. <https://doi.org/10.1111/myc.12439>
- Mesa-Arango, A. C., Trevijano-Contador, N., Román, E., Sánchez-Fresneda, R., Casas, C., Herrero, E., Argüelles, J. C., Pla, J., Cuenca-Estrella, M., & Zaragoza, O. (2014). The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11), 6627–6638. <https://doi.org/10.1128/AAC.03570-14>
- Moyes, D. L., Wilson, D., Jonathan, P., Höfs, S., Gratacap, R. L., Robbins, J., Runglall, M., Murciano, C., Blagojevic, M., Thavaraj, S., Förster, T. M., Hebecker, B., Kasper, L., Vizcay, G., Iancu, S. I., Kichik, N., Häder, A., Kurzai, O., Luo, T., ... Wheeler, R. T. (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. <https://doi.org/10.1038/nature17625>
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Kingston, D. G. I. (2015). Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures**Note: This chapter reflects the opinions of the authors, not necessarily those of the US Government. In *The Practice of Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417205-0.00005-5>
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I. N., Cortes, J., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Santolaya, M. E., Thompson, L., Sifuentes-Osornio, J., Echevarria, J. I., & Colombo, A. L. (2013). Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059373>
- Paramythiotou, E., Frantzeskaki, F., Flevari, A., Armaganidis, A., & Dimopoulos, G. (2014). Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(1), 1085–1119. <https://doi.org/10.3390/molecules19011085>
- Peng, Y., Dong, D., Jiang, C., Yu, B., Wang, X., & Ji, Y. (2012). Relationship between respiration deficiency and azole resistance in clinical *Candida glabrata*. 1, 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00821.x>
- Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), e383–e392. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X)
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Isolates, C., & Ic, F. (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis : a Persistent Public Health Problem GLOBAL TRENDS IN SPECIES DISTRIBUTION AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY AMONG. 20(1), 133–163. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>

Richardson, J. P., Moyes, D. L., Ho, J., & Naglik, J. R. (2018). *Candida* innate immunity at the mucosa. 1–13.

Robbins, N., Wright, G. D., & Cowen, L. E. (2016). Antifungal Drugs : The Current Armamentarium and Development of New Agents. 1–20.

Sanguinetti, M., & Posteraro, B. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/myc.12330>

Van Ende, M., Wijnants, S., & Van Dijck, P. (2019). Sugar sensing and signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00099>

Williams, R. B., & Lorenz, C. M. (2020). Multiple Alternative Carbon Pathways Combine To Promote *Candida albicans* Stress Resistance, Immune Interactions, and Virulence. *MBio*, 11(1), e03070-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03070-19>

Zuluaga Rodríguez, A., de Bedout Gómez, C., Agudelo Restrepo, C. A., Hurtado Parra, H., Arango Arteaga, M., Restrepo Moreno, Á., & González Marín, Á. (2010). Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001-2007). *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(3), 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.04.001>

ASPECTOS GERAIS DA DOR E INFLAMAÇÃO: BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS COM BIOTECNOLOGIA

Raíssa Maria dos Santos Galvão

Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia, Instituto de biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil.

Laboratório de Farmacologia Experimental (LEFEX), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

Dor e inflamação são fenômenos centrais na prática clínica e na pesquisa biomédica. Do ponto de vista biológico, elas funcionam como ferramentas vitais para a nossa sobrevivência: a dor atua como um alarme, sinalizando dano tecidual real ou potencial, enquanto a inflamação organiza a defesa e a reparação frente a agressões físicas, químicas ou infecciosas. Entretanto, quando esses processos se prolongam ou perdem o equilíbrio, deixam de ser protetores e passam a contribuir para a instalação de doenças crônicas, incapacidade funcional e importante perda de qualidade de vida [1].

A atual definição de dor, revisada pela *International Association for the Study of Pain* em 2020, descreve a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante à associada, a dano tecidual real ou potencial”. Essa definição destaca três elementos fundamentais: primeiro, que a dor é uma experiência sentida pelo indivíduo, não apenas um disparo elétrico nos nervos. Ela envolve também componentes emocionais e cognitivos. Além disso, reconhece que a dor pode existir mesmo na ausência de lesão evidente, desde que os circuitos que a geram estejam alterados. Isso abre caminho para a compreensão de síndromes dolorosas complexas e “invisíveis” ao exame físico tradicional [2,3].

Atualmente, a inflamação é hoje entendida não apenas como o clássico conjunto de sinais rubor, calor, tumor, dor e perda de função. Ela é vista como um conjunto de respostas celulares e moleculares extremamente organizado, que trabalha em total sintonia com o nosso sistema de defesa [4]. Nessa visão, a inflamação aguda bem resolvida é benéfica, mas a inflamação crônica, muitas vezes de baixo grau e persistente, está implicada em doenças reumatológicas, neurodegenerativas, metabólicas, psiquiátricas e em grande parte dos quadros de dor crônica [5].

Mesmo com tudo o que já descobrimos sobre como o sistema nervoso e o imunológico processam a dor, tratar síndromes crônicas na prática ainda é um grande

desafio. A dissociação frequente entre intensidade da dor e grau de lesão tecidual, bem como a participação de circuitos neurais e vias inflamatórias complexas, desafia modelos terapêuticos tradicionais [2,6]. Analgésicos convencionais, anti-inflamatórios e opioides continuam amplamente utilizados, mas apresentam eficácia variável e importantes riscos associados ao uso prolongado. Diante disso, torna-se imprescindível explorar estratégias terapêuticas fundamentadas em mecanismos moleculares específicos [7].

É dentro desse cenário que a biotecnologia se torna a base da inovação farmacêutica. Hoje, ela consegue unir ferramentas avançadas, como a edição de genes, o uso de anticorpos monoclonais e as ciências ômicas, para transformar a pesquisa de novas terapias. Ao somar a inteligência artificial à biologia sintética e aos modelos que imitam o corpo humano, os cientistas conseguem não apenas encontrar novos alvos, mas projetar fármacos de maneira muito mais estratégica e precisa [8,9].

2 CONCEITOS FUNDAMENTAIS DA DOR

2.1 NOCICEPÇÃO E EXPERIÊNCIA DOLOROSA

Entender a diferença entre nocicepção e dor é hoje um dos pontos fundamentais para quem estuda o tema. Embora no senso comum as pessoas tratem as duas como a mesma coisa, biologicamente elas ocupam papéis bem distintos. A nocicepção refere-se ao processamento neural de estímulos potencialmente lesivos por vias sensoriais especializadas. Já a dor corresponde à experiência perceptiva consciente que surge da integração desses sinais com redes corticais associadas a emoção, cognição e significado que damos ao que estamos sentindo [3,10].

A redefinição proposta pela IASP em 2020 consolidou essa distinção ao afirmar explicitamente que dor e nocicepção não são fenômenos equivalentes e que a dor não pode ser inferida exclusivamente a partir da atividade de neurônios sensoriais [3].

Do ponto de vista fisiológico, a nocicepção tem início na periferia, por meio da ativação de nociceptores, que são terminações nervosas livres sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, e envolve condução aferente até o corno dorsal da medula espinhal, seguida de projeções ascendentes do cérebro, como o tálamo e o córtex. Esse processo constitui a base neurobiológica do sinal nociceptivo. Entretanto, a experiência dolorosa propriamente dita surge apenas quando essas informações são integradas em redes cerebrais complexas, que envolvem a ínsula, córtex cingulado anterior, córtex pré-frontal e estruturas límbicas. É nessas áreas que o estímulo deixa de ser apenas um dado técnico e recebe uma carga emocional, contextual e motivacional do indivíduo [2].

Essa integração explica por que um mesmo estímulo nocivo pode ser percebido de maneira distinta entre indivíduos, ou até pelo mesmo indivíduo em contextos diferentes. Fatores como atenção, expectativa, aprendizagem prévia, estado emocional, estresse e contexto social influenciam a atividade das vias descendentes moduladoras da dor e alteram a percepção final do estímulo [11].

Além disso, em estados de dor persistente, alterações plásticas no sistema nervoso central podem manter a experiência dolorosa independentemente da presença contínua de dano tecidual periférico. Esse fenômeno, descrito como sensibilização central, constitui base fisiopatológica para síndromes dolorosas nas quais não há lesão detectável ao exame físico tradicional [12].

2.2 DOR AGUDA, DOR PERSISTENTE E DOR CRÔNICA

A dor pode ser conceitualmente subdividida em dor aguda e dor crônica com base em sua duração, mecanismos envolvidos e de como ela afeta o funcionamento do corpo. A dor aguda é uma resposta adaptativa imediata a uma agressão tecidual ou nociva, e geralmente está ligada a um dano físico que conseguimos identificar claramente. Sua função biológica é proteger o organismo, orientando comportamentos de evasão e facilitando a reparação tecidual. Por outro lado, a dor crônica é caracterizada por sua persistência por períodos prolongados, sendo definida tecnicamente por uma duração superior a três meses, e frequentemente persiste mesmo após a resolução da lesão inicial ou na ausência de dano tecidual contínuo aparente [13,14].

A transição da dor aguda para a dor crônica, não estamos falando apenas de um sintoma que durou mais tempo, mas um processo dinâmico que envolve alterações tanto periféricas quanto centrais. Mecanismos como sensibilização periférica, sensibilização central, plasticidade sináptica e disfunção dos sistemas moduladores de dor contribuem para essa cronificação. A sensibilização central, em particular, refere-se à amplificação da resposta neural dentro do sistema nervoso central, resultando em hipersensibilidade à dor (hiperalgesia) e em resposta dolorosa a estímulos normalmente não dolorosos (alodinia) [12,13]. Esse fenômeno pode ser observado em diversos estados de dor persistente em que não há uma lesão física visível ou ativa, como em síndromes dolorosas nociplásticas e muitas condições musculoesqueléticas crônicas [13].

Do ponto de vista clínico, o reconhecimento dessa transição exige uma mudança profunda na forma de diagnosticar e tratar o paciente. Enquanto na dor aguda o foco é resolver a lesão e a inflamação inicial, na dor crônica o objetivo é lidar com um sistema

nervoso que se remodelou de forma prejudicial, incluindo modulação dos mecanismos de sensibilização, oscilações emocionais e fatores cognitivos que influenciam o processamento da dor [15,16]. Além disso, fatores emocionais e cognitivos modulam de forma significativa o processamento da dor persistente, influenciando sua intensidade e manutenção [2,17]. Essa compreensão justifica a necessidade de intervenções que vão além das medidas centradas apenas na lesão, integrando abordagens farmacológicas, comportamentais e neuromoduladoras [7,13].

2.3 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA DOR

A dor é uma experiência complexa, mas para facilitar o entendimento, a medicina a organiza em três categorias principais com base em sua etiologia, fisiopatologia e padrões clínicos: nociceptiva, neuropática e nociplástica. Essa classificação, que integra critérios clínicos com os mecanismos biológicos, é fundamental para orientar tanto a compreensão científica quanto a abordagem terapêutica de diferentes síndromes dolorosas [18,19].

2.3.1 Dor nociceptiva

A dor nociceptiva é desencadeada pela ativação de nociceptores periféricos em resposta a estímulos que podem causar dano ou por uma inflamação em áreas como a pele, os músculos e os órgãos internos. Esses sinais são codificados por vias aferentes especializadas que sinalizam perigo ao sistema nervoso central. Esse tipo de dor geralmente é proporcional à intensidade do estímulo nocivo e tende a cessar com a resolução da lesão ou agressão inicial. Por isso, na prática clínica, ela é vista como aquela dor aguda, localizada e relacionada à função protetora do organismo frente ao dano tecidual [19].

2.3.2 Dor neuropática

Diferente da dor nociceptiva, que depende de estímulos periféricos de risco tecidual, a dor neuropática decorre de lesão ou disfunção no próprio sistema nervoso somatossensorial, podendo atingir tanto os nervos periféricos quanto o sistema central. Essa condição pode surgir por diversos motivos, como trauma nervoso, compressão, doenças metabólicas (como diabetes), infecções virais (como herpes zóster) ou até reações autoimunes. Esses eventos podem causar uma desordem na sinalização nervosa, gerando disparos anormais e tornando as vias de dor extremamente sensíveis. Clinicamente, é frequentemente descrita como dor em queimação, choque elétrico, formigamento ou dores que surgem espontaneamente em áreas ligadas a nervos específicos [19,20].

2.3.3 Dor nociplástica

A dor nociplástica representa uma categoria mais recente e mecanisticamente distinta. Ela serve para explicar aqueles casos em que o sistema de alerta do corpo sofre uma alteração funcional, mas não conseguimos encontrar uma lesão óbvia nos tecidos ou um dano real nos nervos. Em outras palavras, a dor ocorre apesar da ausência de estímulo nocivo contínuo ou de lesão nervosa, refletindo disfunção no processamento central de sinais sensoriais. Esse quadro reflete uma desregulação nos circuitos de dor, quase sempre ligada ao fenômeno da sensibilização central. Esse tipo de dor é frequentemente observado em pacientes com fibromialgia, síndrome de dor miofascial, cefaleias crônicas e dor lombar inespecífica, nas quais os pacientes costumam apresentar aquela dor espalhada pelo corpo e uma sensibilidade muito alta ao toque, sintomas típicos de um processamento sensorial que perdeu o equilíbrio [20,21].

2.3.4 Integração de mecanismos e relevância clínica

Na prática clínica, é fundamental entender que os três mecanismos de dor, raramente aparecem isolados. Na verdade, o que vemos com frequência são pacientes com quadros mistos, em que mecanismos nociceptivos, neuropáticos e nociplásticos coexistem ou se alternam para compor o nível de sofrimento da pessoa. Isso acontece muito em casos de dor crônica persistente, em que, por exemplo, uma lesão inicial pode desencadear sensibilização central mantida mesmo após a resolução do estímulo periférico. É por isso que olhar para a dor de forma ampla e entender como ela funciona mecanicamente é o que permite ao profissional escolher o caminho terapêutico correto, unindo medicamentos, técnicas de neuromodulação e o suporte de uma equipe multidisciplinar [20].

3 NEUROFISIOLOGIA DA NOCICEPÇÃO

3.1 TRANSDUÇÃO PERIFÉRICA

O processo da nocicepção tem início nas terminações nervosas dos neurônios sensoriais que se distribuem pela pele, músculos, articulações e vísceras. Esses nociceptores, são equipados com um conjunto altamente especializado de receptores e canais iônicos, capazes de detectar estímulos térmicos, mecânicos e químicos potencialmente lesivos. Entre eles destacam-se os canais da família TRP (como TRPV1, sensível ao calor e à capsaicina), canais sensíveis a prótons (ASICs), canais mecanossensíveis como Piezo1 e Piezo2, além dos receptores purinérgicos P2X ativados

por ATP extracelular e os receptores acoplados à proteína G, que respondem a mediadores inflamatórios como a bradicinina e as prostaglandinas [22,23].

Quando ocorre lesão tecidual, células danificadas liberam íons hidrogênio, ATP, potássio e mediadores inflamatórios que interagem com esses sensores moleculares, promovendo despolarização da membrana neuronal. Se o limiar é atingido, canais de sódio voltagem-dependentes (particularmente Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9) são ativados, iniciando o potencial de ação (Figura 1). Alterações funcionais nesses canais estão fortemente associadas a síndromes dolorosas humanas, mutações no gene SCN9A (que codifica Nav1.7) podem causar tanto insensibilidade congênita à dor quanto quadros de dor extrema, evidenciando seu papel crítico na excitabilidade nociceptiva [24].

2 CONDUÇÃO E ORGANIZAÇÃO DAS VIAS NOCICEPTIVAS

111

Ao chegarem à medula espinhal, especificamente nas lâminas I, II e V do corno dorsal, essas fibras liberam neurotransmissores como glutamato, substância P e CGRP. Essa liberação ativa receptores importantes nos neurônios de segunda ordem, como o AMPA e o NMDA, impulsionando o sinal para o cérebro. A partir daí, os sinais sobem pelos tratos espinotalâmicos e espinorreticulares até o tálamo, tronco encefálico e diversas regiões corticais, incluindo córtex somatossensorial, ínsula e córtex cingulado anterior, onde o cérebro termina de processar a experiência, dando à dor sua localização física, seu peso emocional e seu sentido cognitivo [16,26].

3.3 MODULAÇÃO DESCENDENTE

O sistema nervoso central não é um receptor passivo de sinais periféricos. Ele exerce um controle ativo por meio de várias vias que descem de regiões cerebrais específicas, como a substância cinzenta periaquedutal, o núcleo magno da rafe e a formação reticular, para ajustar como esses sinais são processados na medula. Esses sistemas utilizam neurotransmissores inibitórios como a serotonina, a noradrenalina, e os nossos próprios opioides endógenos para reduzir a excitabilidade de neurônios nociceptivos, exercendo função inibitória fisiológica [27]. Contudo, em condições de estresse crônico, depressão ou inflamação persistente, essas vias podem tornar-se disfuncionais, reduzindo a inibição e/ou aumentando a facilitação descendente. Isso contribui para o fenômeno de sensibilização central, em que o sistema nervoso passa a responder de forma exagerada a estímulos dolorosos e até a estímulos normalmente inócuos [15].

3.4 SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL E PLASTICIDADE SINÁPTICA

A sensibilização central funciona como uma espécie de reprogramação do sistema nervoso, onde os neurônios da medula e do cérebro se tornam excessivamente sensíveis de forma duradoura. A ativação sustentada de receptores NMDA por glutamato leva a influxo de cálcio e ativação de cascatas intracelulares que recrutam enzimas como CaMKII e ERK, modulam canais iônicos e promovem alterações de expressão gênica. Em termos funcionais, isso se traduz em amplificação da resposta a estímulos, as áreas de dor se espalham e os caminhos que transmitem o sofrimento ficam facilitados. Pesquisas recentes destacam que entender esses mecanismos é a chave para decifrar como a dor deixa de ser um alerta temporário e se transforma em uma condição crônica [93].

Além de neurônios, células gliais, especialmente micróglia e astrócitos, desempenham papel central nesse processo. Quando ativadas por lesão nervosa, infecção

ou inflamação sistêmica, essas células mudam de fenótipo e passam a expressar mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, além de liberarem moléculas moduladoras como o BDNF. Esses sinais gliais alteram o equilíbrio excitação/inibição nos circuitos espinhais, favorecendo a manutenção da dor crônica [28].

4 INFLAMAÇÃO E RESPOSTA IMUNE NA GÊNESE DA DOR

4.1 INFLAMAÇÃO AGUDA: RESPOSTA ADAPTATIVA

A inflamação aguda é desencadeada por agressões teciduais ou infecciosas e caracteriza-se por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos para o foco de lesão. Neutrófilos, monócitos/macrófagos e mastócitos liberam mediadores como prostaglandinas, leucotrienos, histamina, bradicinina, TNF- α , IL-1 β e IL-6. Esses mediadores não só coordenam a defesa contra patógenos, mas também sensibilizam nociceptores, diminuindo seu limiar de ativação. É o que explica, por exemplo, a hipersensibilidade dolorosa de um tecido inflamado [29,30].

Em condições fisiológicas, mecanismos pró-resolução, mediados por lipoxinas, resolvinas e maresinas, atuam para interromper a resposta inflamatória, promover a fagocitose de detritos celulares e restaurar a homeostase. Esse processo é comandado por um grupo especial de mediadores de gordura conhecidos como mediadores lipídicos pró-resolução ou specialized pro-resolving mediators (SPMs). Essas moléculas promovem a fagocitose de detritos, a remoção de células inflamatórias e o retorno à homeostase, sem simplesmente suprimir a resposta imune. Esse equilíbrio entre pró-inflamação e pró-resolução é essencial para que a dor inflamatória aguda seja transitória [31,32].

4.2 INFLAMAÇÃO CRÔNICA E DOR PERSISTENTE

A inflamação crônica se instala quando o corpo não consegue resolver a agressão inicial, seja porque o agente agressor continua presente, porque os mecanismos de limpeza e resolução falharam ou porque o próprio sistema imune perdeu o equilíbrio. Nessa fase, há predomínio de macrófagos, linfócitos T e B e formação de tecido de granulação. A produção contínua de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas contribui para um estado de inflamação de baixo ou alto grau, que pode perdurar por anos, como observado em doenças como artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais, lúpus e outras condições autoimunes e crônicas [29,33].

Do ponto de vista da dor, a inflamação crônica mantém a sensibilização periférica (por ação repetida de mediadores sobre nociceptores) e alimenta a sensibilização central,

já que sinais nociceptivos persistentes reforçam as alterações plásticas no sistema nervoso central. O que as pesquisas mais recentes têm destacado é que o problema vai mais além, pois a própria neuroinflamação, isto é, a resposta inflamatória dentro do próprio sistema nervoso, é um dos principais fatores na manutenção da dor crônica, combinando ativação de glia, infiltração de células imunes e alteração de barreiras hematoencefálicas [34].

Nesse cenário, a neuroinflamação mobiliza várias células, incluindo a micróglia, os astrócitos e as células endoteliais, que vão trabalhar em conjunto com o infiltrado imune para manter o sistema nervoso em alerta máximo. A alteração que essas células provocam na barreira hematoencefálica enchem o ambiente com citocinas produzidas localmente e o efeito disso, é um ajuste fino na excitabilidade neuronal, deixando os neurônios em um estado de prontidão exagerada que impede o sistema de desligar o sinal de dor, tornando o quadro persistente [35].

4.3 INTERFACE NEUROIMUNE: DIÁLOGO BIDIRECIONAL

Atualmente, a ciência enxerga a dor crônica como um fenômeno neuroimune. Neurônios sensoriais expressam receptores para citocinas e padrões moleculares associados a dano (DAMPs), enquanto células imunes e gliais expressam receptores para neuropeptídeos e neurotransmissores. Essa interação faz com que o sistema imune module a excitabilidade neuronal, e o sistema nervoso, por sua vez, regule funções imunes [36,37].

Esse eixo neuroimune foi detalhado em revisões recentes, que mostram como interações locais entre fibras nervosas, macrófagos, mastócitos e linfócitos podem determinar se um quadro de dor será autolimitado ou evoluirá para crônico [38,39]. Essas descobertas abriram novas frentes terapêuticas: interferir em receptores purinérgicos, em vias de TLRs ou em moléculas de adesão celular, por exemplo, pode modular simultaneamente inflamação e dor [36,37].

5 ABORDAGENS FARMACOLÓGICAS CONVENCIONAIS E SUAS LIMITAÇÕES

5.1 ANALGÉSICOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES (AINES)

Na prática clínica, os AINEs estão entre os medicamentos mais prescritos no manejo da dor aguda e inflamatória, tanto em contexto ambulatorial quanto hospitalar. Seu principal mecanismo de ação é a inibição das ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2), que são enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. A redução de prostaglandinas, em especial PGE₂, atenua a vasodilatação, o aumento de

permeabilidade vascular e a sensibilização de nociceptores, o que diminui clinicamente o edema e a sensação de dor [40,41].

No entanto, a inibição de COX-1, constitutiva, está associada a efeitos adversos gastrointestinais (gastrite, úlcera, sangramento) e renais, enquanto inibidores seletivos de COX-2, embora reduzam eventos gastrointestinais, podem aumentar o risco cardiovascular. Em contextos de uso crônico, como em doenças reumatológicas, essas limitações são particularmente relevantes [40].

Já a supressão seletiva de COX-2, embora tenham sido criados com a intenção de proteger a mucosa gástrica, o uso clínico mostrou-se associado a aumento do risco de problemas cardiovasculares maiores, como infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca, especialmente em doses elevadas e uso prolongado [42,43]. Meta-análises e revisões recentes reforçam que tanto AINEs tradicionais quanto inibidores seletivos de COX-2 podem aumentar o risco cardiovascular, o que exige uma avaliação individualizada de risco/benefício, sobretudo em pacientes com doença cardiovascular ou renal prévia [40,42].

Em contextos de uso crônico, como em doenças reumatológicas, essas limitações são particularmente relevantes. A necessidade de analgesia e controle inflamatório de longo prazo entra em tensão com o risco cumulativo de eventos gastrointestinais, renais e cardiovasculares, o que frequentemente obriga à redução de dose, rotatividade de fármacos ou associação com gastroprotetores, sem necessariamente resolver o problema de base [40,41].

5.2 OPIOIDES

Os opioides como morfina, oxicodona, fentanil, ainda são os recursos terapêuticos mais importantes da medicina para dor aguda intensa, pós-operatória, traumática e dor oncológica moderada a grave. Seu principal mecanismo de ação envolve a ativação de receptores μ -opioide em neurônios periféricos, espinhais e supramedulares, levando à inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios, como glutamato e substância P e hiperpolarização de neurônios nociceptivos [44]. Embora sejam extremamente eficazes no curto prazo, o uso prolongado de opioides está associado a uma série de problemas sérios como tolerância, dependência, constipação severa, depressão respiratória e risco de overdose. Adicionalmente, há evidências de que a exposição crônica a opioides pode levar a hiperalgesia induzida por opioides (opioid-induced hyperalgesia, OIH), em que a exposição prolongada pode paradoxalmente aumentar a sensibilidade à dor. A chamada

“crise dos opioides”, particularmente evidente em países de alta renda, deixa claro os limites de se basear o manejo da dor crônica em opioides sistêmicos [44–47].

5.3 CORTICOSTEROIDES E IMUNOSSUPRESSORES

Os corticosteroides sintéticos, como prednisona, metilprednisolona e dexametasona, mimetizam os efeitos dos glicocorticoides endógenos. Eles possuem a capacidade de assumir um amplo controle sobre a expressão de genes envolvidos em inflamação e resposta imune. Ao interagir com receptores glicocorticoides nucleares, esses fármacos modulam a transcrição de citocinas, moléculas de adesão, de enzimas pró-inflamatórias como a COX-2 e mediadores da resposta imune, produzindo potente efeito anti-inflamatório e imunossupressor [40,48].

Apesar da eficácia, o uso crônico de corticosteroides está associado a um amplo espectro de eventos adversos dependentes de dose e duração de tratamento, incluindo osteoporose e fraturas, ganho de peso, hipertensão, hiperglicemia e diabetes, supressão adrenal, maior suscetibilidade a infecções, catarata, glaucoma, alterações de humor e alterações cutâneas [48]. Estudos observacionais e revisões sistemáticas recentes reforçam que mesmo doses baixas por períodos prolongados podem resultar em complicações metabólicas e esqueléticas significativas, o que limita o emprego sustentado desses fármacos em doenças inflamatórias crônicas [49,50]

O uso de imunobiológicos e imunossupressores convencionais (como metotrexato, ciclosporina, anti-TNF) mudou completamente o cenário para quem convive com doenças inflamatórias, mas também exigem monitorização cuidadosa e não são desenhados especificamente para modular mecanismos finos da dor. Ensaios clínicos e diretrizes internacionais mostram que esses fármacos são capazes de alterar o curso da doença, reduzir dano estrutural articular e melhorar de forma substancial a função e a qualidade de vida [51,52].

No entanto, essas terapias também exigem monitorização cuidadosa de segurança, uma vez que podem aumentar o risco de infecções graves, reativação de tuberculose e hepatite B, eventos hematológicos e, em situações específicas, complicações cardiovasculares ou gastrointestinais [52]. Além disso, embora modulem de maneira eficaz vias inflamatórias centrais, muitos desses agentes não foram desenvolvidos primariamente para interferir de forma específica em mecanismos de transdução e modulação da dor, e sim na atividade global da doença [53].

Assim, o cenário atual aponta para uma necessidade clara de novas terapias com moléculas mais específicas, com perfis de segurança mais favoráveis, e que sejam capazes de interromper os mecanismos que sustentam a transição da dor aguda para a dor crônica, incluindo sensibilização periférica e central, neuroinflamação e disfunção das vias moduladoras descendentes. Esse contexto impulsiona o desenvolvimento de terapias alvo-dirigidas, anticorpos monoclonais, pequenas moléculas seletivas e abordagens baseadas em biotecnologia para dor e inflamação [53–55].

6 BIOTECNOLOGIA NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS PARA DOR E INFLAMAÇÃO

6.1 CIÊNCIAS ÔMICAS E MEDICINA DE PRECISÃO

O avanço das tecnologias conhecidas como “ômicas” (genômica, epigenômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica) permitiu mapear de forma muito clara redes de genes e proteínas envolvidas na nocicepção, neuroinflamação e inflamação sistêmica. Em dor crônica, estudos de transcriptômica de alto rendimento em gânglios da raiz dorsal, medula espinhal e estruturas corticais permitiu identificar assinaturas específicas associadas a diferentes síndromes dolorosas, incluindo dor neuropática, inflamatória e nociplástica (por exemplo, síndromes de dor musculoesquelética crônica) [19,56].

Análises de transcriptoma em nível de célula única e de núcleo único revelaram subpopulações de neurônios sensoriais com perfis moleculares distintos, distinguindo fibras nociceptivas específicas para estímulos térmicos, mecânicos ou químicos, bem como neurônios particularmente propensos à sensibilização em estados de dor persistente. Essas abordagens permitiram a consolidação do conceito de que “tipos de dor” podem corresponder a assinaturas moleculares específicas, o que abre espaço para classificações mecanísticas mais refinadas e para uma medicina personalizada, onde o tratamento é escolhido com base no perfil de expressão gênica de cada paciente [19,57].

Na prática de descoberta de fármacos, dados ômicos são utilizados para três frentes principais:

- Identificação de novos alvos terapêuticos – canais iônicos (por exemplo, Nav1.7–Nav1.9), receptores purinérgicos, moléculas da via inflamassoma e mediadores neuroimunes superexpressos em neurônios ou células gliais de indivíduos com dor crônica [19,58].

- Descoberta de biomarcadores – moléculas mensuráveis em sangue, líquido ou outros fluidos biológicos que permitam estratificar pacientes, prognosticar risco de cronificação ou prever resposta a terapias específicas [19].
- Apoio à medicina de precisão – integração de dados genômicos, transcriptômicos e clínicos para selecionar terapias com base no perfil molecular do paciente, em oposição a estratégias “tamanho único” que ignoram heterogeneidade biológica [56,59].

Revisões recentes em farmacologia da dor mostram que a combinação de abordagens ômicas com modelos experimentais mecanísticos vem acelerando a identificação de alvos e refinando a compreensão de como neuroinflamação, plasticidade sináptica e alterações de canais iônicos sustentam a dor crônica [19,56,59].

6.2 EDIÇÃO GÊNICA E CRISPR

A tecnologia CRISPR-Cas transformou a biologia experimental ao permitir a edição precisa de genes em células e organismos. Na pesquisa em dor, CRISPR tem sido utilizado para inativar genes específicos (como canais Nav, receptores de citocinas, receptores purinérgicos) em modelos animais, permitindo avaliar diretamente sua contribuição para a nocicepção e a dor crônica [58,60].

Mais recentemente, combinações de CRISPR com bibliotecas genéticas de larga escala viabilizam “screens” funcionais que avaliam, em paralelo, centenas ou milhares de genes quanto ao seu impacto em fenótipos relacionados à dor, inflamação e sobrevivência celular. Tais “screens” permitem priorizar alvos com base em evidências funcionais em modelos celulares e animais, antes de avançar para validação pré-clínica aprofundada [60,61].

No campo translacional, a aprovação de terapias baseadas em edição gênica para doenças como anemia falciforme, utilizando reativação de hemoglobina fetal via CRISPR, demonstra que essa tecnologia deixou de ser apenas experimental e entrou na clínica, estabelecendo um precedente para futuras aplicações em doenças inflamatórias e talvez, no futuro, em síndromes dolorosas genéticas. Em 2023, a *U.S. Food and Drug Administration* aprovou o uso clínico de exagamglogene autotemcel (Casgevy), primeira terapia baseada em CRISPR/Cas9 aprovada para tratar doença falciforme e beta-talassemia, demonstrando que a edição precisa de células-tronco hematopoéticas é viável e segura em humanos quando criteriosamente controlada [62,63].

6.3 BIOINFORMÁTICA E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL APLICADAS À DESCOBERTA DE FÁRMACOS

A descoberta tradicional de fármacos é um processo longo, caro e com alta taxa de fracasso. Em resposta, a ciência tem apostado cada vez mais no uso da bioinformática e na inteligência artificial (IA) em todas as etapas, desde a identificação de alvos até o desenho de moléculas e a análise de ensaios clínicos, vem crescendo exponencialmente. O diferencial vem do uso de ferramentas de aprendizado de máquina e deep learning que conseguem integrar e interpretar dados estruturais de proteínas, perfis de expressão gênica, resultados de triagens de compostos e informações clínicas, permitindo [64,65]:

- Priorizar alvos com base em múltiplas camadas de evidência;
- Realizar triagem virtual de bibliotecas imensas de moléculas, reduzindo o número de compostos que precisam ser testados em bancada;
- Prever propriedades farmacocinéticas, toxicidade e interações off-target;
- Apoiar o reposicionamento racional de fármacos para condições inflamatórias e dolorosas complexas [64,65]

Estudos recentes descrevem como IA vem sendo aplicada especificamente à descoberta de fármacos anti-inflamatórios, ao modelar vias como NF- κ B, JAK/STAT, COX-2 e IL-6, com potencial de identificar novos moduladores com melhor perfil de segurança [64,65]. Em paralelo, plataformas de IA começam a ser aplicadas ao campo da dor, integrando dados ômicos, clínicos e de neuroimagem para sugerir novos candidatos terapêuticos e subgrupos de pacientes com maior probabilidade de resposta [19,59].

6.4 ORGANOIDES, ÓRGÃOS-EM-CHIP E OUTROS MODELOS HUMANIZADOS

Um dos problemas mais comuns na criação de novos medicamentos é a dificuldade de traduzir o que vemos em testes com animais para o que realmente acontece no corpo humano. Para superar esse obstáculo, a biotecnologia vem desenvolvendo modelos complexos baseados em células humanas, como os organoides, tecidos bioimpressos e “órgãos-em-chip”. A grande vantagem desses sistemas é que eles mimetizam de forma mais fiel a fisiologia humana, permitindo testar fármacos em contextos que reproduzem melhor a microarquitetura de tecidos-alvo, por exemplo, microambiente extracelular e, em alguns casos, até o fluxo de fluidos e múltiplos tipos celulares [66,67].

Na área de dor e inflamação, já estamos vendo o uso prático de organoides neurais, culturas trilaminares (neurônios, astrócitos, micróglia) e modelos de sinoviócitos humanos sobre chips microfluídicos para estudar mecanismos de neuroinflamação, barreira hematoencefálica, toxicidade de fármacos e efeitos de novos candidatos analgésicos e anti-inflamatórios. Esses modelos humanizados têm se mostrado promissores para melhorar a predição de eficácia e segurança, reduzindo falhas nas etapas finais do desenvolvimento clínico [67,68].

Embora ainda coexistam com modelos animais, a tendência é de uso progressivamente maior de organoides e “órgãos-em-chip” como plataformas de triagem, especialmente em doenças neurodegenerativas, reumatológicas e intestinais inflamatórias, nas quais a interação entre células imunes, neurônios e células estruturais (como sinoviócitos ou enterócitos) é central para a gênese da dor crônica [66,69].

6.5 ANTICORPOS MONOCLONAIS E TERAPIAS BIOLÓGICAS

Os anticorpos monoclonais representam uma das classes de fármacos biotecnológicos de maior sucesso nas últimas décadas. Na interface entre dor e inflamação, destacam-se anticorpos anti-TNF, anti-IL-6 e anti-IL-17, amplamente utilizados em artrite reumatoide, espondiloartrites e doenças inflamatórias intestinais [59,70].

Embora sejam descritos principalmente como moduladores de atividade de doença, sua ação sobre citocinas-chave reduz dor articular e melhora função física, mostrando como a modulação imune pode ter efeito indireto, porém robusto, sobre a experiência dolorosa [70].

Mais recentemente, anticorpos dirigidos ao peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e ao seu receptor foram aprovados para prevenção de crises ocasionais de enxaqueca e crônica. Esses biológicos atuam diretamente em vias neurovasculares envolvidas na geração da crise, constituindo um exemplo claro de como o entendimento de mecanismos moleculares específicos pode resultar em terapias altamente direcionadas [71,72].

Ensaio clínico com anticorpos anti-NGF (fator de crescimento nervoso) mostraram potente efeito analgésico em dor osteoarticular, mas foram limitados por eventos adversos articulares graves em alguns pacientes, ilustrando que mesmo terapias “alvo-específicas” podem interagir com funções fisiológicas importantes [70,73].

6.6 TERAPIA GÊNICA E CELULAR EM CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS E DOLOROSAS

A terapia gênica busca introduzir, remover ou modular a expressão de genes terapêuticos em células do paciente, utilizando vetores virais (como AAV, lentivírus) ou sistemas de entrega não virais. Em modelos experimentais, estratégias de terapia gênica têm sido utilizadas para aumentar a expressão de moléculas anti-inflamatórias (como IL-10) ou de analgésicos endógenos, reduzir a expressão de receptores pró-nociceptivos ou canais iônicos envolvidos em sensibilização, ou ainda para modular vias de neuroinflamação por meio da regulação de mediadores como TNF- α ou IL- β [61,74].

Revisões recentes detalham o uso de ferramentas inovadoras, como oligonucleotídeos antisense, siRNA, e técnicas como a optogenética, quimiogenética e o CRISPR, todas direcionadas a neurônios sensoriais primários, células gliais ou condrócitos, visando a analgesia sustentada e mais específica. Os vetores AAV, em particular, têm se destacado como plataforma promissora para terapia gênica em dor, pela capacidade de transduzir neurônios e células não-neuronais com relativa segurança e duração prolongada de expressão [61,75].

Já no campo das terapias celulares, as atenções estão voltadas para o uso das células-tronco mesenquimais (MSCs) e suas vesículas extracelulares, que exibem propriedades imunomoduladoras e pro-regenerativas. Estudos pré-clínicos mostram que MSCs e seu secretoma conseguem aliviar a dor inflamatória, neuropática e relacionada ao câncer por meio da modulação de respostas imunes e da neuroinflamação [76–78]. No entanto, quando levamos esses achados para a prática clínica, especialmente em osteoartrite e outras doenças musculoesqueléticas, o cenário é mais complexo. Embora existam sinais de melhora modesta da dor e da função em alguns contextos, a ciência ainda lida com dados muito variados e resultados conflitantes sobre magnitude e durabilidade do efeito analgésico [79–81].

6.7 BIOLOGIA SINTÉTICA, VACINAS E NANOTECNOLOGIA

A biologia sintética combina princípios de engenharia com biologia para projetar circuitos genéticos e sistemas celulares com funções desejadas. Na área de fármacos, isso inclui a produção de moléculas terapêuticas por microrganismos geneticamente modificados, desenvolvimento de biossensores para detecção de mediadores inflamatórios e construção de sistemas de liberação inteligentes de drogas que respondem a pH, citocinas ou outros marcadores de inflamação [82,83].

As plataformas de vacinas de DNA e RNA, amplamente consagradas durante a pandemia de COVID-19, demonstraram que é possível desenhar rapidamente moléculas informacionais capazes de induzir respostas imunes específicas. Em teoria, abordagens semelhantes poderiam ser usadas para tumores, para modular respostas imunes em doenças inflamatórias crônicas, ou até para induzir tolerância a autoantígenos [84,85].

A nanotecnologia, por fim, traz um recurso inovador ao possibilitar que fármacos sejam encapsulados em nanopartículas, garantindo que cheguem com precisão aos tecidos que realmente precisam de tratamento. Nanocarregadores podem atravessar barreiras biológicas, o que permite reduzir a dose sistêmica necessária e minimizar efeitos adversos, além de permitir combinações de moléculas com diferentes mecanismos em um único sistema de entrega [86–88].

Avanços na nanomedicina têm viabilizado o desenvolvimento de sistemas baseados em nanomateriais para a liberação direcionada de anestésicos locais, AINEs e fitoterápicos em modelos de dor, com prolongamento significativo da analgesia e redução de neurotoxicidade e inflamação local [88–90]. Ao mesmo tempo, a convergência entre biologia sintética e nanomedicina vem gerando plataformas híbridas em que células ou vesículas derivadas de células são combinadas com materiais nanoestruturados para obter respostas mais precisas e adaptativas em doenças inflamatórias [91,92].

Embora muitas dessas abordagens ainda estejam predominantemente em estágios pré-clínicos, o conjunto de evidências aponta para um cenário em que biologia sintética, vacinas de nova geração e nanotecnologia tendem a se integrar à farmacoterapia da dor e da inflamação, seja como terapias autônomas, seja como plataformas de liberação para moléculas já conhecidas.

7 DESAFIOS E PERSPECTIVAS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Apesar dos grandes avanços em biotecnologia, criar novos medicamentos para a dor ainda é um grande desafio. Estudos recentes de patologia da dor e em transição da dor aguda para a crônica deixam claro que a dor persistente não é uma condição única, mas um mosaico de síndromes com origens muito diferentes, nas quais interagem variações genéticas e epigenéticas, remodelação neuroplástica, fatores psicossociais e comorbidades sistêmicas. Assim, um alvo molecular que se mostra promissor em determinado subgrupo de pacientes pode ser irrelevante em outro [19,93,94].

Além disso, muitos candidatos a fármacos falham em fases avançadas de ensaios clínicos por falta de eficácia ou segurança insuficiente, apesar de resultados pré-clínicos encorajadores. No campo da dor, temos exemplos importantes, como antagonistas de NK1 e moduladores de TRPV1, que exibiram resultados robustos em modelos animais, mas não se traduziram em benefício clínico significativo. Esses episódios evidenciam os limites dos modelos animais tradicionais e reforçam a importância de modelos humanizados e de estratégias de medicina de precisão [95–97].

Do ponto de vista ético e regulatório, as terapias gênicas e celulares, bem como intervenções baseadas em edição gênica, trazem desafios adicionais. Esses produtos exigem monitorização de longo prazo, particularmente em relação a efeitos tardios, genotoxicidade, alterações germinativas potenciais e impactos inesperados na saúde global do paciente. Paralelamente, surge um debate necessário sobre economia e bioética: o custo altíssimo dessas inovações pode aprofundar as desigualdades no acesso à saúde, tanto entre países quanto dentro de um mesmo sistema, colocando em tensão o potencial transformador dessas tecnologias e a capacidade real de incorporá-las de forma justa e duradoura [98,99].

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dor e inflamação deixaram de ser compreendidas como fenômenos simples, lineares, ou exclusivamente periféricos e passaram a ser compreendidas como expressões de redes neuroimunes complexas, sujeitas a modulação por fatores genéticos, epigenéticos, psicossociais e ambientais [19,93,94]. Essa mudança de paradigma tem consequências diretas para a farmacologia: analgésicos e anti-inflamatórios tradicionais continuam importantes, mas são claramente insuficientes para lidar com a carga global de dor crônica e doenças inflamatórias [59,95,100].

Ao unir campos tão distintos e avançados como a bioinformática, as terapias gênicas e a biologia sintética, a biotecnologia nos entrega hoje um conjunto de ferramentas sem igual para explorar novos alvos e estratégias terapêuticas. Ao mesmo tempo, esse avanço tecnológico impõe o desafio de traduzir descobertas sofisticadas em intervenções seguras, acessíveis e efetivas para populações diversas, evitando que terapias altamente inovadoras fiquem restritas a centros de saúde privilegiados, garantindo que o progresso científico se traduza em um benefício real para todos os pacientes [101–103].

Nesse contexto, o futuro da farmacologia da dor e da inflamação dependerá não apenas de avanços tecnológicos, mas também de escolhas regulatórias, políticas e éticas que favoreçam modelos de desenvolvimento mais transparentes, colaborativos e

inclusivos, de forma a garantir que os benefícios da biotecnologia cheguem de maneira equânime aos pacientes que mais deles necessitam.

REFERÊNCIAS

- [1] Saab, C.Y.; Waxman, S.G.; Hains, B.C. Alarm or Curse? The Pain of Neuroinflammation. *Brain Res. Rev.*, 2008, 58, 226–235.
- [2] Bushnell, M.C.; Ceko, M.; Low, L.A. Cognitive and Emotional Control of Pain and Its Disruption in Chronic Pain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2013, 14, 502–511.
- [3] Raja, S.N.; Carr, D.B.; Cohen, M.; Finnerup, N.B.; Flor, H.; Gibson, S.; Keefe, F.J.; Mogil, J.S.; Ringkamp, M.; Sluka, K.A.; Song, X.-J.; Stevens, B.; Sullivan, M.D.; Tutelman, P.R.; Ushida, T.; Vader, K. The Revised International Association for the Study of Pain Definition of Pain: Concepts, Challenges, and Compromises. *Pain*, 2020, 161, 1976–1982.
- [4] Xiao, T.S. Innate Immunity and Inflammation. *Cell. Mol. Immunol.*, 2017, 14, 1–3.
- [5] Schett, G.; Neurath, M.F. Resolution of Chronic Inflammatory Disease: Universal and Tissue-Specific Concepts. *Nat. Commun.*, 2018, 9, 3261.
- [6] Woolf, C.J. Central Sensitization: Implications for the Diagnosis and Treatment of Pain. *Pain*, 2011, 152, S2–S15.
- [7] Cohen, S.P.; Vase, L.; Hooten, W.M. Chronic Pain: An Update on Burden, Best Practices, and New Advances. *The Lancet*, 2021, 397, 2082–2097.
- [8] Doudna, J.A.; Charpentier, E. The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9. *Science (1979)*, 2014, 346.
- [9] Hasin, Y.; Seldin, M.; Lusis, A. Multi-Omics Approaches to Disease. *Genome Biol.*, 2017, 18, 83.
- [10] Mischkowski, D.; Palacios-Barrios, E.E.; Banker, L.; Dildine, T.C.; Atlas, L.Y. Pain or Nociception? Subjective Experience Mediates the Effects of Acute Noxious Heat on Autonomic Responses. *Pain*, 2018, 159, 699–711.
- [11] Wiech, K. Deconstructing the Sensation of Pain: The Influence of Cognitive Processes on Pain Perception. *Science (1979)*, 2016, 354, 584–587.
- [12] Volcheck, M.M.; Graham, S.M.; Fleming, K.C.; Mohabbat, A.B.; Luedtke, C.A. Central Sensitization, Chronic Pain, and Other Symptoms: Better Understanding, Better Management. *Cleve. Clin. J. Med.*, 2023, 90, 245–254.
- [13] Nijs, J.; Malfliet, A.; Nishigami, T. Nociceptive Pain and Central Sensitization in Patients with Chronic Pain Conditions: A Terminology Update for Clinicians. *Braz. J. Phys. Ther.*, 2023, 27, 100518.
- [14] Wadhwa, K.; Chauhan, P.; Singh, G.; Jha, S.K.; Almutary, A.G.; Jha, N.K. Decoding Chronic Pain: Insights into the Transition from Acute to Persistent Pain. *Open Biol.*, 2025, 15.
- [15] Price, T.J.; Basbaum, A.I.; Bresnahan, J.; Chambers, J.F.; De Koninck, Y.; Edwards, R.R.; Ji, R.-R.; Katz, J.; Kavelaars, A.; Levine, J.D.; Porter, L.; Schechter, N.; Sluka, K.A.;

Terman, G.W.; Wager, T.D.; Yaksh, T.L.; Dworkin, R.H. Transition to Chronic Pain: Opportunities for Novel Therapeutics. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2018, 19, 383–384.

[16] Kuner, R.; Flor, H. Structural Plasticity and Reorganisation in Chronic Pain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2017, 18, 20–30.

[17] Ashar, Y.K.; Gordon, A.; Schubiner, H.; Uipi, C.; Knight, K.; Anderson, Z.; Carlisle, J.; Polisky, L.; Geuter, S.; Flood, T.F.; Kragel, P.A.; Dimidjian, S.; Lumley, M.A.; Wager, T.D. Effect of Pain Reprocessing Therapy vs Placebo and Usual Care for Patients With Chronic Back Pain: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, 2022, 79, 13–23.

[18] Iasp Announces Revised Definition of Pain. International Association for the Study of Pain (IASP), 2020.

[19] Cao, B.; Xu, Q.; Shi, Y.; Zhao, R.; Li, H.; Zheng, J.; Liu, F.; Wan, Y.; Wei, B. Pathology of Pain and Its Implications for Therapeutic Interventions. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2024, 9, 155.

[20] Nijs, J.; De Baets, L.; Hodges, P. Phenotyping Nociceptive, Neuropathic, and Nociplastic Pain: Who, How, & Why? *Braz. J. Phys. Ther.*, 2023, 27, 100537.

[21] Kaplan, C.M.; Kelleher, E.; Irani, A.; Schrepf, A.; Clauw, D.J.; Harte, S.E. Deciphering Nociplastic Pain: Clinical Features, Risk Factors and Potential Mechanisms. *Nat. Rev. Neurol.*, 2024, 20, 347–363.

[22] Goudet, C.; Marchand, F. Editorial: Molecular Mechanisms of Nociception. *Front. Mol. Neurosci.*, 2022, 15.

[23] Murthy, S.E.; Loud, M.C.; Daou, I.; Marshall, K.L.; Schwaller, F.; Kühnemund, J.; Francisco, A.G.; Keenan, W.T.; Dubin, A.E.; Lewin, G.R.; Patapoutian, A. The Mechanosensitive Ion Channel Piezo2 Mediates Sensitivity to Mechanical Pain in Mice. *Sci. Transl. Med.*, 2018, 10.

[24] Bennett, D.L.; Clark, A.J.; Huang, J.; Waxman, S.G.; Dib-Hajj, S.D. The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol. Rev.*, 2019, 99, 1079–1151.

[25] Basbaum, A.I.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 2009, 139, 267–284.

[26] Tracey, I.; Mantyh, P.W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron*, 2007, 55, 377–391.

[27] Heinricher, M.M.; Tavares, I.; Leith, J.L.; Lumb, B.M. Descending Control of Nociception: Specificity, Recruitment and Plasticity. *Brain Res. Rev.*, 2009, 60, 214–225.

[28] Ji, R.-R.; Chamesian, A.; Zhang, Y.-Q. Pain Regulation by Non-Neuronal Cells and Inflammation. *Science*, 2016, 354, 572–577.

- [29] Abdulkhaleq, L.A.; Assi, M.A.; Abdullah, R.; Zamri-Saad, M.; Taufiq-Yap, Y.H.; Hezmee, M.N.M. The Crucial Roles of Inflammatory Mediators in Inflammation: A Review. *Vet. World*, 2018, 11, 627–635.
- [30] Poluha, R.L.; Grossmann, E. Inflammatory Mediators Related to Arthrogenic Temporomandibular Dysfunctions. *Brazilian Journal Of Pain*, 2018, 1.
- [31] Serhan, C.N.; Levy, B.D. Resolvins in Inflammation: Emergence of the pro-Resolving Superfamily of Mediators. *Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128, 2657–2669.
- [32] Zhang, Q.; Wang, Y.; Zhu, J.; Zou, M.; Zhang, Y.; Wu, H.; Jin, T. Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators: A Key Player in Resolving Inflammation in Autoimmune Diseases. *Sci. Bull. (Beijing)*, 2025, 70, 778–794.
- [33] Calhelha, R.C.; Haddad, H.; Ribeiro, L.; Heleno, S.A.; Carocho, M.; Barros, L. Inflammation: What's There and What's New? *Applied Sciences*, 2023, 13, 2312.
- [34] Echeverria-Villalobos, M.; Tortorici, V.; Brito, B.E.; Ryskamp, D.; Uribe, A.; Weaver, T. The Role of Neuroinflammation in the Transition of Acute to Chronic Pain and the Opioid-Induced Hyperalgesia and Tolerance. *Front. Pharmacol.*, 2023, 14.
- [35] García-Domínguez, M. Neuroinflammation: Mechanisms, Dual Roles, and Therapeutic Strategies in Neurological Disorders. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2025, 47, 417.
- [36] Pinho-Ribeiro, F.A.; Verri, W.A.; Chiu, I.M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol.*, 2017, 38, 5–19.
- [37] Su, P.-Y.P.; Zhang, L.; He, L.; Zhao, N.; Guan, Z. The Role of Neuro-Immune Interactions in Chronic Pain: Implications for Clinical Practice. *J. Pain Res.*, 2022, Volume 15, 2223–2248.
- [38] Feenstra, R.A.; den Dunnen, W.F.A.; Laman, J.D. The Neuroimmune Axis and Chronic Pain Disorders. *iScience*, 2026, 29, 114250.
- [39] Jain, A.; Gyori, B.M.; Hakim, S.; Jain, A.; Sun, L.; Petrova, V.; Bhuiyan, S.A.; Zhen, S.; Wang, Q.; Kawaguchi, R.; Bunga, S.; Taub, D.G.; Ruiz-Cantero, M.C.; Tong-Li, C.; Andrews, N.; Kotoda, M.; Renthal, W.; Sorger, P.K.; Woolf, C.J. Nociceptor-Immune Interactomes Reveal Insult-Specific Immune Signatures of Pain. *Nat. Immunol.*, 2024, 25, 1296–1305.
- [40] Ahmadi, M.; Bekeschus, S.; Weltmann, K.-D.; von Woedtke, T.; Wende, K. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Recent Advances in the Use of Synthetic COX-2 Inhibitors. *RSC Med. Chem.*, 2022, 13, 471–496.
- [41] Khalil, N.A.; Ahmed, E.M.; Tharwat, T.; Mahmoud, Z. NSAIDs between Past and Present; a Long Journey towards an Ideal COX-2 Inhibitor Lead. *RSC Adv.*, 2024, 14, 30647–30661.

- [42] Bally, M.; Dendukuri, N.; Rich, B.; Nadeau, L.; Helin-Salmivaara, A.; Garbe, E.; Brophy, J.M. Risk of Acute Myocardial Infarction with NSAIDs in Real World Use: Bayesian Meta-Analysis of Individual Patient Data. *BMJ*, 2017, j1909.
- [43] Braun, J.; Baraliakos, X.; Westhoff, T. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cardiovascular Risk – a Matter of Indication. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2020, 50, 285–288.
- [44] Volkow, N.D.; Blanco, C. The Changing Opioid Crisis: Development, Challenges and Opportunities. *Mol. Psychiatry*, 2021, 26, 218–233.
- [45] Nadeau, S.E.; Wu, J.K.; Lawhern, R.A. Opioids and Chronic Pain: An Analytic Review of the Clinical Evidence. *Frontiers in Pain Research*, 2021, 2.
- [46] Higgins, C.; Smith, B.H.; Matthews, K. Evidence of Opioid-Induced Hyperalgesia in Clinical Populations after Chronic Opioid Exposure: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Br. J. Anaesth.*, 2019, 122, e114–e126.
- [47] Lee, M.; Silverman, S.M.; Hansen, H.; Patel, V.B.; Manchikanti, L. A Comprehensive Review of Opioid-Induced Hyperalgesia. *Pain Physician*, 2011, 14, 145–161.
- [48] Yasir, M.; Goyal, A.; Sonthalia, S. Corticosteroid Adverse Effects; 2025.
- [49] Sagara, M.; Majjad, A.; Toufik, H.; Ahmed, B. Impact of Long-Term Glucocorticoid Therapy on the Response to Biologic Agents in Rheumatoid Arthritis: A Prospective Observational Study. *Cureus*, 2025, 17, e98824.
- [50] Volmer, T.; Effenberger, T.; Trautner, C.; Buhl, R. Consequences of Long-Term Oral Corticosteroid Therapy and Its Side-Effects in Severe Asthma in Adults: A Focused Review of the Impact Data in the Literature. *European Respiratory Journal*, 2018, 52, 1800703.
- [51] Favalli, E.G.; Biggioggero, M.; Meroni, P.L. Methotrexate for the Treatment of Rheumatoid Arthritis in the Biologic Era: Still an “Anchor” Drug? *Autoimmun. Rev.*, 2014, 13, 1102–1108.
- [52] Findeisen, K.E.; Sewell, J.; Ostor, A.J.K. Biological Therapies for Rheumatoid Arthritis: An Overview for the Clinician. *Biologics*, 2021, 15, 343–352.
- [53] Li, Z.; Li, X.; Liu, J.; Sun, R.; Ye, Y.; Xiang, H.; Luo, F.; Li, S.; Luo, A. Molecular Mechanisms of Chronic Pain and Therapeutic Interventions. *MedComm (Beijing)*, 2025, 6, e70325.
- [54] Alessi, I.; Banton, K.L.; J, S.; C, Z.; CH, P.; RJ, R.; D, B.-O. Exploring Novel Non-Opioid Pathways and Therapeutics for Pain Modulation. *Mol. Pain*, 2025, 21.
- [55] Martins, Y.C.; De-Sousa, L.P.; Murin, P.J.; Sadeghipour, H.; Daniel-Ribeiro, C.T. Possible Anti-Pain Vaccines: A Narrative Review of Emerging Strategies and Clinical Prospects. *Vaccines (Basel)*, 2025, 13, 909.
- [56] Diatchenko, L.; Parisien, M.; Jahangiri Esfahani, S.; Mogil, J.S. Omics Approaches to Discover Pathophysiological Pathways Contributing to Human Pain. *Pain*, 2022, 163, S69–S78.

- [57] Hall, B.; Cook, L.; Yun, S.; Kulkarni, A.B. Human Pain Transcriptomics: Lessons Learned so Far. *Pain Rep.*, 2026, 11.
- [58] Dormer, A.; Narayanan, M.; Schentag, J.; Achinko, D.; Norman, E.; Kerrigan, J.; Jay, G.; Heydorn, W. A Review of the Therapeutic Targeting of SCN9A and Nav1.7 for Pain Relief in Current Human Clinical Trials. *J. Pain Res.*, 2023, Volume 16, 1487–1498.
- [59] Asiri, Y.I.; Moni, S.S.; Ramar, M.; Chidambaram, K. Advancing Pain Understanding and Drug Discovery: Insights from Preclinical Models and Recent Research Findings. *Pharmaceuticals*, 2024, 17, 1439.
- [60] Kang, C.Y.; Been, K.W.; Kang, M.-H.; Choi, M.S.; Kang, R.H.; Hur, J.W.; Hur, J.K. Advances in Therapeutic Applications of CRISPR Genome Editing for Spinal Pain Management. *Neurospine*, 2025, 22, 421–440.
- [61] Li, Y.; Ji, R.-R. Gene Therapy for Chronic Pain Management. *Cell Rep. Med.*, 2024, 5, 101756.
- [62] Singh, A.; Irfan, H.; Fatima, E.; Nazir, Z.; Verma, A.; Akilimali, A. Revolutionary Breakthrough: FDA Approves CASGEVY, the First CRISPR/Cas9 Gene Therapy for Sickle Cell Disease. *Annals of Medicine & Surgery*, 2024, 86, 4555–4559.
- [63] Parums, D. V. Editorial: First Regulatory Approvals for CRISPR-Cas9 Therapeutic Gene Editing for Sickle Cell Disease and Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *Medical Science Monitor*, 2024, 30.
- [64] Paithankar, V.; Devnani, D.; Nimburkar, T.A. A Review Article on “AI-Guided Discovery of Novel Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy: A New Era in Drug Development.” *Intelligent Hospital*, 2025, 1, 100007.
- [65] Pawar, B.; Bachhav, R.; Damale, M.; Patil, P.; Bachkar, S. Artificial Intelligence in Anti-Inflammatory Drug Discovery. *International Journal of Scientific Research and Technology*, 2026, 03.
- [66] Zhou, L.; Huang, J.; Li, C.; Gu, Q.; Li, G.; Li, Z.A.; Xu, J.; Zhou, J.; Tuan, R.S. Organoids and Organs-on-Chips: Recent Advances, Applications in Drug Development, and Regulatory Challenges. *Med*, 2025, 6, 100667.
- [67] Wang, H.; Ning, X.; Zhao, F.; Zhao, H.; Li, D. Human Organoids-on-Chips for Biomedical Research and Applications. *Theranostics*, 2024, 14, 788–818.
- [68] Khosrowshahi, D.; Lagae, L.; Bolander, J. Decoding Pain: Next-Generation In Vitro Systems for Mechanistic Insights and Drug Discovery. *The FASEB Journal*, 2025, 39.
- [69] Sakthivel, V.; Dharshan, S.S.; Namasivayam, S.K.R.; Arockiaraj, J. Advances in 3D Organoids and Organ-on-a-Chip Systems for Biomedical Research. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2026, 114.

- [70] Sánchez-Robles, E.M.; Girón, R.; Paniagua, N.; Rodríguez-Rivera, C.; Pascual, D.; Goicoechea, C. Monoclonal Antibodies for Chronic Pain Treatment: Present and Future. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 10325.
- [71] Muddam, M.R.; Obajeun, O.A.; Abaza, A.; Jaramillo, A.P.; Sid Idris, F.; Anis Shaikh, H.; Vahora, I.; Moparthi, K.P.; Al Rushaidi, M.T.; Nath, T.S. Efficacy and Safety of Anti-Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Monoclonal Antibodies in Preventing Migraines: A Systematic Review. *Cureus*, 2023.
- [72] Bonura, A.; Brunelli, N.; Marcosano, M.; Iaccarino, G.; Fofi, L.; Vernieri, F.; Altamura, C. Calcitonin Gene-Related Peptide Systemic Effects: Embracing the Complexity of Its Biological Roles—A Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24, 13979.
- [73] Jaffal, S.; Khalil, R. Targeting Nerve Growth Factor for Pain Relief: Pros and Cons. *Korean J. Pain*, 2024, 37, 288–298.
- [74] Kanao-Kanda, M.; Kanda, H.; Liu, S.; Kawamata, T.; Candiotti, K.A.; Hao, S. Viral Vector-Mediated Interleukin 10 for Gene Therapy on Chronic Pain. *Mol. Pain*, 2025, 21.
- [75] Nassini, R.; Chieca, M.; Marini, M.; Landini, L.; De Logu, F. AAV Vectors: An Emerging Strategy for Chronic Pain Management. *Trends Mol. Med.*, 2026, 32, 65–83.
- [76] Sarsenova, M.; Kim, Y.; Raziyeva, K.; Kazybay, B.; Ogay, V.; Saparov, A. Recent Advances to Enhance the Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Front. Immunol.*, 2022, 13.
- [77] Zhou, J.; Shi, Y. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Origin, Immune Regulation, and Clinical Applications. *Cell. Mol. Immunol.*, 2023, 20, 555–557.
- [78] Khan, S.A.; Gangadaran, P.; Tiwari, P.; Rajendran, R.L.; Jamal, A.; Hattiwale, S.H.; Anand, K.; Jha, S.K.; Hong, C.M.; Ahn, B.-C.; Parvez, S. Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Pain Management: A Narrative Review of Emerging Evidence and Future Directions. *World J. Stem Cells*, 2026, 18.
- [79] Sadeghirad, B.; Rehman, Y.; Khosravirad, A.; Sofi-Mahmudi, A.; Zandieh, S.; Jomy, J.; Patel, M.; Couban, R.J.; Momenilandi, F.; Burnham, R.; Poolman, R.W.; Busse, J.W. Mesenchymal Stem Cells for Chronic Knee Pain Secondary to Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *Osteoarthritis Cartilage*, 2024, 32, 1207–1219.
- [80] Tabet, C.G.; Pacheco, R.L.; Martimbianco, A.L.C.; Riera, R.; Hernandez, A.J.; Bueno, D.F.; Fernandes, T.L. Advanced Therapy with Mesenchymal Stromal Cells for Knee Osteoarthritis: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Orthop. Translat.*, 2024, 48, 176–189.
- [81] Cao, M.; Ou, Z.; Sheng, R.; Wang, Q.; Chen, X.; Zhang, C.; Dai, G.; Wang, H.; Li, J.; Zhang, X.; Gao, Y.; Shi, L.; Rui, Y. Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cells in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Stem Cell Res. Ther.*, 2025, 16, 122.

- [82] Yan, X.; Liu, X.; Zhao, C.; Chen, G.-Q. Applications of Synthetic Biology in Medical and Pharmaceutical Fields. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2023, 8, 199.
- [83] Yi, W.; Hu, S.; Qian, X.; Yan, W.; Li, Y. Synthetic Biology-Based Engineering Cells for Drug Delivery. *Exploration*, 2025, 5.
- [84] Park, J.K.; Lee, E.B.; Winthrop, K.L. What Rheumatologists Need to Know about mRNA Vaccines: Current Status and Future of mRNA Vaccines in Autoimmune Inflammatory Rheumatic Diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, 2024, 83, 687–695.
- [85] Li, J.; Liu, Y.; Dai, J.; Yang, L.; Xiong, F.; Xia, J.; Jin, J.; Wu, Y.; Peng, X. mRNA Vaccines: Current Applications and Future Directions. *MedComm (Beijing)*, 2025, 6.
- [86] Li, N.; Wang, M.; Lyu, Z.; Shan, K.; Chen, Z.; Chen, B.; Chen, Y.; Hu, X.; Dou, B.; Zhang, J.; Wang, L.; Zhao, T.; Li, H. Medicinal Plant-Based Drug Delivery System for Inflammatory Bowel Disease. *Front. Pharmacol.*, 2023, 14.
- [87] Min, K.; Sahu, A.; Jeon, S.H.; Tae, G. Emerging Drug Delivery Systems with Traditional Routes – A Roadmap to Chronic Inflammatory Diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2023, 203, 115119.
- [88] Xu, Y.; Dong, X.; Xu, H.; Jiao, P.; Zhao, L.-X.; Su, G. Nanomaterial-Based Drug Delivery Systems for Pain Treatment and Relief: From the Delivery of a Single Drug to Co-Delivery of Multiple Therapeutics. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 2309.
- [89] Conte, R.; Marturano, V.; Peluso, G.; Calarco, A.; Cerruti, P. Recent Advances in Nanoparticle-Mediated Delivery of Anti-Inflammatory Phytocompounds. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18, 709.
- [90] Qiao, B.; Yao, J.; Fan, Y.; Zhang, N.; Feng, M.; Zhao, J.; Song, X.; Luan, Y.; Zhuang, B.; Zhang, N.; Xie, X.; Xu, M. Intrinsic Anti-Inflammatory Nanomedicines for Enhanced Pain Management. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2024, 12.
- [91] Song, J.; Wang, T.; Zhang, K.; Zhu, P.; Yu, Y.; Li, T.; Gong, D.; Zha, L.; Ma, Y. Natural Products-Integrated Drug Delivery Systems as Innovative Therapeutic Strategies for Inflammatory Bowel Disease Management. *Nano Res.*, 2025, 18, 94908007.
- [92] Cai, Q.; Guo, R.; Chen, D.; Deng, Z.; Gao, J. SynBioNanoDesign: Pioneering Targeted Drug Delivery with Engineered Nanomaterials. *J. Nanobiotechnology*, 2025, 23, 178.
- [93] Zhang, S.; Ning, Y.; Yang, Y.; Mu, G.; Yang, Y.; Ren, C.; Liao, C.; Ou, C.; Zhang, Y. Decoding Pain Chronification: Mechanisms of the Acute-to-Chronic Transition. *Front. Mol. Neurosci.*, 2025, 18.
- [94] Azeez, O.M.; Olaniyi, H.; Obong, E.; Dunkwu, C.C.; Oyovwi, J.O.; Oyovwi, M.I.; Markus, S.N.; Okafor, C.P.; Adedokun, O.K.; Olaniyi, A.O. Epigenetic and Endocrine Adaptations Linking Chronic Pain, Metabolic Dysregulation, and Cardiovascular Remodeling: A Narrative Review. *Cureus*, 2026, 18, e100757.

- [95] Karimi, S.A.; Zahra, F.T.; Martin, L.J. IUPHAR Review: Navigating the Role of Preclinical Models in Pain Research. *Pharmacol. Res.*, 2024, 200, 107073.
- [96] Tappe-Theodor, A.; Martin, T.J.; Negus, S.S. Editorial: Preclinical Animal Models and Measures of Pain: Improving Predictive Validity for Analgesic Drug Development - Volume II. *Frontiers in Pain Research*, 2025, 5.
- [97] Sun, D.; Gao, W.; Hu, H.; Zhou, S. Why 90% of Clinical Drug Development Fails and How to Improve It? *Acta Pharm. Sin. B*, 2022, 12, 3049–3062.
- [98] Maryamchik, E.; Ikonomidou, L.; Roxland, B.E.; Grignon, F.; Levine, B.L.; Grilley, B.J. International Society for Cell & Gene Therapy Expanded Access Working Group Position Paper: Key Considerations to Support Equitable and Ethical Expanded Access to Investigational Cell- and Gene-Based Interventions. *Cytotherapy*, 2025, 27, 671–677.
- [99] Campos de Carvalho, A.C.; Carvalho, A.B. Advances and Challenges for Gene Therapies in Brazil. *The Lancet Regional Health - Americas*, 2025, 43, 101035.
- [100] Huerta, M.Á.; Roza, P.; Cisneros, E.; Alique, M.; Roza, C. Enhancing Clinical Translation of Analgesics for Neuropathic Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis on the Role of Non-Evoked Pain Assessment in Preclinical Trials. *Pain*, 2025, 166, 2473–2486.
- [101] Ogbogu, U.; Albrecht, L. Making Advanced Therapies Affordable and Accessible: Two Strategic Approaches. *Dev. World Bioeth.*, 2025.
- [102] Lee, T.-L.; Sawai, T. Navigating Equity in Global Access to Genome Therapy Expanding Access to Potentially Transformative Therapies and Benefiting Those in Need Requires Global Policy Changes. *Front. Genet.*, 2024, 15.
- [103] Reckelbus, M.; Mohan, R.; Locquet, P.; Van Steijvoort, E.; Huys, I.; Borry, P. Disparities in Access to Gene Therapy in the European Union: Ethical and Regulatory Challenges. *J. Law Biosci.*, 2025, 12.

POTENCIAL MOLUSCICIDA DE PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DA ESQUISTOSSOMOSE: USO DE NANOEMULSÕES COMO ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS À SAÚDE

Keyla Nunes Farias Gomes

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Centro de Ciências da Saúde, Avenida Carlos Chagas Filho 373 – Cidade Universitária, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA), Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO

O aparecimento de doenças parasitárias está diretamente associado às condições de vida precárias, especialmente à ausência de saneamento básico e as desigualdades socioeconômicas. Entre essas doenças negligenciadas destaca-se a esquistossomose, causada por parasitas do gênero *Schistosoma*, cujo ciclo de vida envolve moluscos como hospedeiros intermediários, etapa essencial para a infecção humana. Trata-se de uma das parasitoses mais disseminadas no mundo, presente em 78 países, sobretudo nas regiões das Américas, África e Ásia. Brasil é o país mais afetado, com cerca de 1,5 milhão de casos, concentrados principalmente no Nordeste. No contexto epidemiológico brasileiro, as espécies *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata*, destacam-se como os principais hospedeiros intermediários envolvidos na transmissão. Atualmente, a niclosamida é o único moluscicida comercialmente disponível e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), porém seu uso apresenta limitações operacionais e ambientais. Diante disso, pesquisas têm investigado alternativas baseadas em produtos naturais, como extratos brutos, frações, óleos essenciais e compostos isolados. Apesar do potencial biológico, muitos desses compostos apresentam baixa solubilidade em água, volatilidade e instabilidade, dificultando sua aplicação em ambientes aquáticos. Nesse cenário, as nanoemulsões emergem como uma estratégia promissora, pois possibilitam a incorporação e estabilização de substâncias hidrofóbicas em matrizes aquosas, aumentando sua biodisponibilidade, estabilidade e eficácia biológica. Atualmente, foi possível observar evidências de nanoformulações que podem atuar tanto sobre o molusco hospedeiro quanto sobre as formas infectantes do parasito, contribuindo para a interrupção da transmissão da esquistossomose. Dessa forma, a nanoformulação apresenta uma alternativa inovadora e potencialmente essencial para o manejo integrado e o controle dessa importante parasitose.

1 INTRODUÇÃO

O aparecimento de doenças parasitárias está relacionado às condições de vida precárias da população, especialmente à falta de saneamento básico e às condições inadequadas de moradia, refletindo diretamente o baixo nível de desenvolvimento econômico (Pereira, 2013; Miller et al., 2024; Ministério da saúde, 2024). Tais doenças representam um problema de saúde pública, atingindo milhões de pessoas ao redor do mundo (Melo et al., 2019).

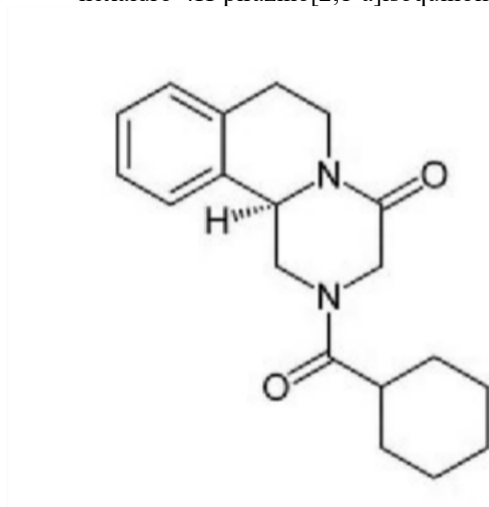
A esquistossomose, por exemplo, é a segunda doença parasitária mais significativa em termos de impacto na saúde pública, estando atrás apenas da malária (Rocha et al., 2016). O agente etiológico da esquistossomose foi identificado em 1852 pelo pesquisador Theodor Bilhar, e a doença tem suas origens nos rios Nilo, na África, e Yangtze, na Ásia (Artal, 2012).

Essa doença negligenciada é causada por parasitas do gênero *Schistosoma*, que utilizam moluscos como hospedeiros intermediários na forma infectante, facilitando assim a transmissão para os seres humanos (Katz, Peixoto, 2000; Klohe et al., 2021; Rangel et al., 2023). Popularmente conhecida como doença do caramujo, bilharziose, xistose ou barriga d'água, a esquistossomose representa um grande problema de saúde pública no Brasil há décadas, conforme indicam os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Rangel et al., 2023).

Embora o diagnóstico e o tratamento da esquistossomose sejam relativamente simples e eficazes quando realizados precocemente, a doença pode agravar para formas clínicas mais graves na ausência de uma assistência qualificada. Dentre essas manifestações, destaca-se a esquistossomose hepatoesplênica, caracterizada pelo aumento progressivo do fígado e do baço, podendo ocasionar complicações clínicas significativas e comprometer a vida dos indivíduos afetados (Katz; Almeida, 2003; Rodrigues et al., 2021).

O medicamento para o tratamento dessa doença parasitária é o praziquantel (Figura 1), comercializado sob o nome Biltricide®. Este fármaco apresenta baixa toxicidade e alta eficácia, sua administração ocorre por via oral utilizando a dose única de 40 mg/kg. No Brasil, o medicamento apresenta taxa de cura em torno de 78%, enquanto em países africanos, utilizando a dose de 60 mg/kg, os índices de cura variam entre 70% e 100%. Apesar de sua ampla eficácia, o praziquantel pode causar efeitos colaterais como náusea, diarreia, urticária e cefaleia, além de apresentar limitações importantes, pois não é capaz de eliminar formas imaturas do helminto e não previne reinfecções (Rey, 2008; Luna; Campos, 2020; Klohe et al., 2021).

Figura 1: Fórmula estrutural química do Praziquantel. Nome IUPAC: 2-(Cicloexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexaidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona

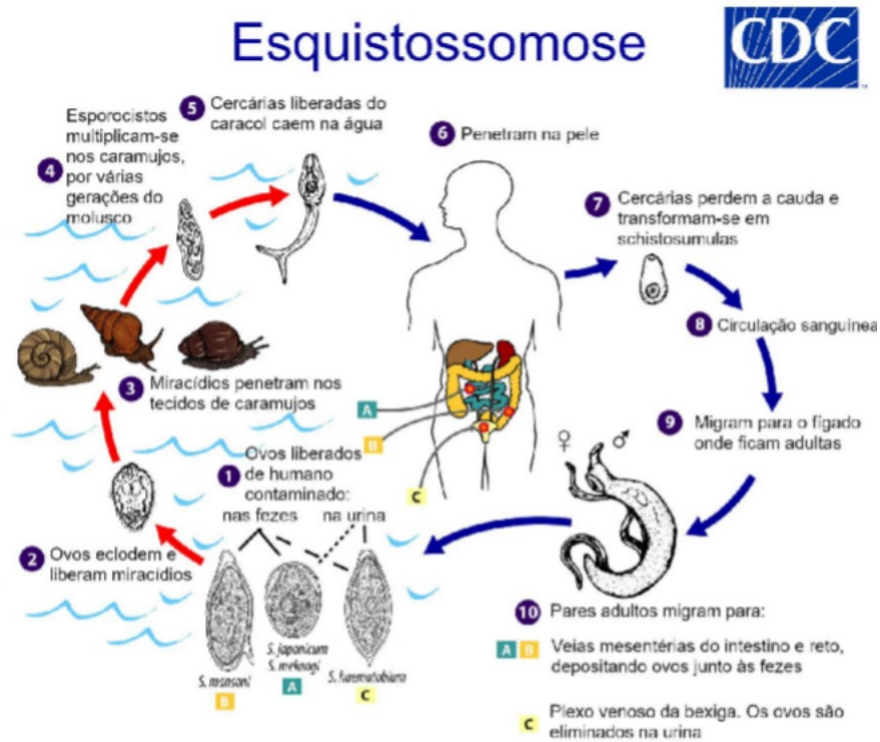


(http://www.uft.edu.br/parasitologia/pt_BR/farmacos/praziquantel/qu%C3%ADmica/index.html).

A esquistossomose, doença endêmica, é transmitida pelo contato com água doce contaminada por cercárias de *Schistosoma mansoni*, a forma larval infectante do parasita (Rocha et al., 2016). Os focos de transmissão geralmente ocorrem em áreas de baixo nível socioeconômico, tanto em regiões urbanas quanto rurais, onde há ausência de saneamento básico e água tratada (Coura, 2008; Rangel et al., 2023).

O ciclo se inicia quando indivíduos infectados eliminam ovos do parasita nas fezes, que, ao entrarem em contato com a água, liberam miracídeos, primeira forma larval. Esses miracídeos infectam moluscos hospedeiros intermediários, nos quais se desenvolvem por cerca de duas a cinco semanas até originar cercárias. Liberadas pelo molusco em ambiente aquático com luz e calor adequados, as cercárias penetram ativamente na pele de humanos, completando a infecção do hospedeiro definitivo (Figura 2) (Coura, 2008; Rangel et al., 2023; Ministério da Saúde, 2024).

Figura 2: Representação esquemática do ciclo biológico de Schistosoma.



Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>. Acesso em: 06/02/2026.

A doença é considerada uma das parasitoses mais disseminadas mundialmente, estando presente em 78 países, sobretudo nas Américas, África e Ásia. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 258 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo que 52 desses países apresentam transmissão moderada a alta (OMS, 2020). Nas Américas, o Brasil é o país mais afetado, com aproximadamente 1,5 milhão de casos, concentrados principalmente na região Nordeste (Ministério da Saúde, 2014).

No Brasil, a esquistossomose apresenta elevados índices endêmicos, especialmente nos estados de Pernambuco, Bahia, Alagoas e Sergipe, além de áreas das regiões Sudeste e Sul (Figura 3). De acordo com o Manual de Vigilância da Esquistossomose, entre 2010 e 2012 foram registrados 1.464 óbitos e 941 internações para cada 100 mil habitantes infectados por *S. mansoni* (Rocha, 2016; Katz, 2018).

Figura 3: Distribuição da esquistossomose de acordo com as áreas de endemicidade –Brasil, 2019.



Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (SISPCE/SVS/MS).
Dados acessados em: 28/11/2023.

Um estudo realizado em 2013 estimou que os custos sanitários e não sanitários associados aos casos graves de esquistossomose no Brasil alcançaram aproximadamente R\$ 1.010.278,79. Essa estimativa considerou, principalmente, os gastos decorrentes das internações hospitalares, que representam uma das maiores parcelas do ônus econômico da doença, especialmente nos casos em que há evolução para formas clínicas mais severas. Esses dados evidenciam o impacto significativo da esquistossomose sobre o sistema de saúde pública, assim como custos relacionados à falta de produtividade e à necessidade de cuidados prolongados (Nascimento, 2013).

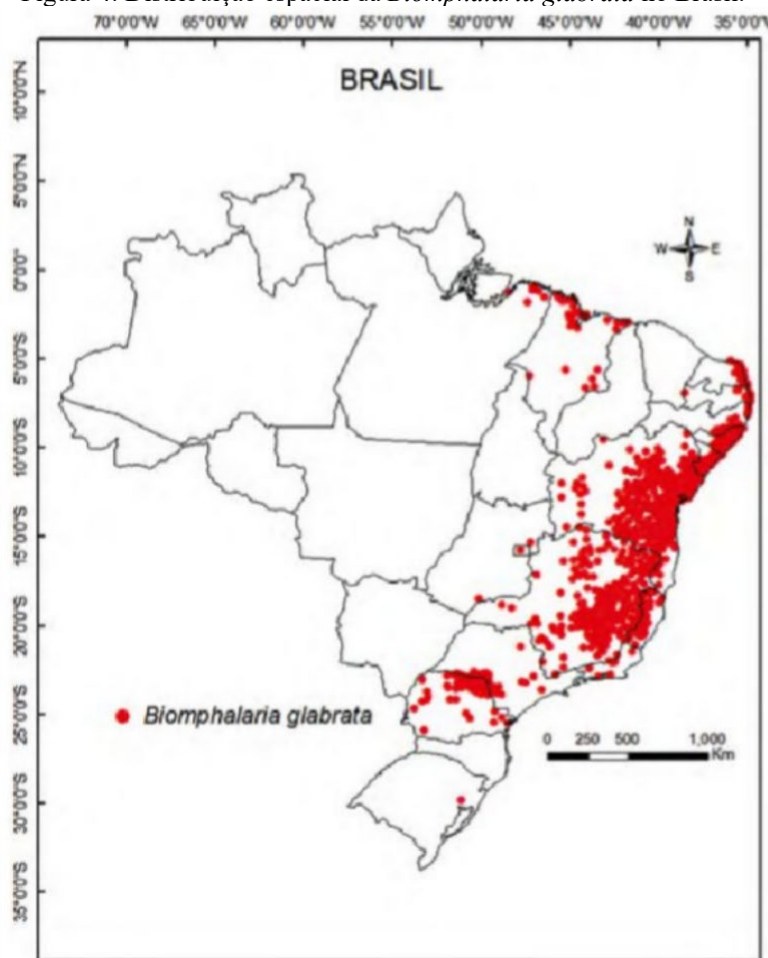
Posteriormente, em 2015, outra pesquisa analisou de forma mais abrangente os principais gastos relacionados à esquistossomose, incluindo casos positivos, formas graves da doença, internações e óbitos. Os custos diretos em saúde foram estimados em aproximadamente US\$ 2,1 milhões, enquanto o tratamento das formas graves representou cerca de US\$ 147.513,24. Ao considerar tanto as despesas diretas quanto as indiretas, o impacto econômico total da esquistossomose no país atingiu aproximadamente US\$ 41,7 milhões, reforçando a relevância da doença como um problema não apenas de saúde pública, mas também de ordem socioeconômica (Nascimento et al., 2018).

2 HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO

Os hospedeiros intermediários de *S. mansoni* pertencem à família Planorbidae, classe Gastrópoda e subclasse Heterobranchia. As espécies *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* são as três representantes do gênero *Biomphalaria* de maior importância epidemiológica. Esses moluscos são encontrados naturalmente infectados em coleções hídricas lânticas de água doce, como lagos, pântanos, rios de baixa correnteza, reservatórios artificiais e pequenos açudes, desempenhando papel fundamental no ciclo de transmissão da esquistossomose (Ministério da Saúde, 2024; Farias Gomes et al., 2025).

A espécie *Biomphalaria glabrata* é considerada o hospedeiro intermediário mais importante das Américas, em razão de sua elevada compatibilidade com o parasita, o que favorece a manutenção do ciclo de transmissão (Matos et al., 2019; Rangel et al., 2023). No Brasil, essa espécie apresenta ampla distribuição geográfica, sendo registrada em 16 estados (Figura 4), conforme dados do Ministério da Saúde (2014, 2024).

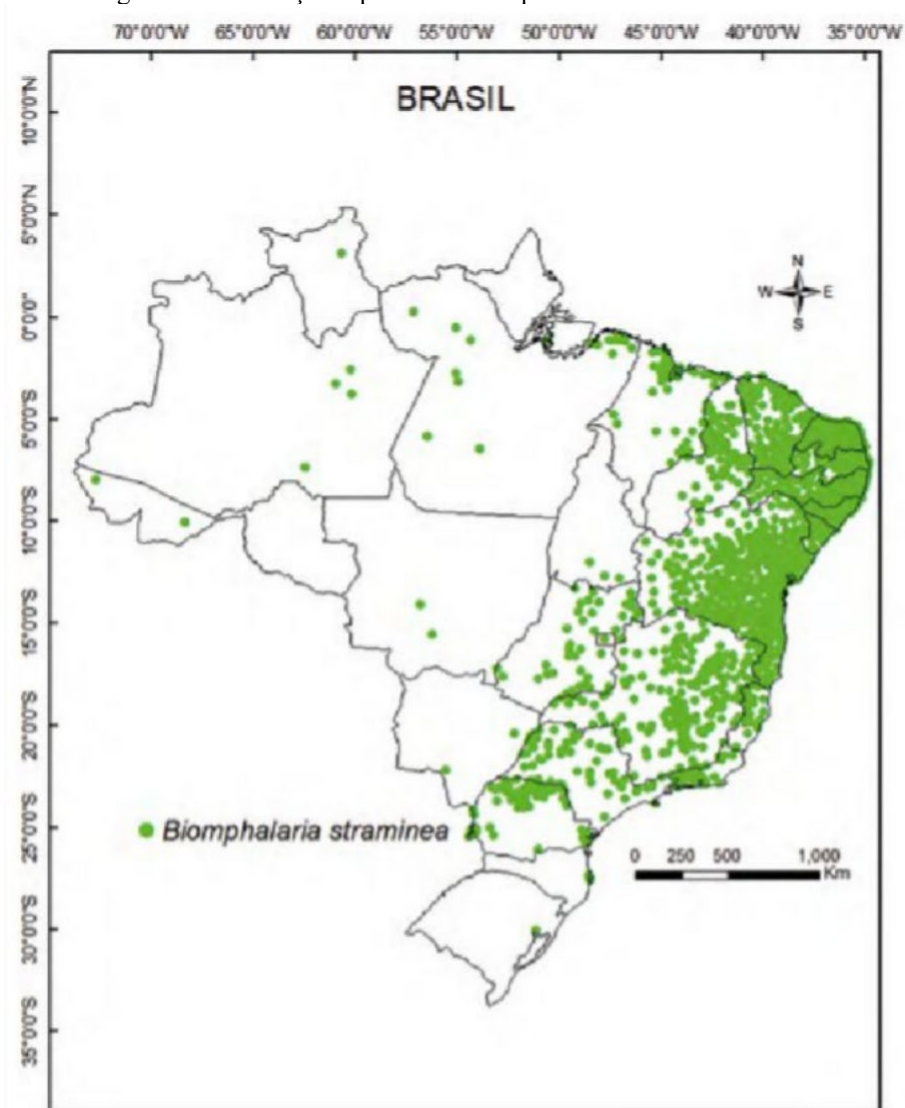
Figura 4: Distribuição espacial da *Biomphalaria glabrata* no Brasil.



Fonte: (BRASIL, 2024).

A espécie *Biomphalaria straminea* apresenta menor suscetibilidade à infecção por *S. mansoni* quando comparada à *Biomphalaria glabrata*. No entanto, devido à sua ampla distribuição geográfica, pode ser responsável por mais de 50% dos casos de infecção humana em determinadas regiões do Nordeste brasileiro. Destaca-se por sua elevada capacidade de adaptação a diferentes condições climáticas. De acordo com dados do Ministério da Saúde (2014, 2024), a espécie foi registrada em 24 estados brasileiros (Figura 5) e em 1.280 municípios distintos.

Figura 5: Distribuição espacial da *Biomphalaria straminea* no Brasil.

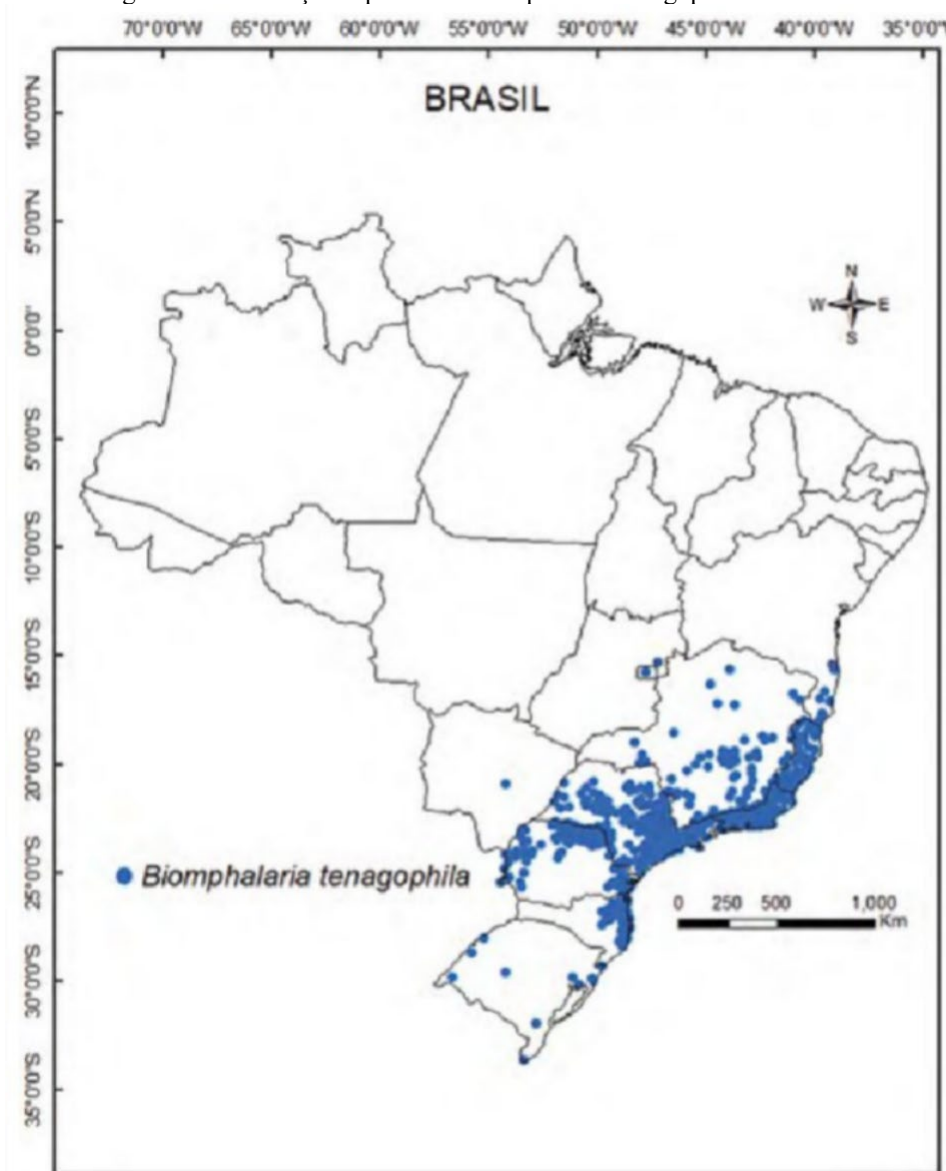


Fonte: (BRASIL, 2024).

A espécie *Biomphalaria tenagophila* ocorre predominantemente nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, sendo responsável pela transmissão da esquistossomose, especialmente nos estados de São Paulo e Santa Catarina. De acordo com dados do

Ministério da Saúde (2014, 2024), essa espécie foi registrada em 10 estados brasileiros (Figura 6) e em 562 municípios.

Figura 6: Distribuição espacial da *Biomphalaria tenagophila* no Brasil.



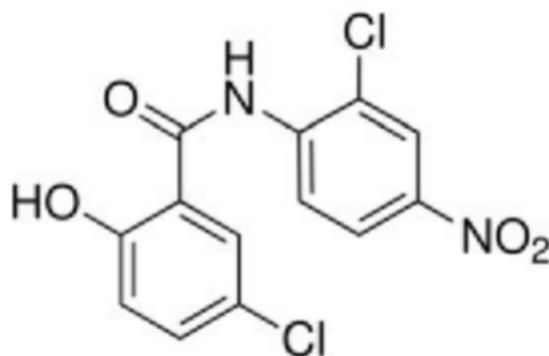
Fonte: (BRASIL, 2024).

De acordo com a OMS, a única substância atualmente recomendada para o controle de moluscos vetores da esquistossomose é o moluscicida sintético Niclosamida, comercialmente conhecido como Niclocide. Entretanto, o uso dessa substância tem gerado preocupações quanto à sua toxicidade para organismos não alvo, à baixa seletividade, ao potencial de contaminação ambiental e ao desenvolvimento de resistência por caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* (Costa, 2015; Amaral et al., 2022).

As substâncias empregadas no controle desses moluscos, denominadas moluscidas, devem apresentar características essenciais para garantir eficácia e segurança. Segundo o Ministério da Saúde (2008), no âmbito do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose, esses produtos devem ter baixo custo, ser eficazes em baixas concentrações, não apresentar toxicidade para seres humanos, animais não alvo e para o meio ambiente, além de serem de fácil aplicação e manejo.

Ao longo do tempo, diversos compostos com potencial moluscida foram avaliados em campo; contudo, o único produto que permanece disponível comercialmente e possui aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a Niclosamida® (Figura 7), cujo nome IUPAC é 5-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)-2-hidroxibenzamida (Brasil, 2008). Apesar de sua reconhecida eficácia, a niclosamida apresenta limitações relacionadas à toxicidade e contaminação ambiental (Costa, 2015; Aula et al., 2021).

Figura 7: Fórmula estrutural da Niclosamida® . Nome IUPAC: 5-Chloro-N-(2-chloro-4-nitrophenyl)-2-hydroxybenzamide



(<http://www.mpbio.com/images/productimages/molecular-structure/02155827.png>).

Diante desse cenário, torna-se necessária a busca por alternativas, especialmente produtos naturais com atividade moluscida comprovada. Essas novas substâncias devem apresentar maior seletividade para o gênero *Biomphalaria*, reduzido impacto ambiental e ausência de toxicidade para organismos não alvo, contribuindo para um controle mais seguro e sustentável da esquistossomose.

Embora diversas espécies vegetais apresentem atividade moluscida, nenhuma delas reúne, até o momento, os requisitos fundamentais para viabilizar sua aplicação em larga escala industrial, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (2008). Esse cenário reforça a necessidade de intensificar a busca por novos fármacos que aliem eficácia no controle dos hospedeiros intermediários da esquistossomose à segurança ambiental. O desenvolvimento de compostos capazes de interferir diretamente no ciclo biológico desses

moluscos, sem provocar impactos negativos ao ecossistema, constitui uma estratégia promissora para reduzir a transmissão dessa doença endêmica.

Nesse contexto, diversos estudos têm investigado o potencial de produtos naturais como fontes de substâncias moluscicidas. Farias Gomes (2025), por exemplo, avaliou a bioatividade moluscicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, enquanto Rangel e colaboradores (2023) realizaram uma revisão abordando diferentes substâncias isoladas de origem natural que demonstraram atividade contra *Biomphalaria glabrata*. Entre os compostos destacados estão o ácido benzóico, a 2',4',6'-triidroxidihidrocalcona, o ácido divaricático, a piplartina e a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lapachol), os quais demonstraram resultados promissores em ensaios laboratoriais.

Muitos pesquisadores têm explorado diferentes abordagens para avaliar a atividade moluscicida de produtos naturais, incluindo o uso de extratos brutos, frações, óleos essenciais e substâncias isoladas. No entanto, essas substâncias apresentam limitações, como baixa solubilidade em água, volatilidade ou instabilidade, o que dificulta sua aplicação em ambientes aquáticos. Para superar essas restrições, as nanoemulsões surgem como uma estratégia promissora, pois permitem a incorporação e estabilização desses compostos em matrizes aquosas, aumentando sua biodisponibilidade e eficiência biológica (Tomiotto-Pellissier et al., 2017; Paiva Machado et al., 2024).

As nanoemulsões são sistemas dispersos cineticamente estáveis, formados por duas fases imiscíveis, cuja principal característica distintiva em relação às emulsões convencionais, geralmente instáveis, é o tamanho reduzido das gotículas, que varia aproximadamente entre 20 e 200 nm. Essa propriedade confere maior estabilidade, melhor biodisponibilidade e potencial aumento da atividade biológica, o que explica sua ampla aplicação em diversos segmentos industriais ao longo dos anos (Jaiswal et al., 2015; Marhamati et al., 2021; Paiva Machado et al., 2024) (Figura 8). Na Tabela I, são apresentados critérios e parâmetros relevantes para a caracterização de nanoemulsões.

Figura 8: Esquema ilustrativo de nanoemulsão óleo/água com tensoativo e sua preparação por agitação em vórtex (baixo aporte energético).

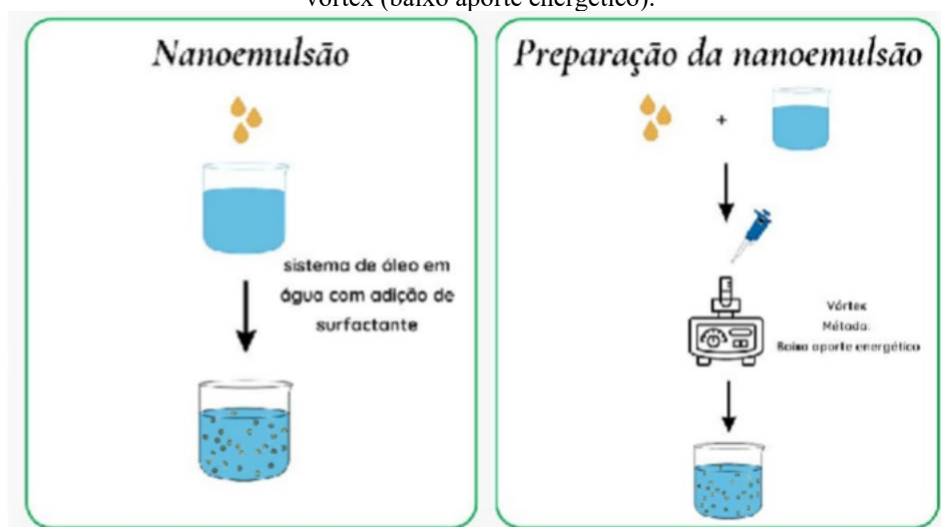


Tabela 1: Critérios de caracterização de nanoemulsões:

Critério	Nanoemulsão
Tamanho das gotículas	20 – 200 nm
Estabilidade Cinética	(estável por tempo prolongado, mas não permanente)
Aspecto visual	Translúcido ou transparente
Uso de tensoativos	Presença de tensoativos (surfactantes) para estabilização
Aplicações comuns	Fármacos, cosméticos, alimentos

Nesse contexto, destaca-se como exemplo de aplicação da nanoemulsão um estudo que avaliou a formulação do óleo essencial extraído das folhas de *Neomitranthes obscura* quanto ao seu potencial moluscicida. A nanoemulsão demonstrou atividade letal contra moluscos jovens (6–8 mm) e adultos (10–12 mm) de *Biomphalaria glabrata*, apresentando valores de CL₉₀ de 25,05 ppm e 55,4 ppm após 48 horas de exposição, respectivamente. Também foi observada ação sobre as desovas da espécie, com CL₉₀ de 66,25 ppm no mesmo período (Rangel et al., 2023).

Adicionalmente, a formulação exibiu elevada eficácia contra a forma infectante do parasita *Schistosoma mansoni*, alcançando CL₉₀ de 11,5 ppm após 4 horas. Ressalta-se que a nanoemulsão não apresentou toxicidade para moluscos do gênero *Melanooides*. Esses achados evidenciam o potencial dessa nanoformulação como uma estratégia promissora para o controle de *Biomphalaria glabrata* e, conseqüentemente, para a redução da transmissão da esquistossomose (Rangel et al., 2023).

Outro exemplo relevante é a nanoformulação obtida a partir do óleo essencial das folhas de *Myrciaria floribunda*, que também demonstrou atividade moluscicida. Essa

formulação apresentou concentração letal 50 (CL₅₀) de 47,02 µg/mL para moluscos adultos e 29,66 µg/mL para moluscos jovens da espécie *Biomphalaria glabrata*, após 48 horas de exposição. Em embriões, a CL₅₀ foi de 48,11 µg/mL no mesmo período. Além disso, a nanoemulsão exibiu efeito sobre cercárias de *Schistosoma mansoni*, com CL₅₀ de 83,88 µg/mL (Machado et al., 2023).

Esses achados reforçam que a nanoemulsão constitui uma estratégia promissora para o controle da espécie *Biomphalaria glabrata* e para a interrupção da transmissão da esquistossomose, uma vez que atua tanto sobre o hospedeiro intermediário quanto sobre a forma infectante do parasito. Dessa forma, a nanoformulação destaca-se como uma alternativa importante e potencialmente essencial para o manejo integrado e o controle dessa parasitose.

REFERÊNCIAS

- Amaral LS, Tinholi-Alvez VM, Castro LS, Tunholi VM, Gaudêncio F, Monteiro CO, Chambarelli MC, Pinheiro J, Freire-Martins, IV. Heterorhabditis 77 bacteriophora (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolate HP88, induces 2 reproductive and physiological alterations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: 3 Planorbidae): an alternative for biological control of schistosomiasis. SSRN. 2022.
- Artal FJC. Cerebral and Spinal Schistosomiasis. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2012; 12(6): 666-674.
- Aula OP, McManus DP, Jones MK, Gordon CA. Schistosomiasis with a Focus on Africa. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2021, 6, 109.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças Transmissíveis. Vigilância da esquistossomose mansoni : diretrizes técnicas [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, Departamento de Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2024. 116 p. : il.
- Costa AV, Almeida BR, Gonçalves LV, Crico KB, Ignacchiti MDC, Pereira Junior OS, Pinheiro PF, Queiroz VT. Efeito moluscicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) sobre *Lymnaea columela* (Say, 1817) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). *Revista de Plantas Medicinais*. 2015; 17(4), 707-712.
- Coura JR. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento 78 de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. ISBN 978-85-334-1438-9.
- Farias Gomes, K.N.; Machado, F.P.; Mota, E.M.; da Silva, A.C.R.; Xavier, M.G.;
- Menezes, J.T.d.C.e.; do Valle, A.F.; da Silva, L.L.; Leite, B.d.F.; Rocha, L.; et al. Potential of Essential Oils from *Cymbopogon winterianus* Jowitt: Promising Evaluation for the Control of Mollusks and Embryos of *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* Cercariae. *Pharmaceuticals* 2025, 18, 318. <https://doi.org/10.3390/ph18030318>.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117218>.
- Jaiswal, M., Dudhe, R. & Sharma, PK Nanoemulsion: um modo avançado de sistema de administração de fármacos. *3 Biotech* 5 , 123–127 (2015). <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0214-0>.
- Katz N, Almeida K. Esquistossomose, Xistosa, Barriga d'água. *Ciência e Cultura*. 2003; 55(1), 38 – 41.
- Katz N, Peixoto SV. Análise Crítica da estimativa do Número de Portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2000; 33(3), 303 – 308.
- Katz N. (2018). Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses. CPqRR.

Klohe K, Koudou BG, Fenwick A, Fleming F, Garba A, Gouvras A, Harding-Esch EM, Knopp S, Molyneux D, D'Souza S, Utizinger J, Vounatsou P, Waltz J, Zhang Y, Rollinson D. A Systematic literature review of Schistosomiasis in a urban and peri-urban settings. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2021. 15(2): e0008995.

Luna EJA, Campos SRSLC. Vaccine development against neglected tropical Disease. *Reports in Public Health*. 2020; 36 Sup 2:e00215720.

Machado, FP; Loucura, D.; Esteves, R.; Ruppelt, BM; da Silva, VM; Matos, APdS; Santos, JAAd; Rangel, LdS; Santos, MG; von Ranke, NL; e outros. Efeitos moluscicidas e cercaricidas da nanoemulsão de óleo essencial de *Myrciaria floribunda*. *Moléculas* 2023, 28, 5944. <https://doi.org/10.3390/molecules28165944>

Marhamati, M., Ranjbar, G., Rezaie, M., 2021. Effects of emulsifiers on the physicochemical stability of Oil-in-water Nanoemulsions: A critical review. *J Mol Liq*.

Melo AGS, Irmão JJM, Jeraldo VLS, Melo CM. Esquistossomose mansônica em famílias de trabalhadores da pesca de área endêmica de Alagoas. *Escola Anna Nery*. 2019; 23(1): e20180150.

MILLER, Austinn C.; SILLER JR., Alfredo; TYRING, Stephen K. Parasitic diseases: infections and infestations. In: *Rook's Textbook of Dermatology*. First published: 19 Mar. 2024. DOI: 10.1002/9781119709268.rook033.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 144 p.: il. color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica : diretrizes técnicas : Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.– 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2008. 178 p. : il. color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Nascimento GL, Pegado HM, Domingues ALC, Ximenes RAA, Itria A, Cruz LN, Oliveira MRF. The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of Schistosomiasis mansoni. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 114: e180347, 2018.

Nascimento GL. Formas graves da esquistossomose mansoni: carga epidemiológica e custos no Brasil em 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade de Brasília. Brasília, p. 54. 2013.

Organização Mundial da Saúde. Schistosomiasis. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em Fevereiro de 2020.

Paiva Machado, Francisco; Da Silva Rangel, Leonardo ; Farias Gomes, Keyla ; Albuquerque Dos Santos, José Augusto ; Xavier Faria, Robson ; G.Santos, Marcelo ; P.Fernandes, Caio ; Rocha, Leandro. Potential of *Ocotea indecora* (Schott) Mez essential oil nanoemulsion in schistosomiasis control: Molluscicidal effects. EXPERIMENTAL PARASITOLOGY, v. 1, p. 108717, 2024.

Pereira LPLA. Atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata* Say: revisão e avaliação do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). 2013; 16p.

Rangel LDS, Paiva Machado F, Amaral R, Cláudia Rodrigues Da Silva A, Santos MG, Albuquerque Dos Santos JA, Lidmar Von Ranke N, Rodrigues CR, Rocha L, Faria RX. Molluscicidal nanoemulsion of *Neomitranthes obscura* (DC.) N. Silveira for schistosomiasis control. Front Pharmacol. 2023 Feb 24;14:1078936. doi: 10.3389/fphar.2023.1078936. PMID: 36909200; PMCID: PMC10002965.

RANGEL, L. S.; GOMES, K. N. F. ; SANTOS, J. A. A. ; FARIA, R. X. . Bioactivity of substances isolated from natural products on mollusks *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Planorbidae): a review. BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY (ONLINE), v. 83, p. 1-12, 2023.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais / Luís Rey. -4. ed. – Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008. ii.; ISBN 978-85-277-1406-8.

Rocha TJM, Santos MCS, Lima MVM, Colheiros CML, Wanderley FS. Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. Revista Pan-Amazônica de saúde. 2016; 7(2): 27-32.

Rocha TJM, Santos MCS, Lima MVM, Colheiros CML, Wanderley FS. Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. Revista Pan-Amazônica de saúde. 2016; 7(2): 27-32.

Rodrigues SAS, Andrade JV, Rosa FM, Bachur TPR, Coimbra ES. Nursin Action in the Context of Schistosomiasis. Revista Brasileira de Educação e saúde. 2021; 11 (3): 329-333.

Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M.M., Machado, L.F., Bortoleti, B.T. da S., Sahd, C.S., Chagas, A.F., Assolini, J.P., Oliveira, F.J. de A., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I., Costa, I.N., Melanda, F.N., 2017. Nanotechnology as a potential therapeutic alternative for schistosomiasis. Acta Trop. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.025>.

REALIZAÇÃO:



ACESSE NOSSO CATÁLOGO!



WWW.SEVENPUBLI.COM

CONECTANDO O **PESQUISADOR** E A **CIÊNCIA** EM UM SÓ CLIQUE.