

Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico

Karine Rigon Zimmer¹

Gustavo Luís Borré²

Danielle da Silva Trentin²

Clovis Woicickoski Júnior²

Amanda Piccoli Frasson²

Alexandre de Arruda Graeff²

Patrícia Gomes²

Alexandre José Macedo³

Resumo

Enzimas microbianas têm se destacado como um dos principais produtos tecnológicos do mundo moderno, porém seu uso tem relatos nos tempos mais remotos. No início do século XX, teve início a produção em grande escala de enzimas industriais, hoje enzimas para detergentes de roupas, por exemplo, somam quantias significativas no comércio mundial. Por outro lado, enzimas de uso em diagnóstico clínico e terapêutico tiveram seu uso iniciado na década de 60 e década de 80, respectivamente, e vêm recebendo especial atenção da indústria de biotecnologia. Os avanços já podem ser percebidos na sociedade com tratamentos mais efetivos e diagnósticos laboratoriais mais rápidos e precisos. Nesta revisão são apresentados aspectos históricos, mercadológicos e de aplicações dessas enzimas.

Palavras-chave: Enzimas terapêuticas e diagnóstica. Polimerase. Ribonuclease. Colagenase. Fosfatase. Inibidores enzimáticos.

Abstract

Microbial enzymes have been pointed as one of the most important technological product in the modern World, even that its use has been reported in the ancient ages. At the beginning of the 20th Century, the industrial enzymes started to be produced; today the enzymes used in detergents for clothes washing, for example, sum a significative portion of the world market. On the other hand, the use of special enzymes for clinical diagnostic and therapeutic started to be used at the beginning of 60`s and 80`s years respectively and caught the interest of the companies in biotechnology. Advances might be realized in the society, such as more effective therapeutic treatments and faster and more precise diagnostics in the clinic. In this revision are present aspects of history, market and application of these enzymes.

Keywords: Therapeutic and diagnostic enzymes. Polymerase. Ribonuclease. Colagenase. Phosphatase. Enzymatic inhibitors.

¹ Pós-Graduando do Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e molecular - Centro de Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Pós-Graduando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Professor da Faculdade de Farmácia, Laboratório de Tecnologia Bioquímica e do Centro de Biotecnologia, Grupo de Biofilmes & Diversidade Microbiana - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brasil. E-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br

Recebido em 29/05/09 e aceito em 17/08/09.

1 Considerações iniciais

“Enzimas especiais” são aquelas destinadas ao uso terapêutico, diagnóstico, analítico, química fina e pesquisa. Conceitualmente enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica, ou seja, aceleram a velocidade de reações químicas. Atualmente, as enzimas são empregadas massivamente em produtos de limpeza, que contém, por exemplo, proteases, ainda na área petroquímica produzindo biodiesel através do uso de lipases, na produção de sucos, com a utilização das pectinases e na terapêutica e em kits de diagnósticos, entre outras tantas áreas.

Industrialmente uma das principais fontes produtoras de enzimas são os microrganismos. Estes são considerados fontes atrativas e de baixo custo na produção de metabólitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto. Acrescenta-se ainda a vantagem da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas e pela possibilidade de uso de matérias-primas pouco dispendiosas.

Uma ampla gama de enzimas, de diferentes fontes e para diversos usos terapêuticos e de diagnóstico pode ser encontrada no mercado. O Brasil apresenta grande potencial para a busca de novos fármacos e biomarcadores enzimáticos uma vez que é inigualável a quantidade e variedade de produtos naturais, incluindo a notável biodiversidade microbiana disponível para transformação em produtos úteis de maior valor agregado. A grande eficiência das enzimas, aliada a sua alta especificidade, tornam-nas agentes de grande potencial para uso terapêutico. Assim sendo, a relevância do uso de enzimas como medicamento relaciona-se com o fato de que pequenas quantidades do catalisador biológico podem produzir efeitos bastante específicos em condições fisiológicas.

Enzimas especiais exigem alto nível de pureza em decorrência da sua aplicação, assim, uma sequência de processos de purificação é necessária até a obtenção final da enzima. Como o processo de purificação é sofisticado e de extrema complexidade, o custo des-

ta etapa pode representar até 80% do custo do produto final (KILIKIAN *et al.*, 2001).

O mercado externo brasileiro de enzimas foi avaliado no ano de 2005 em 147,2 milhões de dólares, correspondendo a apenas 3,7% do mercado internacional. Das enzimas produzidas em escala industrial, uma fatia significativa do mercado mundial é representada pelas enzimas especiais. No Brasil, as enzimas diagnósticas são predominantemente importadas enquanto que essa classe de enzimas produzidas no Brasil é exportada em uma quantidade muito menos expressiva. No período de 1998-2005, considerando-se enzimas especiais como um todo, o Brasil importou o equivalente a US\$ 516 milhões e exportou US\$ 24,5 milhões, o que corresponde a 84% de importação e 16% de exportação. Dentro destas, as enzimas terapêuticas são responsáveis pela maior parte do mercado neste período, contando com uma importação de US\$ 85 milhões (AEHLE, 2007). A previsão de crescimento para o mercado mundial de enzimas é de 7,6% ao ano, sendo responsável por este crescimento tanto a queda no preço e o maior acesso às enzimas de aplicação industrial quanto a inclusão de novas enzimas especiais, cada vez mais sofisticadas e de alto custo. No período de 2003 a 2005, as indústrias brasileiras que mais importaram e exportaram enzimas foram as de diagnóstico e as farmacêuticas (BON *et al.*, 2008).

Esta revisão foi realizada dentro das atividades da disciplina “Enzimas microbianas de uso farmacêutico” do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2 Histórico do uso de enzimas

Não se sabe precisamente quando as enzimas passaram a ser utilizadas nas atividades cotidianas das sociedades primitivas. Entretanto, as enzimas já eram amplamente utilizadas sem que se conhecesse seu conceito e função exata. Sabe-se, porém, que desde o momento em que o homem começou a deixar

registro escrito de seus atos, há referências ao uso de processos enzimáticos. Um dos mais antigos alimentos processados pelo homem, o queijo, produzido na época das primeiras civilizações – a partir de leite de cabra – foi a forma rudimentar encontrada para mantê-lo em condições de consumo por longos períodos de tempo, e adicionalmente, facilitar seu transporte por longas distâncias. O processo produtivo envolve a transformação dos açúcares presentes no leite em ácido láctico. Seu consumo está descrito na Odisséia de Homero, revelando que os Gregos já tinham difundido em sua cultura a produção deste alimento.

A produção e o consumo de cerveja na Babilônia data de 6000 a.C. (JAY, 2000) e os egípcios fabricavam pão dois milênios antes de Cristo nascer (CARBALLO, 2002), ambos produzidos com auxílio da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A cerveja tornou-se rapidamente um produto de importância social, de onde deriva o motivo para inclusão de uma série de leis no código de Hamurabi sobre a fabricação, comercialização e consumo da cerveja. Já o pão, outro importante alimento, nos primórdios da humanidade era fermentado ao ar, naturalmente, sem a adição de nenhum tipo de produto. Este processo baseia-se no fato de que existem esporos microbianos suspensos na atmosfera, os quais, ao atingirem a massa contendo os açúcares do trigo, crescem fermentando a mistura, permitindo a fabricação do pão. Já na Idade Média passou-se a guardar parte da massa fermentada para utilizar-se nas produções seguintes, visto que a “massa velha” contém grande quantidade de microrganismos fermentadores viáveis, reduzindo-se, desta forma, o tempo de fermentação do pão.

Inicialmente, esta produção era puramente empírica. A escolha do tipo de microrganismo mais adequado para cada processo era realizada por tentativa e erro, e o conhecimento era passado através das gerações. Por muito tempo não se soube que estas leveduras eram organismos vivos. A certeza deste fato veio apenas no século XIX com Louis Pasteur (JAY, 2000). No século XVIII, Spallanzani, um cientista italiano, já conhecia a ação digestiva de secre-

ções estomacais sobre a carne, porém o isolamento de uma enzima só foi realizado em 1833 pelos franceses Anselme Payen e Jean-François Persoz que precipitaram a diastase, enzima atualmente conhecida como amilase (SILVERMAN, 2002). Em 1836, Theodor Schwann, observou a primeira enzima descoberta a partir de um tecido animal, a pepsina, responsável pela digestão protéica (SILVERMAN, 2002).

No século XIX, Pasteur descreveu a conversão do açúcar em álcool por leveduras, demonstrando desta forma, que os agentes responsáveis pela fermentação eram organismos vivos. Pasteur postulou que estes fermentos eram inseparáveis da estrutura celular do levedo, declarando que "a fermentação alcoólica é um ato correlacionado à vida e à organização das células do fermento e não à sua morte ou putrefação" (BUCHNER, 1907). Somente em 1878, passou-se a fazer distinção entre os organismos inteiros e as moléculas capazes de realizar a catálise, passando a serem chamadas pelo termo cunhado por Wilhelm Kühne, *enzimas*, do grego, “no fungo” (PRICE, 1999), e a ação destas moléculas, chamada de fermentação.

No fim do século XIX, Eduardo Büchner, provou que as enzimas permanecem ativas mesmo fora das células que as produzem, demonstrando que estas não necessitam de células vivas para a sua atividade. Esta descoberta valeu-lhe o prêmio Nobel de Química de 1907 (BUCHNER, 1907). Todavia, depois de transcorrido um quarto do século XX, não se tinha conhecimento da natureza das enzimas, até que em 1926 James Sumner purificou e cristalizou a urease, sabidamente uma enzima (PRICE, 1999; NORTHROP, 1946). Tal fato contribuiu com a elucidação deste mistério que caiu por terra com os trabalhos de Northrop e Stanley no início da década de trinta do século passado com as enzimas pepsina, tripsina e quimiotripsina, provando inequivocamente que as enzimas são proteínas (NORTHROP, 1946).

Em 1955, Sanger desenvolveu o primeiro método para determinar a estrutura primária de proteínas, sendo a insulina a primeira a ser sequenciada (SANGER, 1958). Quase dez anos

depois, foi determinada pela primeira vez a estrutura tridimensional de uma proteína, a lisozima, através de técnicas de cristalografia de raios-X (PRICE, 1999).

3 Enzimas de uso terapêutico

O uso terapêutico de enzimas remonta ao final do século XIX, quando preparações brutas de enzimas pancreáticas de origem suína já eram empregadas como auxiliares digestivos (CRUZ *et al.*, 2008). Para as enzimas utilizadas em aplicações digestivas e tópicas, a pureza, a fonte e a dose não são consideradas cruciais (AEHLE, 2007). Entretanto, o uso endovenoso de enzimas microbianas requer uma purificação de alta seletividade acoplada à preservação da atividade enzimática, evitando a desnaturação protéica e a proteólise. Diversos requisitos devem ser considerados para o uso de enzimas com fins terapêuticos, dentre eles a baixa resposta imunológica, alta atividade e estabilidade em pH fisiológico, baixa taxa de eliminação e independência de cofatores exógenos. Além disso, quando se utilizam microrganismos como fonte destas moléculas, deve-se buscar cepas não patogênicas objetivando evitar a presença de toxinas (NETO, 2001; AEHLE, 2007).

Na prática, poucas enzimas possuem as propriedades necessárias para este fim, cuja instabilidade dos biocatalizadores, suscetibilidade ao ataque de proteases, dificuldade de acesso ao órgão-alvo e antigenicidade representam algumas das limitações da terapia enzimática. Entretanto, estas dificuldades podem ser contornadas por diferentes estratégias de formulação, como a conjugação química com polímeros utilizada para diminuir a resposta imune, um dos efeitos mais comuns das enzimas microbianas. Além disso, a incorporação de enzimas a lipossomos (vesículas microscópicas compostas de uma ou mais membranas lipídicas envolvendo um compartimento aquoso) confere diminuição da toxicidade, direcionando o acesso ao órgão-alvo e reduzem a resposta imunológica (CRUZ *et al.*, 2008).

De acordo com a finalidade, as enzimas podem ser administradas por via tópica, oral, intravaginal e parenteral, apresentando-se, no último caso, geralmente na forma de preparações liofilizadas contendo sais tamponantes biocompatíveis. Atualmente existe no mercado uma ampla variedade de medicamentos à base de enzimas para aplicação como anti-inflamatórios, antissépticos, auxiliares digestivos, na reposição de enzimas hemostáticas, na inibição da coagulação, na reposição de enzimas metabólicas, no tratamento da fibrose cística bem como na terapia contra o câncer (tabela 1). Dentre as principais enzimas terapêuticas de origem microbiana, destaca-se a L-asparaginase utilizada para o tratamento de leucemia linfocítica aguda. Esta enzima é capaz de esgotar os estoques de asparagina plasmática, causando a morte de células blásticas que não possuem a enzima asparagina sintetase (NARTA *et al.*, 2007). Células sadias não são afetadas, uma vez que não necessitam de aporte exógeno de asparagina. A enzima é obtida principalmente através dos microrganismos *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora*, havendo formulações no mercado da enzima nativa de ambos os organismos e da L-asparaginase de *E. coli* conjugada ao polietilenoglicol (PEG) (NARTA *et al.*, 2007). As formulações lipossomais ainda estão em estudo e apresentam, assim como a PEG-asparaginase, menor toxicidade, aumento do tempo de circulação na corrente sanguínea e consequente aumento da atividade terapêutica (NETO, 2001).

A enzima estreptoquinase, produzida por *Streptococcus* β -hemolítico, especialmente *S. pyogenes* e *S. equisimilis*, pertence à primeira classe de agentes fibrinolíticos a ser utilizada na clínica, sendo capaz de ativar o plasminogênio, substância precursora da plasmina, que por sua vez dissolve os coágulos sanguíneos (RANG *et al.*, 2004). É utilizada para eliminação de trombos venosos e embolias pulmonares agudas e quando administrada na forma endovenosa, reduz a taxa de mortalidade no infarto do miocárdio. Uma das principais limitações desta terapia é a resposta antigênica, variando desde reações menores, como

Tabela 1 – Exemplos de enzimas terapêuticas (adaptado de AEHLE, 2007 e CRUZ *et al.*, 2008)

Enzima	Número E.C.	Fonte	Nome comercial	Uso terapêutico
Urato oxidase	1.7.3.3	<i>Aspergillus flavus</i>	Uricozyme	Gota
Superóxido dismutase	1.15.1.1	Fígado bovino e eritrócitos	Peroxinorm Oxinorm	Inflamação
Lipase	3.1.1.3	<i>Rhizopus arrhizus</i>		Auxiliar digestivo
Desoxirribonuclease	3.1.21.1	Células CHO recombinante	Pulmozyme	Fibrose cística
Desoxirribonuclease (streptodornase)	3.1.21.1	<i>Streptococcus haemolyticus</i>	Varidase	Úlceras gástricas
Ribonuclease	3.1.26.4	<i>Rana pipiens</i>	Onconase	Antiviral e alguns cânceres
B-amilase	3.2.1.1	<i>Aspergillus oryzae</i>		Auxiliar digestivo
Celulase	3.2.1.4	<i>Trichoderma viride</i>		Auxiliar digestivo
Lisozima	3.2.1.17	Clara de ovos	Murazyme Colpistar	Antibiótico
Galactosidade	3.2.1.22	Células humanas ou CHO recombinantes	Fabrazyme Replagal	Doença de Fabry
Lactase	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i>	Surelac Lactaid	Intolerância a lactose
Glicocerebrosidase	3.2.1.45	Células CHO recombinantes	Cerezyme	Doença de Gaucher
Estreptoquinase	3.4.21.73	<i>Streptococcus</i> β hemolítico	Streptase Kabikinase	Coágulo sanguíneo
Esfericase	3.4.21	<i>Bacillus sphaericus</i>		Bronquite crônica Pneumonia aguda
Papaína	3.4.22.2	<i>Carica papaya</i>	Panafil	Digestão Verminose
Colagenase	3.4.24.3	<i>Clostridium histolyticum</i>	Santyl Kollagenase	Úlceras de pele
Serrapeptase	3.4.24.40	<i>Serratia</i> E15	Danzen	Inflamação
L-asparaginase	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia carotovora</i>	Elspar Erwinase	Leucemia linfocítica aguda

febre e exantema cutâneo – onde a pele apresenta-se vermelha, áspera e com prurido intenso – até reações anafiláticas graves.

As β -lactamases por sua vez, constituem outro exemplo de enzimas microbianas terapêuticas e apresentam a capacidade de romper o anel β -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas. A produção de β -lactamases por diversas bactérias representa um grande mecanismo de resistência aos antimicrobianos, por outro lado, o uso destas enzimas com fins terapêuticos se dá em reações alérgicas agudas após administração de penicilinas. Estas enzimas podem ser produzidas por uma série de microrganismos, dentre eles, *Bacillus cereus*, *Streptomyces cacaoi*, *S. albus*, *E. coli*, e *Citrobacter diversus*.

4 Enzimas em diagnóstico

Enzimas diagnósticas ou para uso analítico são enzimas utilizadas diretamente ou como componentes de kits diagnósticos para a determinação de diferentes substâncias (AEHLE, 2007). São enzimas com papel importante na análise de amostras de sangue, urina, soro, entre outros fluidos corporais, para o monitoramento e diagnóstico de diferentes patologias (CRUZ *et al.*, 2008). Dentre as substâncias que podem ser determinadas com testes e kits compostos por enzimas, podemos citar substâncias químicas como fosfatos, amônia, etanol e ácido acético, além de metabólitos tais como glicose, uréia, creatinina e até

mesmo substâncias tóxicas como pesticidas, herbicidas e metais pesados. Antígenos virais, anticorpos, proteínas, medicamentos, vitaminas e hormônios estão entre outros compostos que podem ser analisados por métodos que utilizam enzimas.

As enzimas para uso diagnóstico são em muitos casos obtidas de microrganismos. A principal razão para se utilizar microrganismos na produção de enzimas que poderiam ser isoladas de plantas e animais, é a facilidade no melhoramento e a eficiência na produção (KOPETZKI *et al.*, 1994; AEHLE, 2007). Enzimas em diagnóstico são normalmente necessárias em quantidades relativamente pequenas (menos de 10 kg/ano no mundo), diferentemente das enzimas industriais que são usualmente produzidas em grandes quantidades.

Do ponto de vista industrial, técnicas moleculares, em especial a tecnologia de DNA recombinante, têm sido amplamente empregadas na produção destas enzimas. Recentes avanços nesta área têm permitido a clonagem de numerosos genes de interesse e a manipulação de diferentes células (em especial as bacterianas e fúngicas), permitindo maior produção da enzima desejada. Há registros indicando aumentos de até mil vezes na produção de enzimas de uso diagnóstico comparadas com os níveis obtidos do organismo produtor natural (KOPETZKI *et al.*, 1994). Assim, enzimas recombinantes com alto nível de expressão, obtidas a partir de técnicas moleculares, reduzem a necessidade de passos de purificação, tornando muitas vezes o processo mais eficiente. Enzimas como glicose-6-fosfato desidrogenase (*Leuconostoc dextranicus*), creatinase (*Pseudomonas putida*), galactose desidrogenase (*P. fluorescens*) e Taq polimerase (*Thermus aquaticus*) têm sido produzidas com sucesso utilizando estas técnicas (KOPETZKI *et al.*, 1994).

A utilização de enzimas nestes ensaios apresenta inúmeras vantagens comparada aos métodos químicos convencionais, já que estes são de difícil realização devido à baixa sensibilidade, seletividade, custo, tempo de realização e quantidade de amostra que necessitam

(GACESA; HUBBLE, 1990; KOPETZKI *et al.*, 1994; AEHLE, 2007). As enzimas podem ser empregadas para uso diagnóstico de uma forma geral de três diferentes maneiras:

a) Ensaios enzimáticos. Inúmeros ensaios, baseados em diferentes enzimas, estão atualmente disponíveis utilizando uma ampla variedade de métodos de detecção. Em muitos casos, as reações enzimáticas são monitoradas pela medida espectrofotométrica da oxidação/redução de coenzimas ou utilizando reações colorimétricas de ponto final (AEHLE, 2007). Um dos métodos comercialmente disponíveis para a quantificação de glicose emprega a enzima glicose oxidase a qual é obtida a partir de diferentes fontes fúngicas, principalmente do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* como, por exemplo *A. niger* (WONG *et al.*, 2008). Além disso, enzimas microbianas como colesterol esterase (obtida de espécies de *Nocardia*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharopolyspora erythraea*) e urease (obtida de espécies de *Lactobacillus* e *Streptococcus*) têm sido amplamente utilizadas em ensaios enzimáticos (WONG *et al.*, 2008) e em biosensores para determinação de metabólitos importantes em áreas médicas e ambientais. *Biosensores enzimáticos* são importantes exemplos da utilização de enzimas microbianas em testes diagnósticos. Estes têm movimentado milhares de dólares em todo mundo. Enzimas em biosensores são muito atrativas, devido à variedade de produtos de reação quantificáveis os quais incluem prótons, elétrons, luz e calor (NEWMAN; TURNER, 2005; WONG *et al.*, 2008). Na tabela 2, encontram-se alguns exemplos de enzimas utilizadas nesse tipo de ensaio com um dos possíveis produtores da enzima em questão.

b) Imunoensaios enzimáticos. Dentro deste grupo encontram-se enzimas utilizadas em técnicas imunológicas, nas quais elas apresentam-se acopladas a anticorpos ou antígenos. A notável especificidade torna o ensaio específico, a alta afinidade dos anticorpos pelos antígenos e o poder amplificador da catálise enzimática tornam o ensaio extremamente sensível. Nesses métodos, enzimas originárias de

organismos como *E. coli*, *Vibrio harveyi*, *Electrophorus electricus* e *A. niger* são ligadas de forma covalente a um determinado anticorpo e a reação catalisada pela enzima, quando da adição de substrato específico, é utilizada para quantificar o sistema (ROITT *et al.*, 1999) (tabela 2).

c) Quantificação direta de enzimas microbianas. Realizada em fluidos corporais representa outra ferramenta importante na detecção de infecções microbianas. Visto que estas enzimas são produzidas unicamente por certos microrganismos, sua detecção em fluidos corporais é um forte indício de infecção. Enzimas potencialmente úteis para este propósito incluem β -lactamases, glicosidases, neuramidases, galactosidases entre outras (YOLKEN, 1981).

Tabela 2 – Exemplos de enzimas de origem microbiana utilizadas em ensaios diagnósticos

Enzima	Microrganismo
Ensaio enzimático	
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium sp.</i>
Glicose-6-fosfato desidrogenase	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. dextranicus</i>
Urease	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Streptococcus sp.</i>
Creatinase	<i>Pseudomonas putida</i>
Galactose desidrogenase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Piruvato oxidase	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Colesterol oxidase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharopolyspora erythraea</i> , <i>Nocardia sp.</i>
Imunoensaios enzimáticos	
Acetilcolinesterase	<i>Electrophorus electricus</i>
Fosfatase alcalina	<i>Escherichia coli</i>
β -galactosidase	<i>Escherichia coli</i>
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>
Glicose-6-fosfato desidrogenase	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

5 Ribonucleases

As ribonucleases ou RNases são as proteínas responsáveis pela atividade degradativa de RNA, participando de diversos processos fisiológicos, como a transcrição e processamento do RNA, morte celular, defesa do hospedeiro e controle do crescimento tumoral (ÚSUGA;

RUGELES, 2006). Estas enzimas estão presentes em bactérias, fungos, protozoários, plantas superiores e vertebrados. As RNases são classificadas em três grandes famílias: super família A, família T1 e família T2. As RNases têm como substratos diferentes sequências do RNA. Por exemplo, a RNase A cliva a extremidade 3' de resíduos terminados em C e U, dando origem a um produto 3'-fosforilado. A RNase Phy I apresenta como substratos resíduos G, A e U e como produtos mononucleotídeos com C 5' terminal. A RNase U2 cliva ligações 3'-fosfodiéster adjacentes às purinas, originando purinas 3'-fosfato ou ainda oligonucleotídeos com esse grupo terminal (RITTIÉ; PERBAL, 2008).

A produção de ribonucleases por diversos microrganismos tem sido amplamente estudada. A tabela 3 ilustra os principais microrganismos produtores de RNases as quais já foram isoladas e caracterizadas.

O cultivo destes microrganismos é geralmente realizado em meio líquido, e a fermentação ocorre sob diferentes condições tais como fermentação submersa com agitação (XIONG *et al.*, 2005) e com células imobilizadas (MANOLOV *et al.*, 1993). As RNases obtidas a partir de microrganismos têm sido utilizadas amplamente em técnicas de biologia molecular e na indústria farmacêutica (XIONG *et al.*, 2004). Muitas RNases são altamente citotóxicas e, em alguns casos são seletivas às células malignas. Como fatores determinantes dessa citotoxicidade, podemos citar a atividade catalítica, a habilidade de escapar de inibidores naturais, a estabilidade e a eficiência de internalização. Esse somatório de fatores indica que as RNases podem ser utilizadas como fármacos alternativos no tratamento de tumores (MAKAROV; ILINSKAYA, 2003).

Outra aplicação bastante investigada é o uso destas enzimas na terapia antiviral. Seu emprego pode ser justificado pela capacidade de penetração na célula e degradação do RNA viral (RNA ribossomal, no caso dos vírus de RNA e RNA mensageiro após a transcrição, em vírus de DNA), somado ao fato de promover quimiotaxia às células do sistema imune (ÚSUGA; RUGELES, 2006).

Tabela 3 – Exemplos de microrganismos produtores de ribonucleases

Microrganismos produtores		
<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Pleurotus tuber-regium</i>
<i>Agrocybe cylindracea</i>	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	<i>Rhizopus niveus</i>
<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Irpex lacteus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Russulus virescens</i>
<i>Aspergillus pallidus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Termitomyces globulus</i>
<i>Calvatia caelata</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Thelephora ganbajum</i>
<i>Clitocybe maxima</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Volvariella volvacea</i>
<i>Dictyophora indusiata</i>	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	
<i>Flammulina velutipes</i>	<i>Pleurotus sajorcaju</i>	

Pesquisadores demonstraram que uma RNase homóloga à RNase A é capaz de inibir a replicação viral em células infectadas pelo vírus HIV-1 (SAXENA *et al.*, 1996). Além disso, destaca-se o emprego das RNases como ferramenta analítica. Elas desempenham papel importante em estudos sobre a estrutura e função do RNA; são utilizadas para remover RNA de produtos que devem ser livres deste; e ainda são capazes de produzir nucleotídeos para uso clínico (XIONG *et al.*, 2004; RITTIÉ; PERBAL, 2008).

6 Polimerases

Polimerase é termo utilizado para designar enzimas capazes de catalisar a incorporação de monômeros em uma cadeia, estando associadas à formação de polissacarídeos, terpenos, proteínas e polímeros de ácidos nucléicos. Mais especificamente as polimerases são enzimas que catalisam a formação de cadeias de polinucleotídeos, a partir de seus monômeros, complementares a uma sequência molde. Desta forma, agrupadas nesta categoria, estão as DNA polimerases (I, II, III e IV), RNA polimerases (I, II e III), transcriptases reversas e telomerases, as quais são classificadas oficialmente como nucleotidiltransferases (EC 2.7.7).

Dentre as diversas polimerases mencionadas, algumas possuem uma ampla produção industrial e comercialização, destacando-se as DNA polimerases de organismos termófi-

los como a *Taq* polimerase e as transcriptases reversas advindas de retrovírus. Estas enzimas tornaram-se poderosas ferramentas da biologia molecular por serem peças-chave das técnicas da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*), por exemplo, contribuindo com o rápido avanço da biotecnologia.

A *Taq* polimerase é uma DNA polimerase presente na eubactéria extremófila *Thermus aquaticus*. Sua temperatura ótima de atividade, próxima a 75 °C e sua relativa estabilidade a 95 °C são fatores determinantes para o sucesso desta enzima na técnica da PCR. A técnica, desenvolvida por Kary Mullis em 1983, é amplamente utilizada na amplificação de sequências de DNA em estudos básicos de estrutura e função gênica na perícia forense, bem como no diagnóstico de doenças infecciosas, como a tuberculose e a AIDS (YANG; ROTHMAN, 2004). A disseminação da técnica da PCR fez com que a obtenção da enzima através de sua fonte natural se tornasse inviável, tanto pelas dificuldades de cultivo da bactéria extremófila, quanto pelo baixo rendimento de extração da enzima. Graças à tecnologia do DNA recombinante, a enzima foi clonada com sucesso em *E. coli*, uma espécie de fácil e amplo cultivo (LAWYER *et al.*, 1989; MANZUR *et al.*, 2006).

A transcriptase reversa, também conhecida como DNA polimerase dependente de RNA, é uma enzima heterodimérica que possui um domínio com a ação polimerásica e

outro com ação RNásica. O mecanismo da síntese de DNA a partir de RNA é explorado na técnica de RT-PCR, que alia a ação sequencial da retrotranscriptase e da *Taq* polimerase. Assim, após a formação da sequência de DNA, a mesma é amplificada tornando possível a identificação, de forma indireta, de fragmentos de mRNA transcritos em uma célula. Dentre as exemplares mais conhecidas e exploradas comercialmente destaca-se a retrotranscriptase do vírus da leucemia murina Moloney (M-MLV). Pelas adversidades que envolvem o cultivo e manuseio viral e pelo baixo rendimento na extração da enzima, a produção em larga escala de retrotranscriptases só foi possível, novamente, com o auxílio da tecnologia do DNA recombinante (ROTH *et al.*, 1985; MANZUR *et al.*, 2006).

7 Colagenases

As colagenases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas de vários tipos de colágeno, a proteína mais abundante nos mamíferos. O colágeno é virtualmente encontrado em todos os tecidos, exercendo diferentes funções de acordo com a organização de sua estrutura final. Nos organismos, suas fibras resistentes são clivadas em fragmentos menores pelas colagenases para posterior degradação dos fragmentos peptídicos por outras enzimas. Essas enzimas responsáveis pela hidrólise dos diferentes tipos de colágeno fazem parte do grupo das metaloproteinases de matriz (MMPs), endopeptidases dependentes de uma forte ligação com zinco para apresentarem suas atividades catalíticas. Dentre as várias colagenases já identificadas em humanos, pode-se citar como exemplos a colagenase intersticial ou de fibroblastos (MMP-1) e a colagenase de neutrófilos (MMP-8) (BIRKE-DAL-HANSEN *et al.*, 1993).

Microrganismos também produzem enzimas colagenolíticas, estas são amplamente comercializadas para diversos fins. Mais especificamente, o microrganismo *Clostridium histolyticum* tem sido muito estudado. Em 1937, um estudo realizado por Weil e Kocholaty

(1937) já investigava as proteinases do *C. histolyticum* após o relato da atividade proteolítica por outros pesquisadores. Posteriormente, Jennison (1945) avaliou a atividade proteolítica de certas bactérias sobre o colágeno, propondo a utilização do termo colagenase somente para as enzimas que comprovadamente hidrolisam o colágeno, ao contrário daquelas provenientes de bactérias que somente têm ação sobre a gelatina.

Experimentos utilizando *C. histolyticum* levaram ao isolamento e caracterização dos seis tipos de colagenases por ele produzidas e a sua classificação em duas classes conforme suas atividades catalíticas (BOND; VANWART, 1984). Muitos estudos contribuíram para tornar o *C. histolyticum* o principal microrganismo utilizado para a produção industrial de colagenases, entretanto, essas enzimas são também obtidas de outras espécies. Lima e colaboradores (2009) estudaram uma cepa de *Candida albicans* produtora de colagenase com resultados promissores para a produção industrial. Outros trabalhos propõem a utilização de organismos geneticamente modificados em associação com técnicas de purificação mais avançadas na obtenção dessas enzimas com níveis elevados de pureza e rendimento.

Quanto à utilização das colagenases, pode-se afirmar que as possibilidades são bastante variadas. Uma delas é o debridamento enzimático de ferimentos, pela capacidade dessas enzimas degradarem o colágeno dos tecidos necrosados e facilitarem a cicatrização. Seu uso, com essa finalidade ocorre há bastante tempo e uma das colagenases produzidas por *C. histolyticum*, a clostriopeptidase A, é também utilizada com esse objetivo (ÖZCAN *et al.*, 2002). Resultados animadores foram obtidos em um estudo de fase III, utilizando uma colagenase injetável no tratamento de Contratura de Dupuytren, uma condição que usualmente requer tratamento cirúrgico e intervenções recorrentes (BADALAMENTE; HURST, 2007).

Muito frequente também é a utilização das colagenases nas técnicas que envolvem culturas de tecidos e células animais. O uso de

colagenases é citado em vários métodos, como no isolamento de células endoteliais de cérebro, estudos de células tronco, células cardíacas, da pele, do tecido ocular, tanto em humanos quanto em modelos animais diversos (LI *et al.*, 2007; ZORN-PAULY *et al.*, 2004; SUPP, WILSON-LANDY, BOYCE, 2002; WOLBURG *et al.*, 1994). As colagenases apresentam potencial para emprego em outras áreas que não somente a terapêutica e de pesquisa. Seu uso pode ser expandido para o setor alimentício, como o beneficiamento de carnes, e até como auxiliar no tingimento de couros (KANTH *et al.*, 2008; BI *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007).

Com esse amplo campo de utilização, observa-se que a produção dessas enzimas pode ser muito vantajosa. As colagenases estão classificadas, para fins de exportação e importação, como pertencentes ao grupo "outras proteases e seus concentrados" (Nomenclatura Comum do Mercosul, NCM: 35079049) (BRASIL, 2009). A tabela 4 apresenta o peso desse grupo de enzimas na balança comercial brasileira. Esses dados corroboram com a crescente importância comercial da pesquisa e produção de enzimas no cenário econômico atual.

8 Fosfatases

As fosfatases são hidrolases que agem sobre compostos de fósforo, podendo hidrolisar uma variedade de ésteres e anidridos do ácido fosfórico e liberar fosfato, além de realizar reações de transfosforilação de fosfoésteres de glicerol, fenol e p-nitrofenol, para vários aceptores, como por exemplo, glicose e piridoxina. As fosfatases encontram-se em diversas

formas moleculares. De acordo com o pH ótimo de atuação podem ser classificadas em fosfatases alcalinas (FAL) (EC 3.1.3.1, com atividade em pH superior a 8,0) e fosfatases ácidas (EC 3.1.3.2, com atividade em pH inferior a 6,0).

O grande uso das fosfatases microbianas se dá como insumo em kits de reagentes para análises clínicas, principalmente para as técnicas imunoenzimáticas por ELISA. Os testes imunológicos baseados na detecção de antígenos ou anticorpos podem acoplar enzimas, tais como a fosfatase alcalina a um anticorpo ou anti anticorpo, dependendo do ensaio, as quais permitem a detecção da reação antígeno-anticorpo e a interpretação do resultado (ALMEIDA, 2000).

A enzimocosmética é ainda um novo campo de estudo e visa o emprego de enzimas em produtos cosméticos, dificultando ou facilitando as reações bioquímicas da pele. Neste sentido, a FAL vem sendo considerada um agente redutor de microrrugos, atuando no estímulo à proliferação dos fibroblastos (BON *et al.*, 2008). Além da sua aplicação na área de diagnóstico e cosmética, as fosfatases vêm despertando interesse também no setor agropecuário, catalisando a conversão do fósforo da forma orgânica em fósforo solúvel.

O interesse na aplicação biotecnológica de enzimas em ração animal deve-se principalmente ao custo das matérias-primas tradicionais. Além disso, a utilização de enzimas, como a fosfatase ácida, capaz de hidrolisar o fitato na ração melhora a digestibilidade e a disponibilidade do fósforo pelos animais, reduzindo também a contaminação ambiental. Além disso, a poluição das águas pela lixiviação do fósforo a partir de excretas pode provocar a

Tabela 4 – Dados comerciais do grupo comercial no qual as colagenases se inserem (adaptado de BRASIL, 2009)

Dados comerciais do grupo "outras proteases e seus concentrados"			
Ano	Importações US\$ (FOB)	Exportações US\$ (FOB)	Saldo US\$ (FOB)
2008	3.266.513	13.024.401	9.757.888
2009 (jan-mar)	1.000.131	4.129.004	3.128.873

eutrofização, ou seja, o crescimento exacerbado de matéria orgânica e a consequente morte dos seres vivos daquele ecossistema (ABELSON, 1999). Ainda, a pesquisa das enzimas fosfatases e peroxidases, juntamente com a análise microbiológica do leite é usada na verificação da eficiência da pasteurização.

As atividades fosfatásicas têm sido estudadas em bactérias como, por exemplo, *Lactobacillus curvatus* (MAGBOUL e McSWEENEY, 1999) e *Mycobacterium tuberculosis* (SALEH; BELISLE, 2000) e em fungos como *Aspergillus ficuum* (SHIEH *et al.*, 1969), *Aspergillus nidulans* (HARSANYI; DORN, 1972), *A. fumigatus* (BERNARD *et al.*, 2002). Segundo Tarafdar *et al.* (2001), *A. niger* libera elevada quantidade de fosfatases seguida pelo gênero *Penicillium*, o qual possui habilidade para secretar grandes quantidades de fosfatase ácida.

9 Inibidores Enzimáticos

Da mesma forma que o uso de enzimas é importante, muitas vezes faz-se importante e necessário a inibição específica de alguma enzima. A ação catalítica de uma série de enzimas pode ser reduzida inespecificamente por ação de agentes químicos, como sais, ou físicos, tais como variação de pH ou temperatura (LEHNINGER *et al.*, 2002). Porém, com o uso de moléculas adequadas é possível inibir especificamente a ação enzimática, reduzindo seu poder reacional ou mesmo extinguindo a catálise completamente (LEHNINGER *et al.*, 2002). Esta inibição pode ser irreversível ou reversível, sendo esta a forma mais comum de inibição em relação ao mecanismo de ação de fármacos.

Inibidores enzimáticos estão entres os principais produtos de ação farmacêutica, dentre os quais destacam-se as classes terapêuticas dos redutores de colesterol (inibidores da HMG-CoA redutase), antiulcerantes (inibidores da secreção ácida estomacal), antidepressivos (inibidor seletivo de recaptção da serotonina), antireumáticos não-esteroidais (AINES), inibidores da ECA (enzima conversora da angiotensina), entre outros (WTN, 2009). Esses

produtos garantem às empresas que detêm suas patentes, bilhões de dólares anualmente. Somente os quatro fármacos mais rentáveis baseados em inibição enzimática proporcionaram um lucro, no ano de 2007, de mais de 30 bilhões de dólares (tabela 5; WTN, 2009).

Na inibição irreversível, normalmente, ocorre inativação covalente da enzima. Isso deve-se em grande parte ao ataque de grupos eletrofílicos, tais como carboxilas, carbonilas, aldeídos, entre outros, presentes no inibidor de grupos nucleofílicos situados na estrutura protéica da enzima, tais como aqueles presentes em aminoácidos como serina, cisteína, treonina e tirosina. No caso do ácido acetilsalicílico, o ataque parte do grupo acetila e envolve uma serina do sítio ativo da prostaglandina endoperóxido sintetase (PGHS). A descoberta deste mecanismo de ação valeu a John R. Vane o Prêmio Nobel de Medicina em 1982.

São de particular interesse para o ramo farmacêutico os inibidores enzimáticos de proteases ou peptidases. Entre as classes de interesse na inibição estão as serino-, metalo-, cisteíno- e aspártico-proteases. As serino-proteases tem-se particular interesse no combate a problemas inflamatórios como a asma e a artrite reumatóide além da criação de fármacos anticoagulantes que atuem sobre a cascata de coagulação, composta por uma série de proteases (LEUNG *et al.*, 2000). As cisteíno-peptidases agem preferencialmente em meio redutor e em condições de pH moderadamente ácido, estando envolvidas no crescimento, replicação e alimentação de uma série de protozoários de interesse e na sua interação com o hospedeiro (LECAILLE *et al.*, 2002). Atualmente, são alvos para desenvolvimento de novos protótipos, peptidases de protozoários como *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, entre outros. Na classe das metalo-proteases, já há produtos em amplo consumo pela população como o enalapril e captopril e os inibidores da ECA. A classe das aspártico-proteases apresenta o primeiro caso de sucesso na construção de inibidores enzimáticos a partir de técnicas computacionais. Nelfinavir, ritonavir entre

Tabela 5 – Medicamentos baseados em inibidores enzimáticos mais vendidos em 2007 (adaptado de WTN 2009)

Posição no ranking	Produto / Empresa / Fármaco	Doença	Bilhões de dólares	Crescimento
1	Liptor (Pfizer / Astellas Pharma) (atorvastatina)	Colesterol elevado	\$13,7	1%
2	Plavix (Bristol-Myers Squibb / Sanofi-Aventis) (clopidogrel)	Trombose	\$8,1	28%
5	Remicade (Johnson & Johnson, Schering-Plough, Mitsubishi Tanabe) (infiximab)	Artrite reumatóide	\$5,3	18%
8	Divan (Novartis) (valsartan)	Hipertensão	\$5,0	19%

outros, foram desenvolvidos a partir do estudo da interação do saquinavir com a enzima alvo, a protease do HIV-1.

Inibidores da monoamino oxidase (IMAO) elevam a concentração de acetilcolina e dopamina no sistema nervoso central, têm boa ação antidepressiva. O uso concomitante de inibidores da β -lactamase microbiana, como o ácido clavulânico e o tazobactan, a fim de aumentar a ação destes medicamentos sobre bactérias produtoras de β -lactamase, representam outros exemplos de inibidores enzimáticos de importante uso na clínica.

10 Considerações finais

O Brasil vem passando por um período de plena expansão no setor biotecnológico, em que empresas de inovação estão sendo criadas buscando competitividade internacional. Além disso, o enorme potencial da nossa biodiversidade, em que novas espécies de microrganismos, animais e plantas estão por serem descobertas, poderá trazer melhoria da qualidade de vida da sociedade com novas moléculas e, conseqüentemente, novos produtos. Nesse contexto, órgãos gestores, sociedade e comunidade científica devem fortalecer suas relações visando a maior investimento no desenvolvimento de tecnologias a fim de ampliar a produção nacional e a exportação de enzimas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e ao CNPq o apoio recebido.

Referências

- ABELSON, P. H. A potencial phosphate crisis. *Science*, v. 283, n. 5410, p. 2015, 1999.
- AEHLE, W. *Enzymes in Industry*. 3 ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 489p., 2007.
- ALMEIDA, E. C. C.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; BRANCO, L. R. R. C.;
- PINHO, R. T. **Método e kit aplicados à detecção de Doença de Chagas em saliva**. Patente número: PI0000886-9, 2000.
- BALADAMENTE, M.A.; HURST, L.C. Efficacy and Safety of Injectable Mixed Collagenase Subtypes in the Treatment of Dupuytren's Contracture. *The Journal of Hand Surgery*, v. 32, n. 6, p. 767-774, 2007.
- BERNARD, M.; MOUYNIA, I.; DUBREUCQ, G.; DEBEAUPUIS, J.P.; FONTAINE, T.; VORGAS, C.; FUGLSANG, C.; LATGÉ, J.P. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (phoap) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*. v. 148, p. 2819-2829, 2002.
- BI, Y. *et. al.* Identification of tendon stem / progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine*, v. 13, n. 10, p. 1219-1227, 2007.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. *et. al.* Matriz Metalloproteinases: A Review. *Critical Review in Oral Biology and Medicine*, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.
- BON, E.P.S.; COSTA, R.B.; DA SILVA, M.V.A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; FREITAS, S.P.;

- FERRARA, M.A. Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil. *In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M.L. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado.* Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, p. 433-488.
- BOND, M.D.; VANWART, H.E. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. **Biochemistry**, v. 23, n. 13, p. 3085-3091, 1984.
- BRASIL. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet. Alice Web. Disponível em: < <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em 29 abril 2009.
- BUCHNER, E. **Cell-Free Fermentation**. Nobel Lecture, 1907. Nobelprize.org. Elsevier Publishing Company. Disponível em <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1907/buchner-lecture.html> Acesso em 6 junho de 2009.
- CARBALLO, J. Biotecnología e alimentos transxénicos. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de alimentos, v. 3, n. 5, p. 314-321, 2002.
- CRUZ, M.E.M.; MARTINS, M.B.; CARMO, M.L.; GASPAS, M.M.; OLIVEIRA, E.M.M.; FERRARA, M.A. Enzimas em Medicamentos e Diagnóstico. *In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M.L. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado.* Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, p. 307-331.
- GACESA P.; HUBBLE J. **Tecnología de las enzimas**. Zaragoza: Acribia, S. A., 1990, 206p.
- HARSANYI, Z; DORN, G. L. Purification and Characterization of acid phosphatase from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v. 110, n. 1, p. 246- 255, 1972.
- JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6. ed., Aspen Publition, 2000.
- JENNISON, M.W. Bacterial Collagenase. **Journal of Bacteriology**, v. 50, n. 3, p. 369-370, 1945.
- KANTH, S.V. *et al.*, Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. **Dyes and Pigments**, v. 76, n. 2, p. 338-347, 2008.
- KILIKIAN, B.V.; PESSOA JUNIOR, A. Purificação de produtos biotecnológicos. *In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W (Coord.). Biotecnologia Industrial.* São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 2, p. 493-521.
- KIM, M. *et al.* Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 12, p. 1627-1635, 2007.
- KOPETZKI, E.; LEHNERT, K.; BUCKEL, P. Enzymes in diagnostics: achievements and possibilities of recombinant DNA technology. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 688-704, 1994.
- LAWYER, F.C.; STOFFEL, S.; SAIKIT, R.K.; MYAMBOS, K.; DRUMMOND, R.; GELFAND, D. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 11, p. 6427-6437, 1989.
- LECAILLE, F.; KALETA, J.; BROMME, D. Human and parasite papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4459-4488, 2002.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**, 3 ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002, 975p.
- LEUNG, D.; ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. P. Peptidase inhibitors: current status and future prospects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 305-341, 2000.
- LI, W. *et al.* A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 2, p. 614-620, 2007.
- LIMA, C.A. *et al.* Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 315-320, 2009.
- MAGBOUL, A.A.A.; MCSWEENEY, P.L.H. Purification and properties of an acid phos-

- phatase from *Lactobacillus curvatus* Dpc2024. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 849-885, 1999.
- MAKAROV, A.A.; ILINSKAYA, O.N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. **FEBS Letters**, v. 540, p. 15-20, 2003.
- MANOLOV, R.J. Ribonuclease production by free and immobilized *Aspergillus clavatus* cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 29-33, 1993.
- MANZUR, M.J.; MUÑOZ, R.V.; LUCERO A.A.; AYUB, M.J.; ALVAREZ, S. E.; CIUFFO, G.M. Production of recombinant enzymes of wide use for research. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, 2006.
- NARTA, U.K.; KANWAR, S.S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology Hematology** v. 61, n. 3, p. 208-21, 2007.
- NETO, J.A. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biociencia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 3, p. 405-408.
- NEWMAN, J.D.; TURNER A.P.F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 2435-2453, 2005.
- NORTHROP, J.H. **The preparation of pure enzymes and virus proteins**. Nobel Lecture, 1946. Nobelprize.org. Elsevier Publishing Company. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1946/northrop-lecture.html> Acesso em 6 junho de 2009.
- ÖZCAN, C. *et al.* Enzymatic debridement of burn wound with collagenase in children with partial-thickness burns. **Burns**, v. 28, n. 8, p. 791-794, 2002.
- PRICE, N.C.; STEVENS, L. **Fundamentals of Enzymology: The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins**. 3 ed. Grã Bretanha: Oxford university press, 1999.
- PRODABI3. **RNA autocatalítico**. Processamento de dados em bioquímica e imunologia. ICB, UFMG. Disponível em http://www.icb.ufmg.br/prodabi/prodabi3/grupos/grupo1/autocatalise_de_rna.htm. Acesso em 26 de maio de 2009.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. Tradução de Patrícia Lydie Voeux e Antônio José Magalhães da Silva Moreira. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- RITTIÉ, L.; PERBAL, B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. **Journal of cell communication and signaling**, v. 2, p. 25-45, 2008.
- ROITT I.; BROSTOFF J.; MALE D. **Imunologia**. São Paulo: Editora Manole, 1999, 423p.
- ROTH, J.M.; TANESE, N.; GOFF, S.P. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 16, p. 9326-9335, 1985.
- SALEH, M.T.; BELISLE, J.T. Secretion of an acid phosphatase (sapm) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6850-6853, 2000.
- SANGER, F. **The Chemistry of Insulin**. Nobel Lecture, 1958. Nobelprize.org. Elsevier Publishing Company. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1958/sanger-lecture.html> Acesso em 6 de junho de 2009.
- SAXENA, S.K. *et al.* Inhibition of HIV-1 Production and Selective Degradation of Viral RNA by an Amphibian Ribonuclease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20783- 20788, 1996.
- SHIEH, T.R., WODZINSKI, R.J., WARE, J.H. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. **Journal of Bacteriology**, v. 100, n. 3, p. 1161-1165, 1969.
- SILVERMAN, R.B. The organic chemistry of enzyme-catalyzed reaction. Edição Revisada. Academic Press, 2002.

- SUPP, D.M.; WILSON-LANDY, K.; BOYCE, S.T. Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. **FASEB Journal**, v. 16, n. 8, p. 797-804, 2002.
- TAKAHASHI, K.; MOORE, S. Ribonuclease T1. *In*: BOYER, P. D. **The enzymes**, 3. ed. New York: Academic Press, 1982.
- TARAFDAR, J. C.; YADAV, R. S.; MEENA, S. C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **The Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 164, p. 279-282, 2001.
- ÚSUGA, X.; RUGELES, M. T. **Ribonucleasas: Su potencial terapéutico en infecciones virales**. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11n2/v11n2a03.pdf>>. Acesso em 26 de abril de 2009.
- WEIL, L.; KOCHOLATY, W. Studies on the proteinase of *Clostridium histolyticum*. **Biochemical Journal England**, v. 31, n. 8, p. 1255-1267, 1937.
- WOLBURG, H. *et al.* Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 1347-1357, 1994.
- WONG, C.M., WONG, K.H., CHEN, X.D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 927-938, 2008.
- WTN. Wisconsin Technology Network. Disponível em: <<http://wistechnology.com/articles/4924/>> Acesso em 28 de abril de 2009.
- XIONG, Y. *et al.* Enhanced production of extracellular ribonuclease from *Aspergillus niger* by optimization of culture conditions using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 27-32, 2004.
- XIONG, Y. *et al.* Purification, kinetic and thermodynamic studies of a new ribonuclease from a mutant of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 348-356, 2005.
- YANG, S.; ROTHMAN, R.E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 337-348, 2004.
- YOLKEN, R.H. Enzymatic analysis for rapid detection of microbial infection in human body fluids: An Overview. **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1490-1498, 1981.
- ZORN-PAULY, K. *et al.* L-type and T-type Ca²⁺ current in cultured ventricular guinea pig myocytes. **Physiology Research**, v. 53, n. 4, p. 369-377, 2004.