

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

SÍNTESE DE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS EM MICRORREATORES

Julia Brito Machado

São Paulo
2025

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

SÍNTESE DE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS EM MICRORREATORES

Julia Brito Machado

Trabalho de Conclusão do Curso de
Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador: Dr(a) Paulo Victor Cuesta Calvo.

São Paulo
2025

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer por este Trabalho de Conclusão de Curso, pela conclusão desta graduação e etapa na minha vida: agradeço primeiramente a Deus, cuja presença constante me sustentou ao longo de toda a trajetória acadêmica, nos momentos de fraqueza encontrei no Senhor a força e a coragem para prosseguir, e nas adversidades Seu amparo foi essencial para que eu não desistisse.

À minha família, principalmente aos meus pais, agradeço por todo o amor e apoio. Em cada gesto de cuidado e palavra de incentivo, encontrei motivo para seguir em frente. Também, agradeço aos meus irmãos e cunhadas que sempre me apoiaram e me aconselharam neste momento de dificuldade, me ajudando a perseverar nesta caminhada e, aos meus sobrinhos que foram fonte de alegria em dias difíceis e me deram ânimo para continuar.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado durante essa jornada, registo meu agradecimento pelo apoio, pelos abraços, pelo companheirismo, incentivo e encorajamento; suas presenças foram fundamentais para tornar esse percurso mais leve e possível.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta etapa, meu muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Condensação de dois aminoácidos para formar um dipeptídeo.	22
Figura 2 - Representação geral da formação de uma ligação amida.	24
Figura 3 - Representação geral das sínteses SPPS e SPS.	25
Figura 4 - Níveis de estrutura nas proteínas.	27
Figura 5 - Esquema geral da síntese proteica livre de células.	29
Figura 6 - <i>Native Chemical ligation</i> (NCL).	30
Figura 7 - Representação geral da EPL.	31
Figura 8 - Ligação de Staudinger.	31
Figura 9 - Síntese do dipeptídeo homofenilalanina.	33
Figura 10 - Tetrapeptídeo sintetiza por Flögel et al. (2006).	34
Figura 11 - Esquema geral sobre a síntese realizada por Watts et al. (2001).	35
Figura 12 - SDS-PAGE da Proteína EGFP.	36
Figura 13 - Fluorescência de BFP/GFP na matriz dos microrreatores de oito canais após a reação de síntese de proteínas.	38

LISTA DE ABREVIASÕES

UV	Ultravioleta
DMD	Dispositivos digitais de microespelhos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SPS	Síntese em solução
SPFS	Síntese de peptídeos em fase sólida
SPPS	Síntese de peptídeos em fase sólida
Boc	t-butiloxicarbonila
TFA	ácido trifluoroacético
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonila
CFPS	Cell-Free Protein Synthesis
RNA	Ácido ribonucleico
NCL	Native Chemical ligation
EPL	Expressed protein ligation
IFA	Insumo farmacêutico ativo
NMM	N-metilmorfolina
LC-MS	Espectrometria de massas
Dmab	4-{N-[1-(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutil]-amino}benzil
EDCI	1-(3-dimetilaminopropil)-cloridrato de 3-etilcarbodiimida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
GFP	Proteína Verde Fluorescente ou Green Fluorescent Protein
sfGFP	Superfolder Green Fluorescent
BFP	Proteína Fluorescente Azul ou Blue Fluorescent Protein

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGIA DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
4. MICRORREATORES	12
4.1. MATERIAIS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE MICRORREATORES	13
4.1.1. Vidro	14
4.1.2. Metal	14
4.1.3. Polímeros	14
4.2. PRODUÇÃO DE MICRORREATORES	15
4.2.1. Produção por corte mecânico	15
4.2.2. Produção por impressão 3D	15
4.2.1.1. Modelagem por Deposição fundida	16
4.2.2.2. Fusão Seletiva a Laser	16
4.2.2.3. Estereolitografia	16
4.3. REVESTIMENTO DE MICRORREATORES	17
5. QUÍMICA VERDE	17
5.1 IMPORTÂNCIAS E PRINCÍPIOS	18
5.1.1. Prevenção, economia atômica, síntese química com redução de riscos e design de produtos mais seguros	18
5.1.2. Solventes e Auxiliares Mais Seguros	19
5.1.3. Eficiência Energética	19
5.1.4. Uso de Matérias-Primas Renováveis	19
5.1.5. Redução de Derivados	20
5.1.6. Catálise	20
5.1.7. Design para Degradação	20
5.1.8. Análise em Tempo Real para Prevenção da Poluição	20
5.1.9. Química Intrinsecamente Mais Segura para Prevenção de Acidentes	21
5.1.10. Breve síntese da Aplicação e Relevância na indústria farmacêutica	21
6. PEPTÍDEOS	21
6.1. DEFINIÇÃO E ESTRUTURA	22
6.2. FORMAS DE SÍNTESE	22
6.2.1. Síntese via DNA recombinante	23

6.2.2. Síntese Enzimática	23
6.3. SÍNTESE QUÍMICA	24
6.3.1. SPFS e síntese clássica	25
6.3.1.1. Estratégia Boc	25
6.3.1.2. Estratégia Fmoc	26
6.4. BREVE EXPOSIÇÃO DOS PEPTÍDEOS NA ÁREA FARMACÊUTICA.....	26
7. PROTEÍNAS	26
7.1. DEFINIÇÃO E ESTRUTURA	27
7.2. FORMAS DE SÍNTESE	28
7.2.1. Síntese de proteínas livre de células (Cell-Free Protein Synthesis CFPS)	28
7.2.2. Síntese química de proteínas	30
7.2.2.1. Native Chemical ligation (NCL)	30
7.2.2.2. Técnicas Alternativas a NCL.....	30
7.3. BREVE EXPOSIÇÃO DAS PROTEÍNAS NA ÁREA FARMACÊUTICA.....	32
8. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM MICRORREATORES	32
8.1. SÍNTESE DO DIPEPTÍDEO β^3 HOMOFENILALANINA– β^3 HOMOFENILALANINA	32
8.2 SÍNTESE DO TETRAPEPTÍDEO β	33
8.3 SÍNTESE DO DIPEPTÍDEO DE BETA-ALANINA	34
9. SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM MICRORREATORES	35
9.1. PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE APRIMORADA	35
9.2. PROTEÍNA SUPERFOLDER GREEN FLUORESCENT (SFGFP)	37
9.3. PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP) E PROTEÍNA FLUORESCENTE AZUL (BFP)	37
10. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

Julia B. M. **Síntese de peptídeos e proteínas em microrreatores.** 2025. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2025.

Palavras-chave: microrreatores, química verde, peptídeos, proteínas.

Este Trabalho de Conclusão de Curso teve como foco a investigação da síntese de peptídeos e proteínas em fluxo contínuo por meio de microrreatores, considerando os avanços tecnológicos e os princípios da Química Verde. A relevância do tema se sustenta na demanda crescente por métodos de síntese maus eficientes, sustentáveis e com maior aplicabilidade na indústria farmacêutica. Peptídeos e proteínas são biomoléculas essenciais, formadas por aminoácidos, com funções estruturais, regulatórias e terapêuticas no organismo. A síntese destas moléculas permite aplicações amplas, como a produção de diversos insumos farmacêuticos ativos e fármacos específicos para diversas doenças. Foram analisados estudos de síntese de peptídeos e proteínas em microrreatores, dispositivos estes que possuem grande potencial em termos de produção, além de terem aspectos alinhados aos princípios da química verde. Entre as sínteses analisadas temos a síntese de dipeptídeos, alguns polipeptídeos e também a síntese de proteínas, que se mostraram com bom rendimento e eficiência de produção.

ABSTRACT

This Final Project focused on the investigation of continuous-flow synthesis of peptides and proteins using microreactors, considering technological advances and the principles of Green Chemistry. The relevance of the topic lies in the growing demand for more efficient and sustainable synthesis methods with greater applicability in the pharmaceutical industry. Peptides and proteins are essential biomolecules, formed by amino acids, with structural, regulatory, and therapeutic functions in the body. The synthesis of these molecules allows for a wide range of applications, such as the production of various active pharmaceutical ingredients and specific drugs for different diseases. Studies on the synthesis of peptides and proteins in microreactors were analyzed. Microreactors are devices that have great potential in terms of production and present characteristics aligned with the principles of Green Chemistry. Among the syntheses analyzed are dipeptides, some polypeptides, and proteins, all of which demonstrated good yield and production efficiency

1. INTRODUÇÃO

Proteínas são moléculas que compõe a base da matéria orgânica. Estas biomoléculas e seus componentes, peptídeos e aminoácidos, são intrínsecos a diversas células, tecidos e seres vivos. As proteínas controlam praticamente todos os processos que ocorrem em uma célula e apresentam uma variedade quase infinita de funções (NELSON; COX, 2022). Graças a isto, o estudo dessas substâncias vem sendo um tópico de interesse dentro da ciência, muito já foi descoberto, desde os princípios básicos até a aplicações variadas.

As proteínas e os peptídeos possuem em sua composição um material em comum, os aminoácidos. Esta unidade básica é uma estrutura molecular que, em sua grande maioria, é composta por um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo carbono. Os aminoácidos diferem-se uns dos outros em suas cadeias laterais, ou grupos *R*, que variam em estrutura e tamanho (NELSON; COX, 2014). Os aminoácidos ligam entre si utilizando a ligação peptídica, que corresponde a uma condensação entre a carboxila e o grupo amino e, como resultado, a formação de uma molécula de água (NELSON; COX, 2022).

Embora algumas vezes se use peptídeo e proteína como sinônimos, as moléculas chamadas de polipeptídeos têm massas moleculares abaixo de 10.000, ao passo que as chamadas de proteínas têm massas moleculares mais elevadas (NELSON; COX, 2022). Como anteriormente dito, as proteínas são moléculas de grande carga molecular e sua estrutura possui diferentes níveis: a estrutura primária, a estrutura secundária a terciária e a quaternária; todas serão explicadas mais detalhadamente no decorrer deste trabalho de conclusão de curso (Nelson; Cox, 2014).

A síntese de peptídeos, bem como de proteínas, de forma química, possibilita que as moléculas tenham maior aplicabilidade nos campos farmacêutico, terapêutico, imunológico, alimentar, à produção de vacinas ou, ainda, como blocos construtivos de outras moléculas com ação biológica (DONG et al., 2024; MACHADO et al., 2004).

Com ênfase no segmento farmacêutico, existem uma série de fármacos com base nessas classes de moléculas, como Forteo® (trata osteoporose), Abarelix (trata câncer de próstata), Exenatina e Lyxumia (tratam diabetes *mellitus* tipo 2), Kyprolis® (trata mieloma múltiplo) e Centerdenite (trata insuficiência

cardíaca) (WANG et al., 2022). Também, existem estudos nas áreas para produção insulinas, hormônios de crescimento, entre outros (MELO; CUNHA JÚNIOR; FIALHO, 2012). Entretanto, a complexidade e diversidade dos processos de síntese exigem métodos mais inovadores. O processo de síntese dessas substâncias pode ser de forma variada, contudo, é de suma importância um aprofundamento na síntese química, tendo em vista a versatilidade que este tipo de procedimento oferece.

Atualmente, um dos pontos a ser considerado ao desenvolver um processo de síntese é a aplicação da química verde, *green chemistry*, que traz um conceito sobre síntese química sustentável, possuindo 12 princípios, sendo alguns destes: trabalhar com baixas quantidades de reagentes, a diminuição da quantidade de resíduos e rotas sintéticas mais sustentáveis (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; IVANKOVIĆ et al., 2017). Um equipamento que obedece a estes princípios consiste no microrreator, que possibilita a busca por novas condições operacionais maximizem o rendimento e a seletividade das reações de síntese, diminuindo a geração de subprodutos (BAUMANN et al., 2020).

Dessa forma, torna-se necessário investigar as vantagens da síntese de peptídeos e proteínas em microrreatores, pois, tais resultados podem ensejar em uma produção mais eficiente e sustentável, trazer economia em energia e em material e apresentar melhorias em pontos de otimização em aplicações industriais, este é o ponto de interesse e de pesquisa do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste Trabalho de Conclusão de Curso, consistiu em revisar, de forma literária, artigos científicos que estejam dentro do escopo de síntese de peptídeos e proteínas em microrreatores em fluxo contínuo. Para que este trabalho fosse concluído, houve a coleta e leitura de trabalhos científicos (artigos, revisões de literatura, teses e monografias) relevantes a este projeto. No mais, dentre os objetivos específicos temos:

- (1) Mapeamento e coleta de artigos científicos recentes dentro do tema de interesse para este Trabalho de Conclusão de Curso;
- (2) Análise dos panoramas estipulados nos textos científicos

identificados;

- (3)** Análise do cenário geral sobre síntese química de peptídeos e proteínas;
- (4)** Revisão bibliográfica sobre a química verde e sua aplicabilidade na produção industrial;
- (5)** Revisão bibliográfica do processo de síntese de peptídeos e proteínas em fluxo em microrreatores.

3. METODOLOGIA DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este trabalho se caracteriza como uma revisão literária com abordagem qualitativa. Reforça-se que a pesquisa literária teve como objetivo reunir, analisar e interpretar informações que estejam dentro do escopo de síntese de peptídeos e proteínas em microrreatores em fluxo contínuo.

A metodologia adotada consistiu-se na coleta, leitura e análise de trabalhos científicos, incluindo artigos e revisões de literatura, redigidos em português e inglês; a seleção dos materiais foi orientada pela relevância ou atualidade ao tema deste trabalho.

A busca por artigos foi realizada na internet, utilizando-se de ferramentas de busca e sites sem cunho científico, entretanto, o foco principal da pesquisa foi realizada em bases de dados científicas como: *Science Direct*, *PubMed*, *Scopus*, *Web of Science* e *Mendley*. Foram utilizados termos chaves específicos relacionados ao tema do trabalho, tanto em português quanto em inglês, para se reunir os artigos de interesse.

4. MICRORREATORES

Microrreatores são estruturas em tamanho miniatura, com canais de reação na ordem de micrometros, mas que apresenta grande potencial na área farmacêutica. Este tipo de dispositivo vem ganhando bastante destaque graças a suas vantagens e pode ser considerada uma nova forma de inovação na síntese química industrial (DOMÍNGUEZ et al., 2021). Como mencionado acima, microrreatores são pequenos dispositivos que possuem a mesma função de reatores químicos comuns, eles são equipamentos projetados para conduzir reações químicas de forma controlada e eficiente (ZHANG et al., 2023).

Reatores químicos usuais, como os reatores em batelada, apesar de grandemente empregados na indústria, apresentam algumas dificuldades ou obstáculos para a indústria química, pois, o aumento na escala de produção pode comprometer a reproduzibilidade, inclusive torna difícil o controle de características como pH e temperatura. Assim, é nítida a necessidade de empregar uma tecnologia segura e eficiente, bem como que maximize o resultado pretendido (ZHANG et al., 2025).

Ao analisar as limitações de reatores comuns, em termos de escalonamento do processo, vemos que os microrreatores apresentam vantagens em diversos aspectos, assim, Zhang et al. (2025. p1) as descreve de forma concisa:

“Ao contrário dos reatores tradicionais, os sistemas microfluídicos se destacam por oferecer rápida transferência de calor e massa, permitindo a obtenção rápida das condições de reação desejadas e o controle preciso dos parâmetros de reação, graças ao volume das reações em escala micrométrica. Adicionalmente microrreatores incentivam a síntese contínua e aumentam a produtividade; além disso, o rendimento garante alta reproduzibilidade em várias execuções e oferece escalabilidade e integração”.

Não é uma surpresa o potencial que os microrreatores apresentam e sua aplicabilidade na indústria se torna evidente. É possível destacar algumas implementações desta tecnologia em nível industrial, como análise de células e de proteínas, estudos de cinética e mecanismos de reação e, também, análises de alto rendimento em química analítica (SANDEL; WEBER; TRAPP, 2012; TU et al., 2010; YI et al., 2014).

4.1. MATERIAIS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE MICRORREATORES

A confecção de um microrreator deve ser cuidadosamente selecionada e planejada, pois o material empregado deve possuir uma série de propriedades que tornam viável a funcionalidade do equipamento, de modo a garantir: durabilidade, resistência mecânica, boa tolerância térmica, elétrica, e, principalmente, o tornar quimicamente inerte para as reações a serem realizadas (DOMÍNGUEZ et al., 2021). A seguir, serão apresentados os materiais mais comuns na fabricação desses dispositivos: vidro, metal e polímeros.

4.1.1. Vidro

Vidros são frequentemente utilizados em equipamentos industriais, ademais, este tipo de material possui aspectos que o tornam um bom candidato para a produção de microrreatores, tais como a suas boas propriedades químicas e grande estabilidade estrutural (TOMAŠIĆ; JOVIĆ, 2006). Atualmente para construção de microrreatores, vidros com borossilicato são os mais utilizados, mas também são usados vidros com sílica fundida (FRANK, 2008).

Apesar da sua empregabilidade, vidros apresentam uma certa fragilidade quando submetidos a uma determinada pressão causando quebra na estrutura, isto acaba reduzindo os procedimentos possíveis na produção de microrreatores. Quanto às técnicas de corte, emprega-se o meio automatizado com geometria indefinida para produção, como a lapidação, o jato de areia e o polimento (FRANK, 2008).

4.1.2. Metal

Metais e ligas metálicas são também eficientes alternativas para a produção de microrreatores, principalmente para reações em fase gasosa, graças a sua alta resistência térmica e mecânica (SANZ et al., 2013; WILES; WATTS, 2014). Contudo deve-se escolher muito bem a reação na qual se pretende, pois tais materiais apresentam grande reatividade e expansão térmica, que compromete a integridade da estrutura e a performance reacional, prejudicando a maximização dos resultados (DOMÍNGUEZ et al., 2021)

4.1.3. Polímeros

Polímeros possuem grande aplicabilidade na fabricação dos microrreatores, em razão do baixo custo, propiciando a produção em massa desses dispositivos, com foco na impressão 3D (DOMÍNGUEZ et al., 2021; CASTEDO et al., 2016, 2017). Há relatos na literatura da produção de dispositivos de silicone usando a polimerização de polidimetilsiloxano.

Em contrapartida, mesmo com a produção em grande escala, seja por impressão 3D ou não, polímeros podem não ser melhor opção devido a sua

incompatibilidade com certos solventes e a sua baixa resistência a altas temperaturas e altas pressões (DOMÍNGUEZ et al., 2021).

4.2. PRODUÇÃO DE MICRORREATORES

A tecnologia que envolve a produção de um microrreator pode se apresentar como um obstáculo ou um aliado. Por um lado, temos a estrutura interna do microrreator, que dependendo da sua complexidade pode inibir ou dificultar a fabricação do equipamento. Existem novas tecnologias e inovações que trazem um novo panorama sobre a produção desse tipo de dispositivo, tais como a produção por corte mecânico e por impressão 3D.

4.2.1. *Produção por corte mecânico*

A produção de um microrreator por corte mecânico envolve técnicas que, como o próprio nome revela, envolvem a corte do material base do microrreator por meio de maquinário, onde, entre as técnicas típicas temos microfresagem, microtorneamento, microperfuração e micro retificação (DOMÍNGUEZ et al., 2021).

O tamanho do canal é muito relevante, dependendo do seu tamanho e complexidade do dispositivo, a precisão pode ser mantida ou reduzida. Quando o tamanho dos microcanais se reduzem, questões como a geometria da ferramenta de corte, tornam-se cruciais para a precisão e integridade e qualidade do elemento produzido. No geral a produção por cortes mecânicos dos equipamentos abordados neste trabalho apresentam um bom nível de precisão e pode ser aplicado em materiais de diversos aspectos: metais, vidros, cerâmicas ou polímeros (DOMÍNGUEZ et al., 2021).

4.2.2. *Produção por impressão 3D*

A impressão 3D oferece um novo meio de produção para diversos equipamentos e estruturas, inclusive para microrreatores. Esta técnica consiste na montagem “de camada por camada” para criação dos objetos (PARRA-CABRERA et al., 2018). O objeto 3D é desenhado e planejado com o auxílio de

softwares computacionais; dentro ramo de impressão 3D há algumas formas de se produzir microrreatores, dentre delas abordaremos 3 tipos: modelagem por deposição fundida, fusão seletiva a laser e estereolitografia.

4.2.1.1. Modelagem por Deposição fundida

A modelagem por deposição fundida constitui-se pela deposição de termoplásticos camada por camada. No momento de inserção, o material base do microrreator é aquecido até o estado na qual ele se encontra como semiderretido, a partir disso, o material é injetado na estrutura a ser construída, se resfria e endurece sobre a camada anteriormente depositada na estrutura em construção. De acordo com Domínguez et al. (2021), a modelagem por deposição fundida possui a desvantagem de poder aplicar-se somente a polímeros do tipo termoplástico, mas este tipo produção é a mais acessível por não ser uma técnica tão cara.

4.2.2.2. Fusão Seletiva a Laser

A produção por fusão seletiva a laser se compõe como uma técnica na qual um raio laser, de grande magnitude, é incidido sobre o pó metálico para fundi-lo com um conjunto de camadas sobrepostas. Assim, cada camada é derretida e fundida de acordo com dados computadorizados (DOMÍNGUEZ et al., 2021). Neste tipo de técnica o material utilizado geralmente são ligas metálicas com titânio, alumínio, cobalto, cromo, molibdênio, entre outros (HURT et al., 2017).

Por fim, Domínguez et al. (2021) relataram que a aplicação do raio laser de alta temperatura inviabiliza o uso de materiais como polímeros e que a técnica em si é mais cara, tornando-a menos acessível como outros meios de fabricação.

4.2.2.3. Estereolitografia

Estereolitografia é uma técnica que utiliza luz UV (ultravioleta) para solidificar resinas fotopoliméricas. O presente método usa dispositivos digitais de microespelhos (DMD) para criar fotomáscaras dinâmicas e formar estruturas 3D

complexas por fotopolimerização em camadas, utilizando misturas de epóxis e acrilatos com fotoiniciadores (GOU et al., 2014; PARRA-CABRERA et al., 2018).

4.3. REVESTIMENTO DE MICRORREATORES

No processo de produção de microrreatores há uma etapa tão crucial quanto a de produção: o procedimento de revestimento do microrreator. O revestimento é crucial, pois, é nessa etapa que o catalisador utilizado para reação química é depositado na parede do microrreator. Como os microrreatores podem ser fabricados a partir de diferentes tipos de materiais, a escolha do método para o revestimento dependerá da compatibilidade química e a resistência térmica do material usado (DOMÍNGUEZ et al., 2021).

Temos diversos tipos de revestimento, Domínguez et al. (2021) relata métodos como revestimento por spray, deposição de vapor químico, deposição eletroforética, entre outros. Aqui nós relataremos uma das técnicas mais usadas: revestimento sol-gel.

O revestimento sol-gel é uma técnica composta pela deposição da solução ou sistema coloidal sobre a face do equipamento (MEILLE, 2006). Por ser um método relativamente simples ele possui grande aplicabilidade, justificando a sua popularidade como escolha para o processo de revestimento. Além disso, uma das suas maiores vantagens é o fato de que uma grande variedade de soluções/sistemas coloidais com diferentes composições podem ser utilizadas. Em suma, o método sol-gel pode ser aplicado na produção de materiais porosos, em massa para catálise e revestimentos de filmes densos com baixa porosidade em vidros (HAAS-SANTO; FICHTNER; SCHUBERT, 2001).

5. QUÍMICA VERDE

Química Verde nada mais é do que um guia, um conjunto de diretrizes que visam a sustentabilidade na produção química e farmacêutica, ela tem sido amplamente adotada por indústrias cosméticas, farmacêuticas, energéticas e agrícolas (ANASTAS; EGHBALI, 2010). A seguir discorreremos mais sobre os princípios da química verde, sua aplicação e importância na indústria farmacêutica.

5.1 IMPORTÂNCIAS E PRINCÍPIOS

Como já mencionado acima, a química verde tem como meta geral a sustentabilidade, obtida, em suma, com a redução de gastos de energia, resíduos, uso de catalisadores, entre outros aspectos. Um ponto importante da química verde consiste no planejamento e esquematização, não só do processo de produção, mas também do próprio produto que se almeja alcançar com a produção (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Em realidade, a questão do design se entende para toda a etapa no ciclo de vida do produto final, inclusive o momento de degradação. Assim, o objetivo da química verde é reduzir riscos ao longo de todo o ciclo de vida do produto, de modo a demonstrar-se economicamente rentável, impactando a pesquisa, a educação e políticas governamentais (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Nesse sentido, Ivanković (2017) relata os 12 princípios da química verde, sendo estes: prevenção, economia atômica, síntese química com redução de riscos, design de produtos químicos mais seguros, solventes e auxiliares mais seguros, eficiência energética, uso de matérias-primas renováveis, redução de derivados, catálise, design para degradação, análise em tempo real para prevenção da poluição e química intrinsecamente mais segura para prevenção de acidentes.

5.1.1. *Prevenção, economia atômica, síntese química com redução de riscos e design de produtos mais seguros*

A prevenção, o primeiro princípio da química verde, seria o ato de evitar ou se prevenir do desperdício, seja o desperdício de resíduos, energia ou outros componentes de uma produção industrial (IVANKOVIĆ, 2017)

A economia atômica envolve a síntese química com a meta de que o produto final contenha o maior número possível de átomos dos reagentes. Este conceito foi introduzido por Barry Trost em 1990 e seu valor tem como significado avaliar o quão eficiente uma reação será (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

A redução de riscos envolve o desenho de uma metodologia de síntese química para criação de compostos que apresentem pouca ou nenhuma toxicidade tanto para o homem quanto para o meio ambiente (IVANKOVIĆ, 2017)

O design de produtos químicos mais seguros, determina que estes mantenham o seu propósito funcional, mas com sua toxicidade reduzida (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

5.1.2. Solventes e Auxiliares Mais Seguros

Os solventes apresentam um dos maiores desafios para a química verde, pois eles são responsáveis pela maioria do desperdício de massa em sínteses e processos. Além disso, sua volatilidade e solubilidade contribuem para a poluição do ar, água e exposição desnecessária para colaboradores (ANASTAS; EGHBALI, 2010; CURZONS et al., 2001). Assim, a química verde envolve o esquadrinhar de uma reação de uma forma que haja redução ou a dispensação do uso de solventes. Uma segunda alternativa seria o uso de solventes mais sustentáveis como a água, fluídos supercríticos, entre outros (IVANKOVIĆ, 2017).

5.1.3. Eficiência Energética

Tendo como objetivo a eficiência, evitar o desperdício de energia, em suma, isto poderia ser alcançado, por exemplo, ao se empregar a síntese de reações sob temperaturas e pressões ambientes. Além da eficiência energética, Anastas e Eghbali (2010) discorreram, também, sobre a aplicação de energia renovável na síntese química para aumentar a sustentabilidade do procedimento.

5.1.4. Uso de Matérias-Primas Renováveis

O presente princípio propõe uso de matérias-primas renováveis na síntese química, em vez de recursos não renováveis, sempre que tecnicamente e economicamente viável. Entre os materiais não renováveis, temos matérias-primas oriundas de petróleo ou gás natural, fontes estas que possuem limitações, entretanto, nas matérias denominadas como biomassa, das quais se originam de organismos vivos, apresentam a possibilidade de renovação, sendo uma alternativa no quesito sustentabilidade (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

5.1.5. Redução de Derivados

Este princípio sugere a redução da derivatização durante a síntese química. Usualmente o uso da derivatização exige o uso adicional de solvente, energia ou etapas na síntese química para a sua retirada. Um dos pontos-chave para propiciar essa redução, é a arquitetura de uma síntese química, de modo que os derivados sejam retirados com maior facilidade, ocasionando em um menor desperdício de insumos ou etapas adicionais (IVANKOVIĆ, 2017).

5.1.6. Catálise

O nono fundamento da química verde ressalta o uso de catalisadores, pois, otimizam a eficiência da reação química ao dispensar o uso de quantias estequiométricas, além de reduzir a energia de ativação e aumentar a seletividade (ANASTAS; EGHBALI, 2010). O uso de catalisadores auxilia, além das vantagens mencionadas acima, em outros princípios já abordados neste capítulo, como a eficiência energética e a redução do uso de solventes.

É substancial destacar que a síntese química em microrreatores se utiliza muito deste fundamento da química verde, pois a sua estrutura revestida de catalisadores auxilia numa síntese química mais sustentável e com maior eficiência energética.

5.1.7. Design para Degradação

O presente princípio destaca a importância de se pensar também nas etapas finais do produto almejado com a síntese química. A geração de um produto cuja degradação crie substâncias tóxicas, ou enseje na poluição do meio ambiente, é prejudicial para a química verde. Portanto, propõe-se o uso de produtos químicos que possibilitem a degradação ou biodegradação inofensiva (IVANKOVIĆ, 2017).

5.1.8. Análise em Tempo Real para Prevenção da Poluição

O décimo primeiro princípio da Química Verde enfatiza a importância de desenvolver e utilizar métodos analíticos que possibilitem não só o monitoramento

contínuo dos processos químicos em tempo real, mas também a análise sem o gasto adicional de solventes ou desperdício de reagentes. O controle de qualidade na produção industrial é etapa uma crucial e intrínseca, sendo extremamente necessária para a garantia da qualidade do produto almejado. Infelizmente a análise em tempo real não é sistemática, pois muitas metodologias ainda exigem o pré-tratamento da amostra, causando gasto de resíduos nos procedimentos de caracterização e quantificação (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

5.1.9. Química Intrinsecamente Mais Segura para Prevenção de Acidentes

O último princípio da química verde propõe que a escolha dos reagentes, até a forma em que são manuseados, seja feita com o intuito de minimizar os riscos de acidentes químico. Dessa forma, promove-se o desenvolvimento de processos intrinsecamente seguros, com baixo risco de poluição, contaminação e letalidade, em todas as etapas do processo (IVANKOVIĆ, 2017).

5.1.10. Breve síntese da Aplicação e Relevância na indústria farmacêutica

Em suma a implementação dos princípios da Química Verde na indústria farmacêutica não só aumenta os ganhos ambientais e de segurança, mas também impulsiona inovações que resultam em processos mais eficientes, sustentáveis e lucrativos.

A aplicação dos princípios da Química Verde na indústria farmacêutica é essencial para otimizar a síntese de fármacos de maneira sustentável, reduzindo a geração de resíduos, o uso de reagentes e solventes, além da utilização de catalisadores que aumentem a eficiência dos processos. Essa abordagem não só minimiza os impactos ambientais, como também resulta em processos mais econômicos e com maior rendimento.

6. PEPTÍDEOS

Peptídeos, como já mencionados neste trabalho (vide introdução), estão presentes na base da matéria orgânica e do organismo humano, sendo assim o seu estudo pode nos angariar novas descobertas e soluções para diversas áreas, inclusive médica e farmacêutica; adiante nós discorreremos sobre este composto.

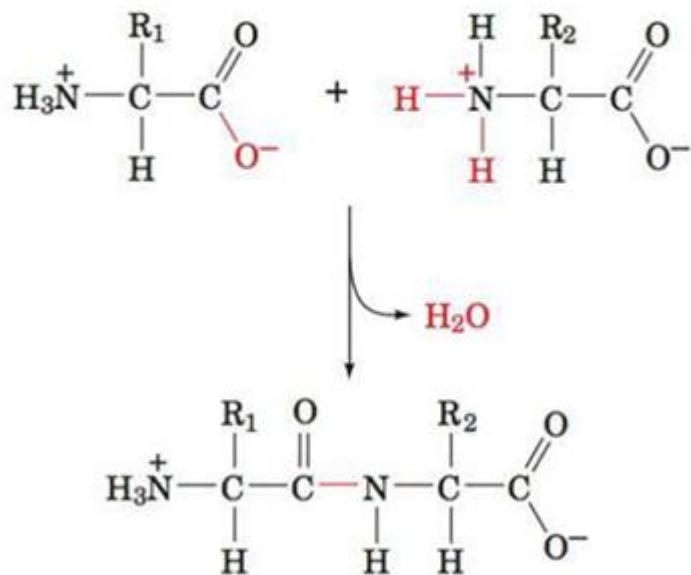
6.1. DEFINIÇÃO E ESTRUTURA

Peptídeos são moléculas criadas a partir de aminoácidos, que se ligam utilizando a ligação peptídica; eles podem conter de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas (MACHADO et al., 2004).

A estrutura dos peptídeos pode variar de pequenas cadeias com apenas dois aminoácidos (dipeptídeos) até cadeias mais longas. Embora algumas vezes se use peptídeo e proteína como sinônimos, há que se fazer uma distinção, pois, os (poli)peptídeos têm massas moleculares abaixo de 10.000, ao passo que as proteínas têm massas moleculares mais elevadas (NELSON; COX, 2014).

A Figura 1 demonstra, de forma conceitual, a condensação de dois aminoácidos para formar um dipeptídeo.

Figura 1 - Condensação de dois aminoácidos para formar um dipeptídeo.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

6.2. FORMAS DE SÍNTESE

A Síntese de peptídeos é de grande interesse acadêmico e industrial. Ao longo dos anos foram criadas algumas metodologias que possibilitam a produção dessas substâncias, das quais destacamos três: a síntese via DNA (ácido desoxirribonucleico), a síntese enzimática e a síntese química.

6.2.1. Síntese via DNA recombinante

A síntese peptídica via DNA utiliza microrganismos modificados, aproveitando métodos modernos de clonagem e expressão gênica que podem produzir peptídeos recombinantes de forma simultânea (MACHADO et al., 2004).

A expressão “gênica”, que dita a produção de peptídeos deve ser alterada a fim de obtermos a finalidade desejada, portanto, usa-se bactérias como sistema de expressão e produção. A modificação gênica de bactérias é feita a partir da inserção de plasmídeos contendo a sequência de DNA de interesse. Ressalta-se que plasmídeos são moléculas de DNA circulares, consideravelmente menores que o cromossomo bacteriano e, além disso, eles se replicam independentemente do cromossomo bacteriano, sendo facilmente separados deste (WENGENMAYER, 1983).

6.2.2. Síntese Enzimática

A síntese enzimática é composta pela produção de peptídeos não a partir de um reagente químico, mas sim de uma enzima em sua forma livre ou imobilizada (MACHADO et al., 2004).

Na síntese enzimática há três principais tipos de produção: a inversão da hidrólise, a transpeptidação e a aminólise de ésteres. A seguir discorreremos brevemente sobre elas.

A inversão da hidrólise e a transpeptidação são ambas termodinamicamente controladas, em que a reação é conduzida no sentido da síntese por meio do deslocamento do equilíbrio químico a partir da manipulação do cenário reacional, como ajustes de pH, uso de solventes orgânicos e excesso de reagentes (MACHADO et al., 2004). Já a aminólise de ésteres é um mecanismo cineticamente controlado e geralmente mais rápido quando comparado com as reações termodinamicamente controladas (MACHADO et al., 2004).

Em suma a síntese enzimática possui desvantagens e vantagens. Machado et al. (2004) relataram que este tipo de síntese traz como vantagens a alta estéreo e regiosseletividade, evita racemização e permite a produção em larga escala, porém, em sentido contrário, há fatores que influenciam de forma

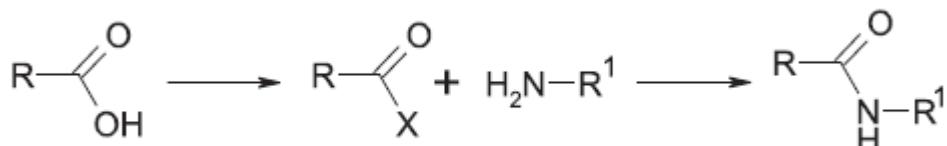
relevante o rendimento destas reações como o tipo de enzima empregada, o uso excessivo de reagentes e o uso de solventes orgânicos.

6.3. SÍNTSE QUÍMICA

A síntese química de peptídeos envolve ligação dos aminoácidos com o auxílio de um reagente químico. Em suma, um reagente químico ativa o grupo ácido carboxílico (-COOH) de um aminoácido, tornando-o mais reativo e facilitando a ligação com grupo amina livre (-NH₂) de outro aminoácido, nós temos a representação geral exemplificada na Figura 2 abaixo.

Machado et al. (2004) relataram que na síntese de peptídeos há três formas de ocorrer o acoplamento (termo usado para a ligação entre dois aminoácidos ou fragmentos peptídicos): **(1)** ativando o componente carboxílico e o expor ao componente amínico; **(2)** aminólise do componente carboxílico ativado após a sua purificação; **(3)** a formação do componente carboxílico em meio reacional na presença do componente amínico, pela adição de um reagente ativador ou acoplador.

Figura 2 - Representação geral da formação de uma ligação amida.



Fonte: MACHADO et al., 2004.

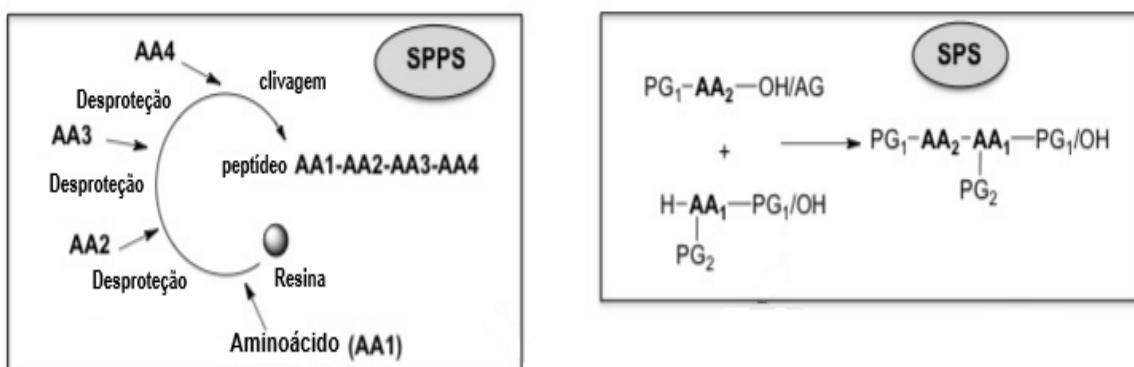
Na síntese química de peptídeos há muitos detalhes relevantes que influenciam o tipo de peptídeo sintetizado, bem como o rendimento da reação. Na reação descrita acima, os grupos funcionais reativos que não estão diretamente envolvidos na formação da ligação peptídica, devem ser previamente protegidos ou bloqueados, dessa forma, se tem um maior controle sobre a formação de subprodutos (MACHADO et al., 2004).

Há duas metodologias para se realizar a síntese química de peptídeos, e, pode se empregar duas estratégias para proteger os grupos reativos dos aminoácidos envolvidos na síntese, a seguir discutiremos cada uma delas.

6.3.1. SPFS e síntese clássica

As duas metodologias maiormente aplicadas são a síntese clássica, ou também chamada de síntese em solução ou SPS, e a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS ou SPPS). A primeira ocorre em solução e, geralmente, a α -carboxila do componente amínico é esterificada ou amidada, enquanto na SPFS o componente amínico ou grupo peptídico é ancorado por uma ligação covalente ao suporte polimérico ou resina. Assim, este grupo liga-se covalentemente ao suporte polimérico (Machado et al., 2004). A seguir nós temos a Figura 3, que exemplifica de forma geral a SPS e a SPFS:

Figura 3 - Representação geral das sínteses SPPS e SPS.



Fonte: CHANDRUDU; SIMERSKA; TOTH, 2013.

6.3.1.1. Estratégia Boc

A estratégia Boc usa um grupo protetor (t-butiloxicarbonila), que pode ser removido com ácido trifluoroacético (TFA) para proteger o grupo α -amino. As cadeias laterais dos aminoácidos doadores são protegidas por grupos que resistem ao TFA, mas que podem ser removidos com ácidos fortes ou por hidrogenólise (MACHADO et al., 2004).

Na síntese clássica, as carboxilas terminais dos aminoácidos receptores são transformadas em ésteres ou amidas, que resistem à base e são removidas com TFA, enquanto na SPFS há suportes que estabelecem com a sequência peptídica ligações estáveis à exposição ao TFA e lábeis a ácidos inorgânicos (MACHADO et al., 2004).

6.3.1.2. Estratégia Fmoc

A estratégia Fmoc usa o grupo 9-fluorenilmetoxicarbonila para proteger o grupo α -amino dos aminoácidos, este grupo é resistente ao ácido TFA, mas pode ser removido com bases orgânicas. As cadeias laterais dos aminoácidos são protegidas com grupos que são resistentes às bases, mas são removidos pelo TFA (MACHADO et al., 2004).

Na síntese clássica, as extremidades carboxílicas dos aminoácidos são modificadas (por esterificação ou amidificação) para resistirem às bases e serem removidas pelo TFA. Na SPFS, a estratégia Fmoc usa suportes com que ligam o peptídeo de forma estável a bases, mas que se rompem com TFA (MACHADO et al., 2004).

6.4. BREVE EXPOSIÇÃO DOS PEPTÍDEOS NA ÁREA FARMACÊUTICA

A presença de peptídeos na vida cotidiana pode ser muita das vezes invisíveis, mas sempre presentes: estas biomoléculas têm ganhado destaque na área farmacêutica e atualmente, são utilizados no tratamento de diversas condições; muitos peptídeos atuam como hormônios, neurotransmissores, toxinas, e inclusive adoçantes. (Machado et al., 2004). Podemos citar alguns exemplos notáveis: um dos primeiros exemplos seria a produção recombinante de insulina, há também casos de produção de análogos de hormônios, como a liraglutida, teduglutida e semaglutida. (HAMAD et al., 2021; MACHADO et al., 2004; WANG et al., 2022).

7. PROTEÍNAS

Além dos peptídeos, as proteínas também são compostos base de diversos materiais orgânicos, inclusive do organismo humano; tornando o seu estudo crucial para o entendimento e aprimoramento de diversas áreas. A seguir discorreremos sobre esta molécula.

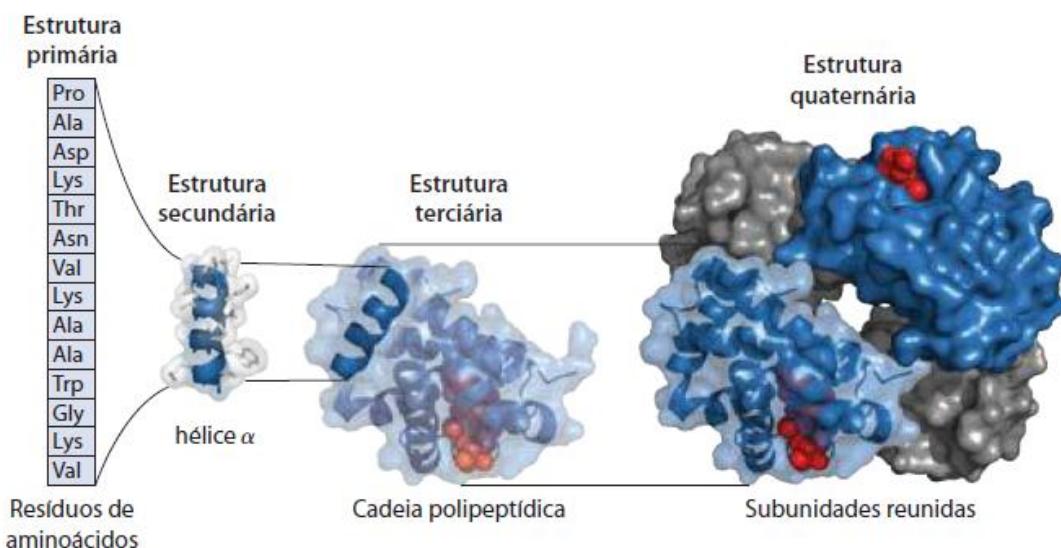
7.1. DEFINIÇÃO E ESTRUTURA

Proteínas são moléculas compostas por monômeros de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. As proteínas de cada organismo, partindo das bactérias aos seres humanos, são construídas a partir do mesmo conjunto onipresente de 20 aminoácidos (NELSON; COX, 2014). A estrutura das proteínas pode ser organizada em quatro níveis: estrutura primária, secundária, terciária ou quaternária. Segundo Nelson e Cox (2014):

- A estrutura primária é basicamente a sequência de aminoácidos presente na ligação peptídica;
- A estrutura secundária se refere a arranjos espaciais estáveis de resíduos de aminoácidos, algo que usualmente dá origem a padrões estruturais recorrentes;
- A estrutura terciária descreve o enovelamento tridimensional de um polipeptídeo;
- A estrutura quaternária se refere ao arranjo espacial das subunidades polipeptídicas de uma proteína. (NELSON; COX, 2014).

Na Figura 4, temos uma esquematização dos níveis de estrutura da proteína:

Figura 4 - Níveis de estrutura nas proteínas.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

O conhecimento das propriedades das proteínas é essencial para uma melhor eficiência na síntese de proteínas, além disso, conforme Agouridas et al. (2017), a síntese química de proteínas, depende diretamente do conhecimento profundo das propriedades estruturais das proteínas, sendo possível modular ou mimetizar tais estruturas por meio da seleção criteriosa de segmentos peptídicos e estratégias de ligação. Assim, a definição e estrutura das proteínas constituem a base para o entendimento das funções moleculares das proteínas e, também, para o desenvolvimento de metodologias de síntese.

7.2. FORMAS DE SÍNTESE

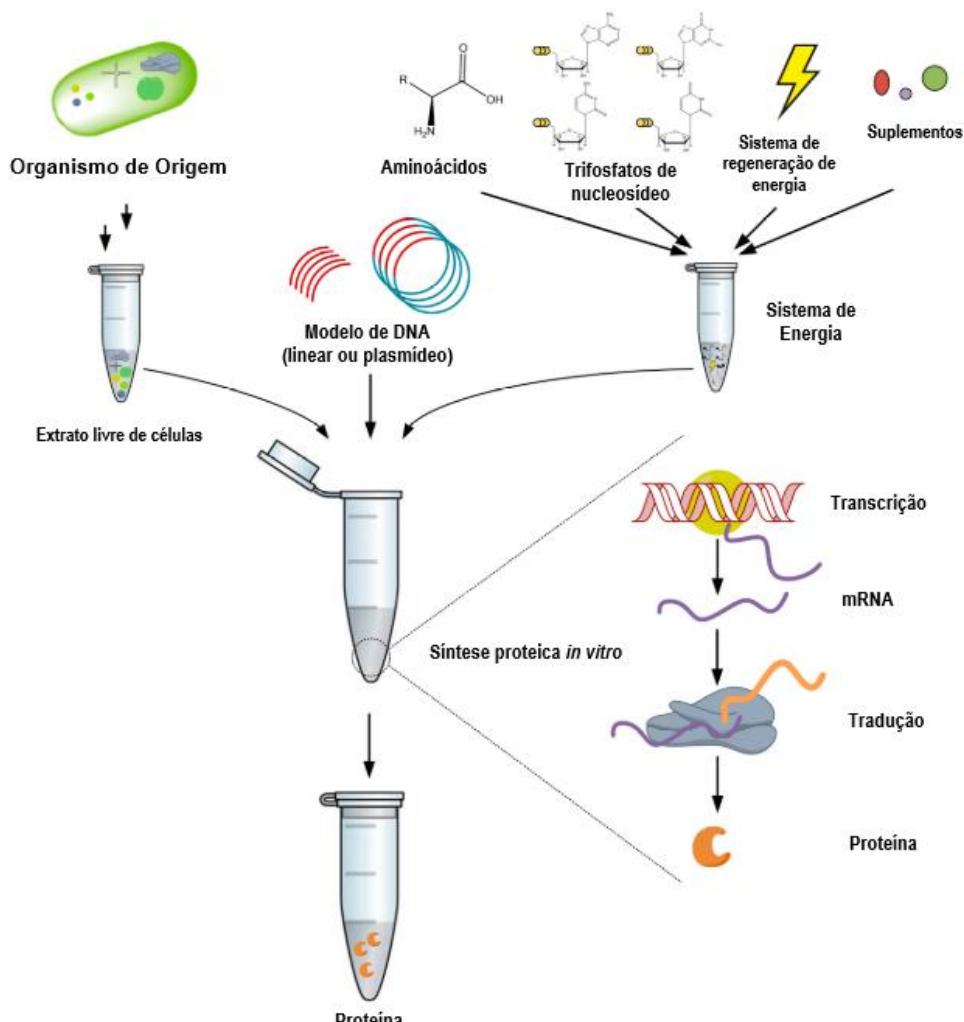
A síntese de proteínas pode ocorrer de diversas formas, mas aqui discorreremos sobre as mais utilizadas: a síntese de proteínas livre de células e a síntese química de proteínas.

7.2.1. Síntese de proteínas livre de células (*Cell-Free Protein Synthesis CFPS*)

Existem dois tipos principais de CFPS: o primeiro tipo possui extrato celular purificado e o segundo é constituído por uma matriz contendo compostos individualmente purificados, ambos os sistemas contêm os elementos necessários para produzir proteínas como ribossomos, aminoacil-tRNA sintetases e fatores de tradução. Estes sistemas podem ser extraídos das mais diversas fontes orgânicas, entretanto, o extrato celular da *E.Coli* é o extrato mais popular, devido à possibilidade de modificação genética do extrato, como também seu custo-benefício em termos de cultivação (ROLF; ROSENTHAL; LÜTZ, 2019).

Em suma o extrato celular é utilizado para se produzir proteínas, utilizando-se dos componentes ribossomais e realizando a tradução e transcrição. A Figura 5, buscou ilustrar a síntese livre de células:

Figura 5 - Esquema geral da síntese proteica livre de células.



Fonte: ROLF; ROSENTHAL; LÜTZ, 2019.

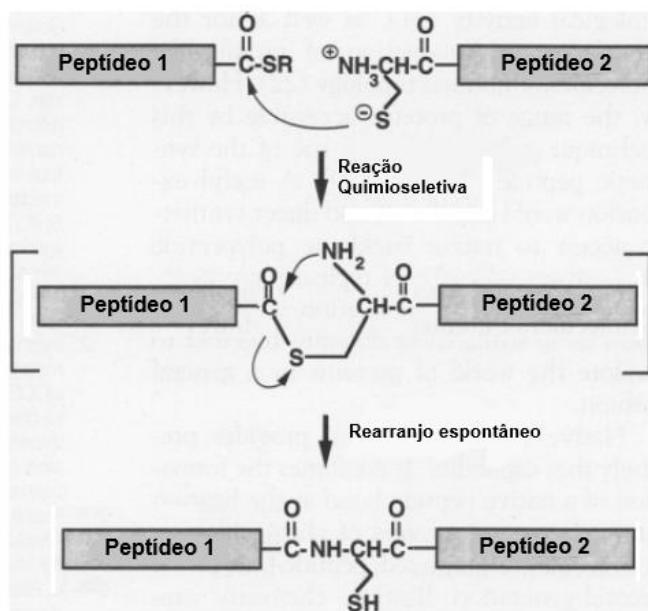
A CFPS tem se consolidado como uma das metodologias mais utilizadas para a obtenção de polipeptídeos complexos e proteínas. A sua popularidade se dá graças a algumas vantagens como a produção de proteínas em alta concentração em poucas horas, a possibilidade de se produzir proteínas com aminoácidos não usuais ou de se adicionar chaperorinas a fim de se obter o dobramento correto da proteína, entre muitas outras (ROLF; ROSENTHAL; LÜTZ, 2019).

7.2.2. Síntese química de proteínas

7.2.2.1. Native Chemical ligation (NCL)

A NCL se caracteriza como uma ligação quimioseletiva de dois segmentos peptídicos não protegidos. De acordo com Dawson et al. (1994) esta ligação quimioseletiva ocorre entre um peptídeo sintético sem proteção, contendo um grupo tioéster e outro peptídeo, também não protegido, que possui uma cisteína na extremidade N-terminal, formando inicialmente um intermediário instável, que rapidamente se rearranja internamente, criando uma ligação peptídica estável. A Figura 6 demonstra o esquema geral da ligação acima descrita.

Figura 6 - Native Chemical ligation (NCL).



Fonte: DAWSON et al., 1994.

7.2.2.2. Técnicas Alternativas a NCL

A NCL apresenta alguns obstáculos de síntese química, por exemplo, o fato de que proteínas recombinantes não podem ser convertidas diretamente em tio ésteres de proteínas. Graças a isto, foram desenvolvidas sínteses alternativas a NCL, como a ligação de proteínas expressas (EPL, *expressed protein ligation*) e a ligação de Staudinger (CHANDRUDU; SIMERSKA; TOTH, 2013).

Chandrudu et al. (2013) descreveram as vias alternativas a NCL, sendo que a EPL (*Expressed protein ligation* ou ligação de proteína expressa) é uma

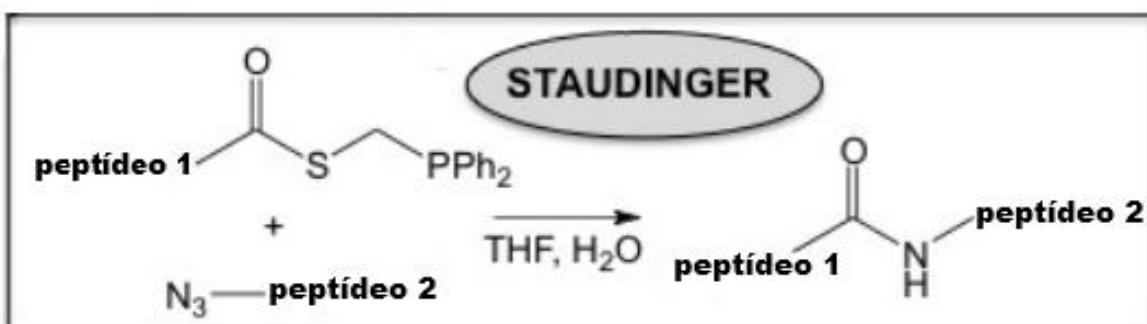
semissíntese de proteínas, uma metodologia que se baseia no processo de *splicing* de proteínas. No EPL, ocorre uma troca interna (N-S) envolvendo um resíduo de cisteína na extremidade N-terminal, formando um tioéster, seguido por um rearranjo com um resíduo de asparagina na extremidade C-terminal. Já a ligação de Staudinger se baseia na reação com o mesmo nome na qual um fosfano reage com uma azida, formando uma substância intermediária, que depois se rearranja para produzir um sal de amidofosfônio, a hidrólise deste sal gera o produto de interesse, uma amida, e óxido de fosfina como subproduto, a seguir temos as Figuras 7 e 8, que demonstram a síntese EPL e a ligação de Staudinger, respectivamente.

Figura 7 - Representação geral da EPL.



Fonte: BUTTS; CHU, 2022.

Figura 8 - Ligação de Staudinger.



Fonte: CHANDRUDU; SIMERSKA; TOTH, 2013.

7.3. BREVE EXPOSIÇÃO DAS PROTEÍNAS NA ÁREA FARMACÊUTICA

As proteínas possuem grande aplicabilidade na indústria farmacêutica; a sua presença na área é marcada por inúmeros proteicos, inclusive insumos farmacêuticos ativos (IFAs) que mudaram o tratamento de diversos pacientes ao redor do mundo.

A insulina humana foi a primeira proteína terapêutica criada a partir do resultado da tecnologia do DNA recombinante (CARTER, 2011). O tratamento de diabetes recebeu ao passar dos anos outros IFAs de natureza proteica como semaglutida e afins. Não só a área metabólica ganhou novos tratamentos feitos a partir de proteínas como também a área oncológica, a produção e o crescimento da síntese de anticorpos monoclonais tornou possível o tratamento oncológico de diversos tipos de cânceres, exemplo seria o betadinituximabe (Qarziba[®]), anticorpo monoclonal quimérico humano/murino de tipo IgG1, produzido numa linha celular de mamífero através de tecnologia de DNA recombinante (CARTER, 2011; RECORDATI, [s.d.]).

8. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM MICRORREATORES

A síntese de peptídeos em microrreatores apresenta uma abordagem promissora academicamente e industrialmente falando, há diversas metodologias que podem ser empregadas neste ramo, mas aqui destacamos que a síntese em fluxo proporciona vantagens já discutidas neste trabalho. Além disso, há exemplos de que a implementação de fluxo contínuo pode melhorar aspectos como a eficiência, a economia de reagentes e solventes da síntese e, a velocidade da reação (GORDON, 2018).

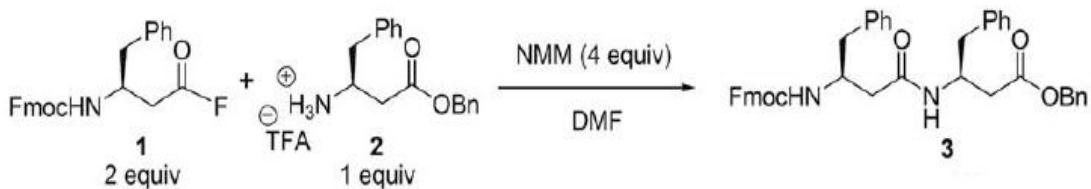
A seguir discorremos alguns exemplos de síntese de peptídeos presentes na literatura e seus resultados

8.1. SÍNTESE DO DIPEPTÍDEO $\beta^3\text{HOMOFENILALANINA}-\beta^3\text{HOMOFENILALANINA}$

O primeiro exemplo aqui destacado é o dipeptídeo formado pela ligação entre dois resíduos de beta fenilalanina ($\beta^3\text{-HPhe}$). A síntese em fluxo em microrreatores descrita por Flögel et al. (2006), utilizou como reagentes fluoreto de 9-fluorenilmetoxicarbonila com beta fenilalanina Fmoc- $\beta^3\text{hPhe-F}$ (Estrutura 1 representada na Figura 9) e a beta fenilalanina H- $\beta^3\text{hPhe-OBn}$ (Estrutura 2 na

Figura 9). O sistema utilizou N-metilmorfolina (NMM) como base. Ademais, optou por escolher ácidos de fluoreto, devido ao fato de que estes compostos são agentes de acilação muito eficientes, tornando o acoplamento dos aminoácidos mais fácil. A análise da reação foi feita por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Quanto aos parâmetros reacionais, foi constatado que o tempo de residência e temperatura ideais para a formação do produto (Estrutura 3 representada na Figura 9) foram de 3 minutos e 90 °C, respectivamente, com rendimento de 92%.

Figura 9 - Síntese do dipeptídeo homofenilalanina.



Fonte: FLÖGEL et al., 2006.

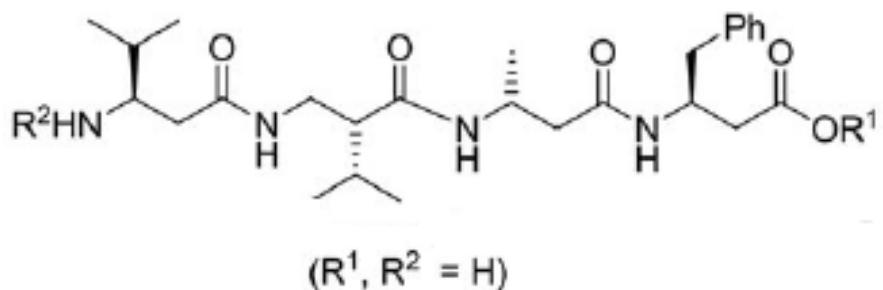
8.2 SÍNTESE DO TETRAPEPTÍDEO β

Flögel et al. (2006), também sintetizaram um tetrapeptídeo utilizando o sistema mencionado acima. Este polipeptídeo foi produzido para se testar a capacidade do microrreator de construir sequências peptídicas maiores e mais complexas.

A síntese do peptídeo foi iniciada com a formação da ligação (β^3 - β^3), usando as condições do dipeptídeo β^3 homofenilalanina- β^3 homofenilalanina (vide item 8.1, tempo de residência de 3 min a 90 °C). A reação produziu o dipeptídeo protegido com Boc, com 91% de rendimento após purificação.

A segunda etapa da reação, Flögel et al. (2006), relataram ser mais difícil devido às ligações, temperaturas mais altas e maior tempo de residência (120°C e 5 min). Nesta etapa obtiveram 93% de rendimento. A terceira e última etapa foi feita a 120 °C, sendo que o acoplamento foi concluído após 1,5 min, gerando o polipeptídeo abaixo (Figura 10):

Figura 10 - Tetrapeptídeo sintetiza por Flögel et al. (2006).

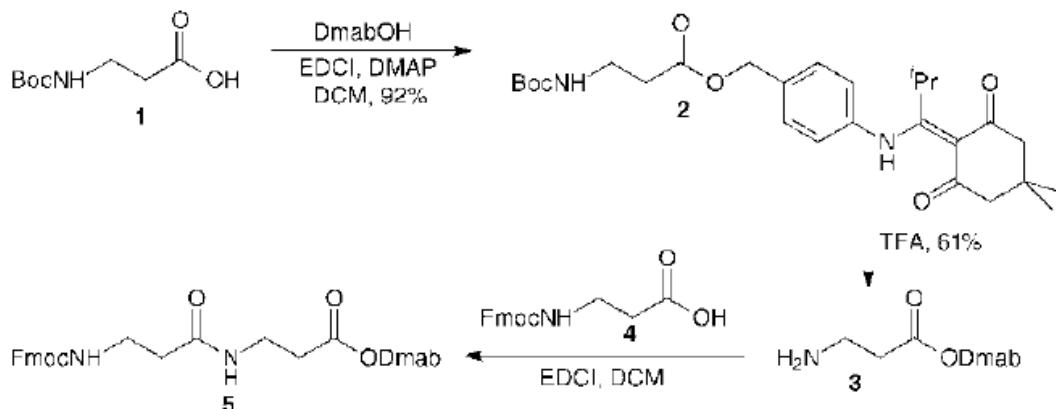


Fonte: FLÖGEL et al., 2006.

8.3 SÍNTESE DO DIPEPTÍDEO DE BETA-ALANINA

WATTS et al. (2001) descreveram a produção de um dipeptídeo da beta-alanina em fluxo contínuo em microrreatores. Inicialmente, o beta-aminoácido foi protegido com Fmoc, para assim reagir com o aminoácido (**4**) (demonstrado na Figura 11) preparado a partir de um Boc-beta-alanina comercialmente disponível. O Boc-beta-alanina foi convertido em um éster Dmab (4-{N-[1-(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutil]-amino}benzil) com o auxílio de EDCI ([1-(3-dimetilaminopropil)-cloridrato de 3-etylcarbodiimida]) e DMAP (4-Dimetilaminopiridina), obtendo-se um rendimento de 92%. Este éster foi tratado com TFA (ácido trifluoroacético) para gerar a amina desejada, que então sofreu acoplamento com peptídeo Fmoc-beta-alanina, formando o peptídeo desejado com 93% de rendimento (Estrutura **(5)** representada na Figura 11). A Figura 11 apresenta o processo de síntese do peptídeo **(5)**, nomeado assim pelo autor.

Figura 11 - Esquema geral sobre a síntese realizada por Watts et al. (2001).



Fonte: WATTS et al., 2001.

9. SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM MICRORREATORES

A síntese de proteínas apresenta uma abordagem promissora no meio acadêmico e na indústria. Existem diversas metodologias que podem ser empregadas nessa área, mas aqui destacamos o uso de microrreatores, cujas vantagens já foram discutidas neste trabalho. A seguir, apresentamos alguns exemplos de síntese em fluxo de proteínas descritos na literatura e seus respectivos resultados.

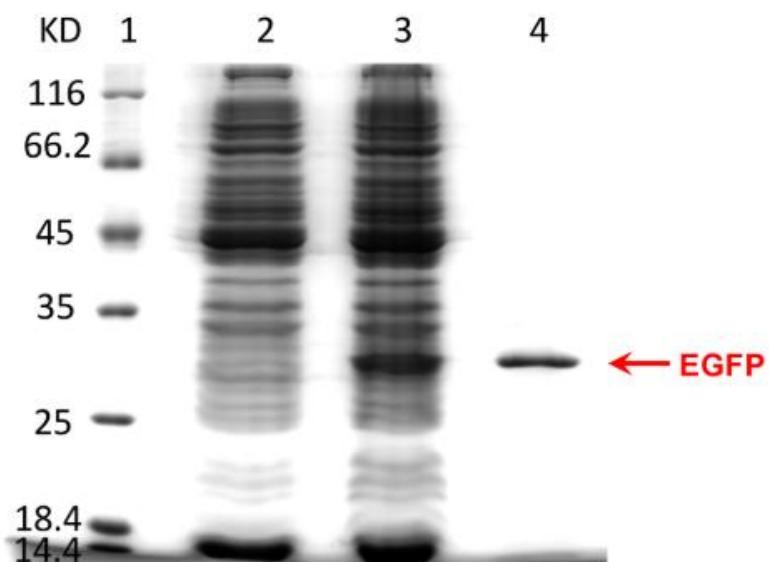
9.1. PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE APRIMORADA

XIAO et al. (2018) produziram uma proteína baseada na *Enhanced Green Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente Verde Aprimorada) (EGFP). A EGFP é uma proteína aprimorada da proteína verde fluorescente (GFP), sendo que esta primeira emite 35 vezes mais fluorescência do que a proteína original (CARSON; MILLER; WITHEROW, 2012). A EGFP foi escolhida para uso devido à possibilidade de quantificação de sua fluorescência.

XIAO et al. (2018) propuseram a integração da síntese e purificação em um único microrreator, utilizando a técnica de síntese livre de células (*cell-free protein synthesis* - CFPS). A síntese foi realizada em um microrreator criado pela equipe, sendo este composto por vidro e possuindo dois canais, um canal central, que possuía duas pinças: uma com grânulos de agarose modificadas com DNA da EGFP para a síntese e o canal auxiliar com esferas modificadas com íons níquel, utilizados para a purificação.

Os autores relataram que a mistura de reagentes com o extrato celular, aminoácidos e enzimas de transcrição/tradução é introduzida no canal principal, sendo a proteína é sintetizada. Logo em seguida, se liga aos grânulos de níquel na região de purificação situados no canal auxiliar. Posteriormente, se inicia o processo de “limpeza” do microrreator: um tampão de lavagem remove compostos que não estão ligados às esferas de níquel e um tampão de eluição é usado para se extrair a proteína purificada, que é coletada na saída do microrreator. O sistema produziu cerca de 70 μ L de EGFP a 144,3 μ g/mL, totalizando aproximadamente 10,1 μ g por operação. A proteína foi detectada por fluorescência e confirmada por SDS-PAGE, apresentando pureza significativa que não foi quantificada pelo autor mas que se apresenta significativa devido a presença de uma única banda visível no SDS-PAGE, algo que pode ser comprovado com a Figura 12 do SDS-PAGE realizado pelo autor: na faixa 1 nós temos o marcador, na faixa 2 nós temos a adição de esferas de agarose não modificadas ao CFPS, na faixa 3 nós temos a adição de adição de esferas de agarose modificadas com DNA molde ao CFPS, e na faixa 4 solução de proteína coletada do chip integrado, ou seja, proteína purificada a partir do tampão de eluição.

Figura 12 - SDS-PAGE da Proteína EGFP.



Fonte: XIAO et al., 2018.

9.2. PROTEÍNA SUPERFOLDER GREEN FLUORESCENT (SFGFP)

Timm et al. (2016) sintetizaram a proteína verde fluorescente *superfolder* (*Superfolder Green Fluorescent* - sfGFP) com intuito de se testar a eficiência de microrreatores com membranas de nanoporos. A síntese nestes dispositivos foi feita com a aplicação da técnica de síntese livre de células (*cell-free protein synthesis* - CFPS).

Os autores relatam o uso de extratos celulares de *E.coli* e sistema de regeneração de energia PANOx-SP, DNA plasmidial contendo o gene da proteína-alvo e uma mistura de metabólitos essenciais para a transcrição e tradução. A produção proteica foi realizada em um microrreator com canais microfluídicos, que foram integrados com membranas porosas de diferentes tamanhos para troca contínua de nutrientes e remoção de inibidores.

O uso de membranas de poro médio garantiu maior retenção de produto (92%) e produziu até 2 mg/mL de sfGFP, valor superior ao obtido em batelada ou reatores comerciais. No mais, a síntese foi mantida por até 8 h com alta estabilidade.

9.3. PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP) E PROTEÍNA FLUORESCENTE AZUL (BFP)

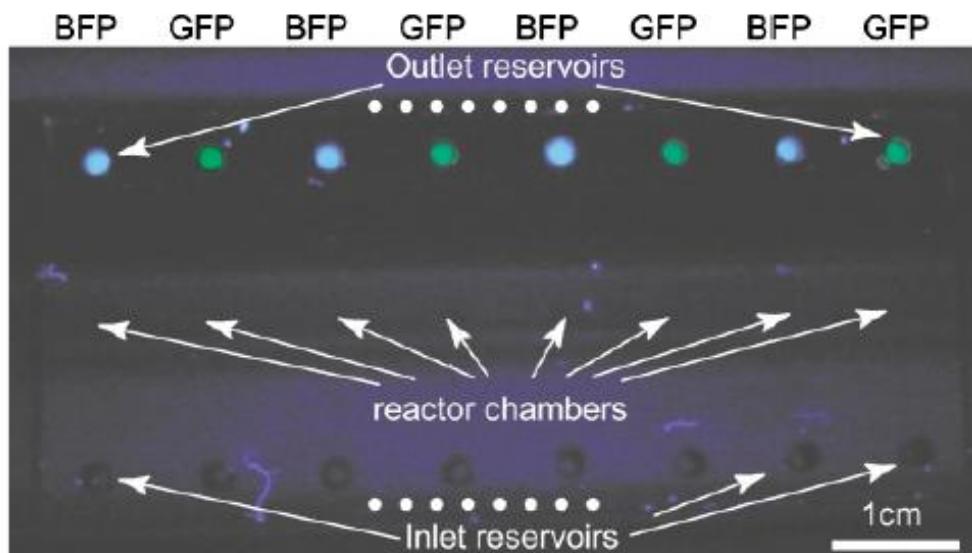
Yamamoto, Nojima e Fujii (2002), sintetizaram duas proteínas, a GFP (proteína fluorescente verde ou *green fluorescent protein*) e a BFP (proteína fluorescente azul ou *blue fluorescent protein*), em uma série de microrreatores contendo câmaras de sistemas integrados de controle de temperatura.

O microrreator utilizado consistiu em um modelo híbrido feito de polidimetilsiloxano construído pela própria equipe. A síntese foi realizada partir de extratos celulares de *E. coli*, combinados com DNA molde de GFP/BFP e os reagentes necessários para transcrição e tradução. Estes componentes foram misturados com as concentrações desejadas e introduzidos nos canais do microrreator, sendo que a temperatura foi controlada com precisão, em torno de 37 °C, ideal para a atividade enzimática, graças ao auxílio do sistema integrado de controle de temperatura. Com esse ambiente otimizado, as proteínas de interesse são sintetizadas *in vitro*, sem a necessidade de cultivo celular.

A fluorescência emitida por GFP e BFP foi usada como indicador de sucesso da síntese. Ambos os produtos (GFP e BFP) foram coletados nos reservatórios de saída para aumentar a intensidade da fluorescência. Após a reação, o chip com as câmaras de reação foi separado do sistema integrado de controle de temperatura e submetido a irradiação de luz UV com o intuito de ativar a fluorescência do GFP e BFP. Com a detecção de ambas as fluorescências, foi possível concluir que as proteínas GFP e BFP foram, de fato, produzidas nas câmaras.

Os autores também descreveram o aumento da intensidade da fluorescência, comprovação da síntese das proteínas, a partir de 30 minutos de reação e argumentam que isso acontece pois o GFP leva cerca de 30 minutos para atingir sua forma ativa, provavelmente devido a processos pós-traducionais, sendo que a intensidade atinge o máximo após cerca de duas horas. A Figura 13 demonstra a fluorescência gerada pela síntese nos microrreatores.

Figura 13 - Fluorescência de BFP/GFP na matriz dos microrreatores de oito canais após a reação de síntese de proteínas.



Fonte: YAMAMOTO; NOJIMA; FUJII, 2002.

10. CONCLUSÃO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso teve como objetivo efetuar uma revisão crítica sobre a literatura científica acerca da síntese de peptídeos e proteínas em fluxo em microrreatores. Ao longo do desenvolvimento do trabalho, foi possível evidenciar a relevância e o potencial que estas biomoléculas possuem, principalmente na aplicabilidade terapêutica e funcional. Além da importância das biomoléculas, foi possível vislumbrar o potencial e a aplicabilidade dos microrreatores na área acadêmica.

Os métodos de síntese de peptídeos e proteínas têm passado por significantes avanços ao longo das últimas décadas, migrando de processos tradicionais, muita das vezes limitantes e retidos em si, para estratégias inovadoras e mais eficientes. Nesse contexto, a introdução dos microrreatores representa um marco promissor na otimização e inovação dos processos de síntese, promovendo não só uma maior eficiência reacional, como também maior sustentabilidade e reproduzibilidade.

A síntese de proteínas e peptídeos em microrreatores vai de encontro com as demandas de sustentabilidade nas áreas da indústria e acadêmica, além de obedecer, não todos, mas alguns pontos da química verde ao propor a minimização de solventes, o uso racional de reagentes e reações/sínteses mais rápidas. Temos um cenário que favorece a sustentabilidade, os microrreatores, por sua vez, apresentam vantagens frente aos reatores convencionais, como o aumento da produtividade, o oferecimento de escalabilidade e integração.

A análise dos exemplos presentes na literatura evidenciou a possibilidade da síntese em microescala de biomoléculas complexas, com alto rendimento e pureza, consolidando assim os microrreatores como ferramentas versáteis e eficazes tanto com contextos acadêmicos quanto industriais. Apesar das limitações presentes no contexto dos microrreatores, como os limites, custos da produção e os materiais empregados, os avanços recentes nos aspectos de fabricação, revestimento e a possibilidade de produção por impressão 3D sinalizam um futuro promissor para a superação destas limitações.

Conclui-se, portanto, que a síntese de peptídeos e proteínas em microrreatores constitui uma estratégia inovadora, alinhada aos princípios e tendências da sustentabilidade e da eficiência tecnológica. Diante do exposto,

recomenda-se a investigação mais aprofundada nessa área, especialmente na otimização de sistemas integrados de síntese e purificação, como também à adaptação a escalabilidade, um aspecto crucial para a demanda industrial, visando ampliar a aplicabilidade dessa tecnologia nos diversos cenários que demandam uma produção eficiente e sustentável dos peptídeos e proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOURIDAS, Vangelis et al. **A statistical view of protein chemical synthesis using NCL and extended methodologies. Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Elsevier Ltd, 2017.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 14 dez. 2010.

BAUMANN, M.; MOODY, T. S.; SMYTH, M.; WHARRY, S. **A perspective on continuous flow chemistry in the pharmaceutical industry**. Organic Process Research & Development, v. 24, p. 1802–1813, 2020.

BUTTS, M.; CHU, N. Utilizing a Baculovirus/Insect Cell Expression System and Expressed Protein Ligation (EPL) for Protein Semisynthesis. **Current Protocols**, v. 2, n. 1, 2022.

CARSON, Susan; MILLER, Heather B.; WITHEROW, D. Scott. PCR Amplification of egfp and Completion of Vector Preparation. **Molecular Biology Techniques**, p. 21–29, 2012.

CARTER, Paul J. **Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective**. **Experimental Cell Research**, Academic Press Inc., 2011.

CHANDRUDU, Saranya; SIMERSKA, Pavla; TOTH, Istvan. **Chemical methods for peptide and protein production**. Molecules, abr. 2013.

CURZONS, A. D. et al. **So you think your process is green, how do you know? - Using principles of sustainability to determine what is green** - A corporate perspective. Green Chemistry. Royal Society of Chemistry, 2001.

DAWSON, Philip E. et al. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. **Science**, v. 266, n. 5186, p. 776–779, 4 nov. 1994.

DOMÍNGUEZ, M. Isabel et al. **Current scenario and prospects in manufacture strategies for glass, quartz, polymers and metallic microreactors: A**

comprehensive review. Chemical Engineering Research and Design, Institution of Chemical Engineers, 1 jul. 2021.

DONG, S. et al. **Recent advances in chemical protein synthesis: method developments and biological applications.** Science China Chemistry, v. 67, p. 1060–1096, 2024.

FLÖGEL, Oliver et al. Microreactor synthesis of β -peptides. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 45, n. 42, p. 7000–7003, 27 out. 2006.

FRANK, Thomas. Fabrication and Assembling of Microreactors Made from Glass and Silicon. In: **Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis.** [S.l.]: Wiley, 2008. p. 19–41.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. **The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices.** Trends in Analytical Chemistry, v. 50, p. 78–84, 2013.

GORDON, Christopher P. **The renascence of continuous-flow peptide synthesis—an abridged account of solid and solution-based approaches.** *Organic and Biomolecular Chemistry*, Royal Society of Chemistry, 2018.

GOU, M. et al. **Bio-inspired detoxification using 3d-printed hydrogel nanocomposites.** *Nature Communications*, v. 5, 2014.

HAAS-SANTO, K.; FICHTNER, M.; SCHUBERT, K. **Preparation of microstructure compatible porous supports by sol–gel synthesis for catalyst coatings.** *Applied Catalysis A: General*, v. 220, n. 1–2, p. 79–92, 25 out. 2001.

HAMAD, Farah et al. Systematic Review of Glucagon-Like Peptide One Receptor Agonist Liraglutide of Subjects with Heart Failure with Reduced Left Ventricular Ejection Fraction. **Current Diabetes Reviews**, v. 17, n. 3, p. 280–292, mar. 2021.

HURT, C. et al. **Combining additive manufacturing and catalysis: A review.** *Catalysis Science and Technology*, v. 7, n. 16, p. 3421–3439, 2017.

IVANKOVIĆ, A. **Review of 12 Principles of Green Chemistry in Practice.** *International Journal of Sustainable and Green Energy*, v. 6, n. 3, p. 39, 2017.

MACHADO, A. et al. **Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações.** Química Nova, v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.

MEILLE, V. Review on methods to deposit catalysts on structured surfaces. **Applied Catalysis A: General**, v. 315, p. 1–17, 2006.

MELO, C. S.; CUNHA JUNIOR, A. S.; FIALHO, S. L. **Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 33, n. 4, p. 469–477, 2012.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger** 6º Edição. [S.I.: S.n.]. v. 1

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 8. ed. v. 1. New York: W.H. Freeman and Company, 2022.

PARRA-CABRERA, Cesar et al. 3D printing in chemical engineering and catalytic technology: structured catalysts, mixers and reactors. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 1, p. 209–230, 2018.

QARZIBA ® (betadinituximabe).[Bula]. Laupheim: Recordati Rare Diseases Comércio de Medicamentos Ltda. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=qarziba>. Acesso em: 12 mai.2025. [S.I.: S.n.].

ROLF, Jascha; ROSENTHAL, Katrin; LÜTZ, Stephan. Application of Cell-Free Protein Synthesis for Faster Biocatalyst Development. **Catalysts**, v. 9, n. 2, p. 190, 19 fev. 2019.

SANDEL, Simone; WEBER, Sven K.; TRAPP, Oliver. **Oxidations with bonded salen-catalysts in microcapillaries.** **Chemical Engineering Science**, v. 83, p. 171–179, 3 dez. 2012.

SANZ, Oihane et al. **Advances in Structured and Microstructured Catalytic Reactors for Hydrogen Production.** Renewable Hydrogen Technologies: Production, Purification, Storage, Applications and Safety, p. 201–224, 1 jan. 2013.

TOMAŠIĆ, Vesna; JOVIĆ, Franjo. **State-of-the-art in the monolithic catalysts/reactors.** Applied Catalysis A: General, v. 311, n. 1–2, p. 112–121, 1 set. 2006.

TU, S. T. et al. **Development of micro chemical, biological and thermal systems in China:** A review. Chemical Engineering Journal, v. 163, n. 3, p. 165–179, 1 out. 2010.

WANG, L. et al. **Therapeutic peptides: current applications and future directions.** Signal Transduction and Targeted Therapy, Nature, 2022.

WATTS, P. et al. The synthesis of peptides using micro reactors. **Chemical Communications**, n. 11, p. 990–991, 7 jun. 2001.

WENGENMAYER, F. Synthesis of Peptide Hormones using Recombinant DNA Techniques. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 22, n. 11, p. 842–858, 1983.

WILES, Charlotte; WATTS, Paul. **Continuous process technology: a tool for sustainable production.** Green Chem., v. 16, n. 1, p. 55–62, 2014.

XIAO, Xiao et al. Integration of cell-free protein synthesis and purification in one microfluidic chip for on-demand production of recombinant protein. **Biomicrofluidics**, v. 12, n. 5, 1 set. 2018.

YAMAMOTO, Takatoki; NOJIMA, Takahiko; FUJII, Teruo. PDMS-glass hybrid microreactor array with embedded temperature control device. Application to cell-free protein synthesis. **Lab on a Chip**, v. 2, n. 4, p. 197–202, 1 nov. 2002.

YI, Seung Jae et al. **Design and validation of a uniform flow microreactor.** Journal of Mechanical Science and Technology, v. 28, n. 1, p. 157–166, jan. 2014.

ZHANG, Dongtang et al. **Microfluidic Technology: A New Strategy for Controllable Synthesis of Metal Nanomaterials.** ChemElectroChem, John Wiley and Sons Inc, 1 abr. 2025.

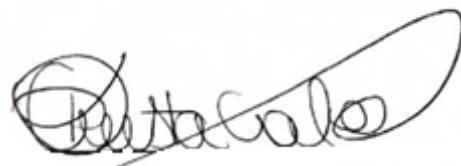
ZHANG, Meng et al. Advancements in droplet reactor systems represent new opportunities in chemical reactor engineering: A perspective. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 101, n. 9, p. 5189–5207, 1 set. 2023.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo como exigência para obtenção de título de bacharel em Farmácia-Bioquímica.



JULIA BRITO MACHADO



Dr. PAULO VICTOR CUESTA CALVO

São Paulo
2025