

## ANEXO I

### **Programa de Capacitação Institucional PCI 2019-2023**

### **PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM LUZ SÍNCROTRON, BIOCIÊNCIAS, NANOTECNOLOGIA E BIOETANOL**

Subprograma de Capacitação Institucional - SCI  
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS  
CNPEM

## 1. Projeto 1. Desenvolvimento de Ferramentas Computacionais Para Anotação e Segmentação de Imagens 3D Utilizando Aprendizado de Máquina

### 1.2. Introdução

O Aprendizado de Máquina engloba técnicas computacionais desenvolvidas com o objetivo de ensinar o computador a reconhecer padrões a partir de um certo conjunto de dados, de tal modo que ele possa vir a identificá-los automaticamente em instâncias que nunca foram antes observadas. Um exemplo disso seria treinar a máquina para reconhecer o rosto de uma certa pessoa em imagens, utilizando, para tanto, uma série de fotografias contendo a face dela. Tais técnicas vem revolucionando diversas áreas da Ciência, incluindo a análise de Imagens Médicas, Biológicas e Naturais para auxiliar na detecção e/ou diagnóstico de doenças, por exemplo. Mesmo com o avanço recente das técnicas de Aprendizado de Máquina, o sucesso depende de um bom conjunto de treinamento com instâncias anotadas indicando a presença (ou não) do padrão que se pretende reconhecer posteriormente. De fato, métodos avançados de aprendizado de máquina, como aqueles baseados em Aprendizado Profundo (*Deep Learning*) [1], necessitam de uma grande quantidade de instâncias anotadas para realizar um treinamento apropriado, visando modelar matematicamente os padrões a serem reconhecidos.

No contexto de análise de imagens biológicas, por exemplo, esse é um grande desafio. O número de imagens adquiridas é normalmente pequeno, devido às questões éticas (e.g., coletas de biópsias ou uso de animais de experimentação) e de preparação (e.g., processamento histológico, tratamento de contraste de imagens de raios-X, etc.). Mais crítico ainda é o processo de anotação dessas imagens, que requer pessoal especializado no reconhecimento de determinados padrões, além de atenção meticulosa nas marcações. E, ainda que esse pessoal esteja disponível, as ferramentas hoje existentes para auxiliar no processo de anotação demandam tempo impraticável para a realização da tarefa em larga escala. Neste cenário, um dos principais objetivos da análise de imagens é quantificar estruturas, o que deve ser feito a partir de segmentação. A segmentação é um processo de reconhecimento de padrões no qual a ideia é particionar a imagem em regiões condizentes com os objetos semânticos/estruturas que a compõem (e.g., delimitação de células em imagens de microscopia). Diversas técnicas de aprendizado de máquina vêm sendo propostas para segmentar imagens, mas o desafio de anotar interativamente um conjunto inicial de treinamento ainda permanece em aberto. Isso limita a aplicabilidade desses métodos em contextos como a análise de imagens 3D de grande porte geradas por microscopia por raios-X, como aquelas adquiridas nas linhas de tomografia por luz síncrotron (IMX/UVX e MOGNO/Sirius) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), ou mesmo com técnicas de microscopia com luz visível, incluindo imagens de super-resolução, como as produzidas nos equipamentos instalados no Laboratório de Imagens Biológicas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), ambos no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Logo, a segmentação dessas imagens acaba sendo restrita a técnicas arcaicas de processamento de imagens, como a transformada de *watershed* [2, 3, 4]. Este projeto visa desenvolver ferramentas computacionais para atender as demandas de segmentação de imagens 3D, em particular as adquiridas nas linhas de luz síncrotron do LNLS/Sirius para análise de amostras biológicas e não-biológicas (e.g., geológicas), utilizando técnicas de Aprendizado Profundo e Aprendizado Ativo [5].

### 1.3. Objetivo Geral

O objetivo geral desta proposta é produzir algoritmos de Aprendizado Profundo e Aprendizado Ativo adequados às análises de imagens 3D de amostras biológicas e não-biológicas, adquiridas primordialmente nas linhas de luz síncrotron (IMX e MOGNO) do LNLS/Sirius, de modo a transpor a barreira da segmentação manual, que é impeditiva para grandes volumes de dados.

Objetivo Específico 1: Criação de ferramentas computacionais de Aprendizado Profundo para segmentação interativa.

Objetivo Específico 2: Criação de ferramentas computacionais de Aprendizado Ativo para auxiliar no processo de anotação de imagens.

Objetivo Específico 3: Otimização das ferramentas desenvolvidas para execução em tempo computacional reduzido.

Objetivo Específico 4: Aplicação e avaliação das ferramentas desenvolvidas para determinar a robustez, eficácia e eficiência delas em imagens biológicas e não-biológicas.

### 1.4. Bolsas

Formação Acadêmica / Titulação	Área de Experiência	Objetivo Específico	PCI categoria/nível	Número Máximo de Meses	Quantidade Máxima de Bolsas
Mestrado	Ciências da Computação; Engenharia Biomédica	1, 2, 3, 4	D-C	60	1
Doutorado	Ciências da Computação; Engenharia Biomédica	1, 2, 3, 4	D-B	60	1

## 2. Projeto 2. Estabelecimento de metodologias para a determinação de estrutura de proteínas desafiadoras: proteínas de membrana e complexos macromoleculares

### 2.2. Introdução

Ao longo de quase vinte anos, o CNPEM tem adquirido o status de principal referência da Biologia Estrutural no Brasil. Inicialmente, como um laboratório de apoio ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), e depois com a criação do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), propiciou-se um ambiente científico altamente qualificado para a análise bioquímica e biofísica de proteínas, bem como a preparação de amostras cristalinas adequadas à análise por difração de raios x disponível em duas linhas de luz do LNLS. Com início do funcionamento do novo acelerador de elétrons brasileiro Sirius, a pesquisa em Biologia Estrutural deverá atingir um novo patamar, com a implantação da nova linha de luz micro e nanofoco dedicada à cristalografia de proteínas (MANACA). Ao mesmo tempo, o Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) adquiriu novos microscópios eletrônicos que propiciarão grandes avanços na área de criomicroscopia eletrônica (cryoEM) de macromoléculas biológicas.

A preparação de amostras é um gargalo para a determinação estrutural de proteínas tanto por cristalografia, cryoEM ou ressonância magnética nuclear (RMN). Esta questão se torna ainda mais evidente no caso de proteínas de membrana e complexos macromoleculares [6]. Estas classes de proteínas são os principais alvos de fármacos e biofármacos. Apesar disso, temos menos informação na literatura sobre estas macromoléculas em comparação com proteínas solúveis, devido principalmente a dificuldades na preparação destas amostras. Dentre as

principais dificuldades técnicas encontradas estão a solubilização destas proteínas, principalmente as de membrana, e a estabilização das mesmas. Estes dois fatores, solubilidade e estabilidade, são importantes no contexto da determinação de estruturas de proteínas. Alguns novos métodos foram desenvolvidos, como o uso de nanodiscos SMALP para a preparação de proteínas de membrana [7] e o uso de anticorpos ou *nanobodies* para a estabilização de proteínas de membrana [6] e complexos macromoleculares. Estes métodos necessitam de urgente implementação no Brasil e no CNPEM. Além destes novos métodos, outras abordagens podem ser derivadas, facilitando a obtenção de amostras adequadas para estudos estruturais, principalmente por cristalografia e cryoEM.

O LNBio possui expertise em preparação de amostras de proteínas solúveis para cristalografia de proteínas e vem desenvolvendo ferramentas que podem auxiliar a preparação de amostras mais desafiadoras como complexos macromoleculares e proteínas de membrana. Os projetos de pesquisa e inovação em desenvolvimento no CNPEM, bem como pela comunidade científica brasileira, demandam a elucidação estrutural de tais proteínas e complexos macromoleculares. Em paralelo, o campus do CNPEM está equipado para a determinação estrutural de proteínas e complexos macromoleculares, dispondo de infraestrutura no estado-da-arte e *know-how* para a aplicação de metodologias como cristalografia de proteínas e cryoEM para a determinação de tais estruturas.

### 2.3. Objetivo Geral

Viabilizar a determinação da estrutura tridimensional de proteínas de membrana e de complexos macromoleculares alvo de novos medicamentos.

Objetivo Específico 1: desenvolvimento e implementação de metodologias para a determinação de estrutura de proteínas desafiadoras e de extrema relevância para P&D, como proteínas de membrana e complexos macromoleculares, visando sua disponibilização no CNPEM para a comunidade científica e de inovação. Os métodos serão diretamente aplicados a projetos internos do CNPEM, bem como projetos de usuários externos, principalmente dos usuários das instalações abertas do LNNano e LNLS/Sirius. Abaixo algumas metodologias delineadas para contornar os principais gargalos encontrados atualmente para a preparação de proteínas de membrana e complexos macromoleculares para caracterização estrutural:

- 1a) Métodos de clonagem e construtos especialmente desenhados para a purificação de proteínas de membrana (caudas: >6xHis, R7, FLAG, entre outras).
- 1b) Métodos de extração de proteínas de membrana, como SMALPs.
- 1c) Métodos de concentração de proteínas de membrana, alternativos a membranas filtrantes.
- 1d) Métodos para controle de qualidade das amostras, definição de pipeline e análises mínimas a serem realizadas anteriormente aos experimentos de cristalização e montagem de grids por microscopia eletrônica.
- 1e) Métodos para o *cross-linking* específicos de complexos macromoleculares alvo, como GraFix.

Objetivo Específico 2: Preparação de amostras de proteínas alvo desafiadoras para estudos estruturais por cryoEM e cristalografia:

- 2a) complexos proteicos solúveis (ex.: RAD18 e proteassomo) (desafio: heterogeneidade, flexibilidade, definição de pequenas moléculas ligantes);
- 2b) anticorpos monoclonais (desafio: heterogeneidade, definição e glicosilações);
- 2c) receptores GPCR e seus complexos macromoleculares [desafio: solubilidade (são proteínas transmembrana), flexibilidade e baixo peso molecular para cryoEM];
- 2d) partículas virais (desafio: heterogeneidade e glicosilações).

Objetivo Específico 3: Resolução das estruturas tridimensionais das proteínas descritas no objetivo específico 2.

Objetivo Específico 4: Disponibilização das metodologias implementadas para a comunidade científica e de inovação.

#### 2.4.2. Bolsas

Formação Acadêmica / Titulação	Área de Experiência	Objetivo Específico	PCI categoria/nível	Número Máximo de Meses	Quantidade Máxima de Bolsas
Doutorado	Bioquímica Biologia Estrutural	1,2,3	D-B	60	1
Mestrado	Bioquímica Biologia Estrutural	1,2	D-C	60	1

### 3. Projeto 3. Sistema Microfisiológico Brasileiro (*Human-on-a-Chip*)

#### 3.2. Introdução

O cenário mundial do desenvolvimento de fármacos vem evoluindo há décadas com aumento de custos associado à redução de produtividade. De acordo com Biopharmaceutical Research Industry Profile – PhRMA, 2016, atualmente, o custo médio para levar um medicamento inovador ao mercado é USD \$ 2,6 bilhões. A maior parte dessa cifra astronômica decorre do fracasso de até 90% das drogas nas etapas clínicas, a despeito de terem cumprido todas as exigências regulatórias de testes *in vitro* e em animais.

Esse elevado percentual de fracasso decorre do valor preditivo limitado dos testes em animais em diversos indicadores. Por exemplo, a biodisponibilidade oral (quantidade do princípio ativo no sangue após administração oral) não se correlaciona bem entre seres humanos e animais. Já a predição de toxicidade é variável. A acurácia é superior a 80% para os sistemas digestório, cardiocirculatório e hematopoiético, mas inferior a 50% para os sistemas tegumentar e toxicidade hepática [8].

Isso mostra que os métodos atuais de desenvolvimento de fármacos possuem valor translacional limitado. Esses métodos retardam e encarecem o desenvolvimento, trazendo prejuízo aos pacientes pela redução do acesso e às empresas pela dificuldade em renovar seu portfólio, além de causar sofrimento aos animais. Portanto, é urgente desenvolver e disponibilizar novos testes pré-clínicos éticos, com maior poder preditivo, mais rápidos e com menor custo. O caminho óbvio é o cultivo de tecidos humanos. Os cosméticos tiveram grandes avanços, mas para fármacos ainda há grandes desafios a vencer. Predições com alto poder translacional necessitam testes em tecidos/organoides com arquitetura tridimensional, contato intercelular e circulação do meio nutritivo com perfusão e comunicação entre os organoides.

Por isso, o National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS) órgão do National Institute of Health (NIH) iniciou um programa de Sistemas Microfisiológicos (SMFs). Estes consistem de dispositivos microfluídicos integrados com organoides. Os organoides são versões tridimensionais miniaturizadas de órgãos humanos. Os dispositivos removem a circulação do meio nutritivo à semelhança do sangue [9,10].

Este projeto visa desenvolver um SMF brasileiro para testes ADMETox de medicamentos e cosméticos em substituição ao uso de animais. Essa tecnologia é inovadora, disruptiva e

habilitadora. Todos os setores que hoje dependem de testes em animais serão afetados. Os grupos que a dominarem possuirão grande diferencial competitivo na inovação em fármacos. Por isso, há vários grupos no mundo desenvolvendo-os [11, 12].

Como nenhum dispositivo atual mostrou resultados claramente superiores aos demais, há uma janela de oportunidade para o CNPEM, que já adquiriu capacitação no tema de 2015 a 2017 com recursos do Ministério da Saúde via CNPq trabalhando no âmbito da RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais) [13].

Este SMF será modular e reconfigurável [14]. Consiste de um núcleo de processamento farmacocinético com três organoides: intestino, fígado e rim. No futuro, poderá receber outros organoides ou tecidos tumorais para estudar a eficácia de drogas antineoplásicas. Os testes já em andamento administraram fármacos sobre a barreira intestinal e observam seu decaimento devido à metabolização hepática. Para isso são usadas várias técnicas disponíveis no CNPEM como cromatografia HPLC, espectrometria de massas, microscopia confocal, microtomografia e crioelctromicroscopia com luz Síncrotron (um diferencial competitivo mundial do nosso centro).

Para que os SMFs atinjam seu máximo potencial, O NCATS recomenda que os dados biológicos sejam corrigidos por algoritmos matemáticos. Espera-se que no futuro as decisões de eficácia e segurança de novos candidatos a fármacos decorram de testes combinados: *in vitro/in silico* com poder translacional maior que os testes atuais. Por isso, o CNPEM irá também desenvolver algoritmos de modelagem matemática, conjuntamente com o SMFs. O projeto está organizado conforme as fases abaixo. As bolsas PCI fazem parte das fases 3 e 4.

1. Capacitação. Executada de 2015 a 2017 pelo LNBio com recursos do Ministério da Saúde via CNPq. Dispositivos no estado da arte foram adquiridos da empresa alemã TissUse (Berlin). Dois pesquisadores do LNBio foram treinados. Foram realizados testes de farmacocinética e toxicidade (ADMETox) de fármacos e de sensibilização cutânea de cosméticos. Os resultados estão em revisão para publicação.
2. Invenção e prototipagem. O CNPEM está desenvolvendo um SMF inovador por meio de colaboração entre os seus laboratórios. Os protótipos são produzidos por impressão 3 D integrados com organoides e testados.
3. Otimização e especificação. Etapa a ser executada de 2019 a 2021. Para esta etapa se solicitam as bolsas PCI. Pelo menos 3 fármacos com dados ADMETox humanos na literatura serão testados nos SMFs. Os resultados permitirão otimizar os e produzir especificações para a moldagem que permitirá o aumento de escala. Esta fase também inicia o desenvolvimento de protocolos padronizados de bioensaios, que incluem rotinas de produção e manutenção dos organoides, parâmetros de confirmação da vitalidade tecidual, rotinas administração e coleta das drogas, descrição de métodos analíticos de quantificação de fármacos e definição de parâmetros bioquímicos e morfológicos de avaliação toxicológica. Esta fase inclui também o desenvolvimento de algoritmos de modelagem matemática.
4. Produção industrial e preparo para a validação. Esta etapa deverá se iniciar em 2022, com a produção dos moldes e a produção industrial dos chips. As bolsas PCI se estendem também para esta etapa. Serão executados muitos testes nos SMFs. Com isso, será possível avaliar a maturidade da tecnologia para prosseguir para a validação.
5. Validação. Caso os SMFs desenvolvidos sejam validáveis, os testes desenvolvidos nas etapas anteriores, são executados em paralelo, com processos de garantia da qualidade dos dados.



### 3.3. Objetivo Geral

Desenvolver o Sistema Microfisiológico Brasileiro (*Human-on-a-Chip*) caracterizado por um dispositivo microfluídico povoado com organoides funcionais de: intestino, fígado e rim. Esse SMF deverá ser capaz de executar testes ADMETox de candidatos a fármacos.

Objetivo Específico 1: Produzir um dispositivo microfluídico capaz de cultivar organoides humanos intestino, fígado e rim.

Objetivo Específico 2: Produzir modelos de organoides humanos: intestino fígado e rim.

Objetivo Específico 3: Desenvolver testes no SMF de: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade (ADMETox) para fármacos.

Objetivo Específico 4: Desenvolver um modelo matemático (equação ou algoritmo) que busque a aumentar a correlação dos dados produzidos nos SMF com dados da literatura para drogas já testadas em humanos.

#### 3.4.2. Bolsas

Formação Acadêmica / Titulação	Área de Experiência	Objetivo Específico	PCI categoria/nível	Número Máximo de Meses	Quantidade Máxima de Bolsas
Mestrado	Cultivo celular	1,2,3	D-C	60	1
Doutorado	Bioinformática	4	D-B	60	1

## 4. Projeto 4. Nanomateriais Avançados

### 4.2. Introdução

O momento científico e tecnológico atual tem aumentado a demanda e possibilitado uma miríade de oportunidades de criação de materiais avançados. Dentro dessa perspectiva, a combinação de ferramentas e abordagens de nanociência e, em consequência, a nanotecnologia vêm demonstrando um elevado número de possibilidades de produção de novos materiais fascinantes com aplicações em saúde, energia, agricultura, meio ambiente e materiais estruturais.

Um dos tópicos em nanotecnologia que tem sido abordado pelo LNNano/CNPEM é a produção de nanomateriais avançados para estas aplicações a partir de insumos oriundos de fontes sustentáveis, renováveis e abundantes, estando em consonância com os princípios da química e engenharia verde. O Brasil, sendo líder na produção de *commodities* agrícolas, tem vantagem competitiva no mercado mundial e enormes oportunidades na utilização dessas fontes renováveis para a produção destes materiais avançados. O que levanta o desafio de tornar o Brasil uma potência científica, tecnológica e econômica com base em seu potencial agroflorestal. [15-20]

Outro aspecto fundamental para a produção de nanomateriais é a avaliação de seus impactos e potenciais efeitos adversos sobre sistemas biológicos e ambiente. Neste sentido, de maneira integrada e em sinergia com as etapas de desenvolvimento de nanomateriais, estudos de nanotoxicidade, exposição e monitoramento de nanomateriais no ambiente através de dispositivos eletroquímicos e ópticos são realizados no LNNano/CNPEM. Dentro desta perspectiva, contribuimos proativamente para a produção de nanomateriais avançados, seguros e sustentáveis [21-23].

Pesquisas com ênfase em nanomedicina também têm sido conduzidas por pesquisadores do LNNano/CNPEM. Nesse caso, destacam-se o desenvolvimento e sensores para o diagnóstico *point-of-care* de doenças como o câncer e a síntese e funcionalização química de nanopartículas modelo visando a maiores eficiência e seletividade terapêuticas mediante o direcionamento de fármacos para o combate in vivo de tumores e infecções microbiológicas. Assim, buscam-se avanços em direção a uma medicina personalizada e medicamentos inteligentes [24-26].

A complexidade dos desafios encontrados no desenvolvimento destes materiais avançados urge ser acessada e resolvida por intermédio da multi- e transdisciplinaridade. É inevitável e necessária a atuação integrada, e em diferentes níveis, de pessoal qualificado em química, física, biologia, engenharia, matemática, economia, agronomia, dentre outras. Sob este prisma, projetos com este viés encontram solo fértil no CNPEM que além de contar com pessoal qualificado com competências técnico-científicas com este perfil, possui infraestrutura com o nível necessário para o desenvolvimento de projetos no estado-da-arte em nanociência e nanotecnologia com competitividade mundial.

Uma das grandes vantagens que tem sido explorada pelo LNNano/CNPEM é a possibilidade de vencer esses desafios, e avançar na fronteira do conhecimento nesta área, aliando a síntese de nanomateriais avançados com técnicas avançadas de caracterização. Isto tem permitido o entendimento detalhado das propriedades da matéria com diferentes resoluções espaciais e temporais, e por técnicas in situ e in operando, que facilitam o atingimento das condições necessárias para seu uso nas aplicações alvo. A infraestrutura e pessoal de pesquisa do CNPEM em caracterização avançada de materiais e biologia estrutural devem ser exploradas neste sentido. Destacam-se as competências em microscopia eletrônica e de sondas e criomicroscopia de estruturas biológicas e materiais moles. Além do mais, as potencialidades futuras do Sirius, em caracterização empregando luz Síncrotron, serão aproveitadas enormemente nestes tipos de desafios com respostas singulares.

### 4.3. Objetivo Geral

Manipular a matéria em escala nanométrica para diferentes aplicações.

#### Objetivo Específico 1: Nanodispositivos eletroquímicos e elétricos

Preparar estruturas condutoras para a fabricação de nanodispositivos elétricos e/ou eletroquímicos através de rotas de impressão, transferência e/ou deposição. Estabelecer rotas de preparo de nanodispositivos empregando materiais não-convencionais, fabricar dispositivos de conversão e armazenamento de energia com novos nanomateriais, obter sensores mais eficientes e montar novas plataformas de estudo de propriedades elétricas e/ou eletroquímicas de nanomateriais.

#### Objetivo Específico 2: Nanocompósitos poliméricos

Produzir nanocompósitos poliméricos utilizando matrizes termoplásticas e elastoméricas usando nanoceluloses, nanocarbons, materiais 2D e outras cargas nanoparticuladas como fase dispersa estruturante. Compatibilizar as fases dispersas com as matrizes poliméricas através de métodos físico-químicos. Desenvolver materiais nanoestruturados, orientados e porosos com propriedades funcionais e anisotrópicas.

#### Objetivo Específico 3: Fluidos complexos e dispersões coloidais

Avaliar o comportamento coloidal de dispersões aquosas de nanopartículas (nanoceluloses, materiais 2D, nanocarbons) na presença de polímeros, surfactantes, e outras moléculas dissolvidas. Desenvolver fluidos complexos baseados em nanomateriais para aplicação em cosméticos, medicina e dispositivos multifuncionais.

#### Objetivo Específico 4: Nanomedicina



Obter nanopartículas modelo (sejam elas obtidas através de fontes renováveis ou sintetizadas quimicamente) com o intuito de entender o direcionamento das mesmas dentro de células de mamíferos. Produzir partículas com superfícies modificadas com a intenção de levar as estruturas à distintas regiões das células. Investigar a interação das nanopartículas com a membrana das células.

Objetivo Específico 5: Nanotoxicologia

Fabricar sistemas microfluídicos integrados para nanobioecointerações e avaliar a toxicidade de nanomateriais utilizando organismos vivos modelos e sistema solo-planta. Monitorar a biodistribuição dos nanomateriais nos tecidos biológicos após diferentes condições de exposição e fluxo nos dispositivos fabricados especificamente para cada organismo-modelo.

4.4.2. Bolsas

Formação Acadêmica / Titulação	Área de Experiência	Objetivos Específicos	PCI categoria/nível	Número Máximo de Meses	Quantidade Maxima de Bolsas
Doutorado	Química, Engenharias (química, materiais, elétrica, mecânica, etc)	1-5	D-B	60	5

**5. Projeto 5. Etanol de segunda geração**

5.2. Introdução

O etanol de segunda geração [27] é aquele produzido a partir de resíduos lignocelulósicos como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar e é caracterizado por ser um biocombustível limpo, renovável, sustentável e com uma baixíssima pegada de carbono comparado com os combustíveis fósseis. Entretanto, o processo de obtenção do etanol 2G é mais complexo quando comparado com o de primeira geração tanto da cana-de-açúcar como do milho. No processo de segunda geração, a biomassa necessita ser primeiramente pré-tratada por processos físico-químicos para afrouxamento das fibras e redução da recalcitrância seguido por uma etapa de sacarificação enzimática para biodisponibilização dos açúcares na sua forma monossacarídica para então posterior fermentação tanto das hexoses como de pentoses.

Os dois principais gargalos atualmente são:

O pré-tratamento que afeta todas as etapas seguintes, sacarificação e fermentação, e que vem sendo o grande vilão do ponto de vista industrial devido à alta recalcitrância da biomassa vegetal [28], consequência da repolimerização (efeito de condensação) da lignina, formando ligações carbono-carbono e com isso aumentando significativamente este “escudo” de lignina [29] para as etapas de hidrólise enzimática da celulose. Isto traz dificuldades operacionais em grande escala e constantes interrupções por falhas sistemáticas. Tais problemas associados ao pré-tratamento são específicos para cada tipo de biomassa e requer uma infraestrutura como a planta piloto do CTBE para serem adequadamente acessados e avaliados. O intuito é maximizar a solubilização dos polissacarídeos presentes na biomassa com o mínimo de geração de inibidores [30], além de permitir a extração de outros componentes, como a lignina que tem grande potencial industrial para produção de biomateriais e químicos [29].

A sacarificação enzimática é outra etapa limitante do processo 2G, pois representa até 50% dos custos operacionais e é caracterizado pela baixa eficiência em torno de 60% na conversão de polímeros em monossacarídeos. Como o pré-tratamento, o desenvolvimento do coquetel enzimático para esta etapa é específico para cada biomassa e tem forte correlação com a

estratégia de pré-tratamento requerendo um co-desenvolvimento para maximização desta etapa [30]. Além disso, existem atualmente poucas companhias estrangeiras capazes de disponibilizar coquetéis enzimáticos para sacarificação de biomassa vegetal, os quais não são customizados para as biomassas brasileiras. Vale ressaltar que no Brasil, não existe tecnologia equivalente, o que é um problema estratégico quando se trata de matriz e segurança energética de um país.

O Brasil apresenta singularidades extremamente competitivas em relação ao resto do mundo no campo de biocombustíveis como biomassa abundante e barata e um setor de biocombustíveis já consolidado e com políticas públicas de incentivo como o RENOVABIO, que tem a contribuição direta do CTBE/CNPEM em sua elaboração. Portanto, estudar os gargalos atuais do etanol 2G no contexto das oportunidades existentes pode tornar o Brasil um líder nesta tecnologia, que permitirá ampliar a produção de etanol em até 45% sem sequer aumentar um hectare de cana-de-açúcar plantado, além de todas as vantagens econômicas, sociais e ambientais.

### 5.3. Objetivo Geral

Desenvolver tecnologias que viabilize o etanol 2G a partir do bagaço e palha da cana-de-açúcar por meio da investigação dos gargalos do processo de produção de etanol 2G desde a escala molecular até a planta piloto.

Objetivo Específico 1: Desenvolvimento de processo de pré-tratamento de bagaço e palha de cana que minimize a repolimerização da lignina e posterior obtenção de ligninas com valor econômico.

Neste objetivo visamos estudar estratégias de pré-tratamento que maximize a extração/solubilização dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica, evitando a repolimerização da lignina (estudos de estabilizadores moleculares), visando minimizar a recalcitrância dessa biomassa vegetal e qual a influência da relocação de lignina após o pré-tratamento para a posterior etapa de sacarificação enzimática com um mínimo de geração de inibidores para fermentação. Além disso, tem como objetivo abordar métodos que permite extrair a lignina tanto na sua forma polimérica, preservando o máximo de ligações nativas, quanto para a etapa de obtenção de lignina monomérica, sem uso de hidrogenação catalítica, para posterior transformação em biomateriais e químicos. Para isso serão utilizadas as instalações da planta piloto para os processos físico-químicos e o conhecimento e infraestrutura de outros LNs como LNNano e LNLS para a caracterização multiescala destes materiais pré-tratados, com isso, adquirir conhecimentos analíticos avançados da lignina e profundidade científica nos processos estudados. Para a avaliação econômica e ambiental das tecnologias estudadas será utilizada a plataforma desenvolvida no CTBE da Biorrefinaria Virtual de Cana-de-açúcar.

Objetivo Específico 2: Desenvolvimento de um coquetel enzimático customizado ao bagaço da cana-de-açúcar.

Tal objetivo contempla as seguintes metas:

- a. Realizar um consórcio de metagenômica e de meta-transcriptômica em meio contendo a biomassa pré-tratada, visando identificar enzimas promissoras para a formulação do coquetel enzimático customizado para esse material.
- b. Estabelecer protocolos para produção heteróloga de enzimas selecionadas na etapa “a”.
- c. Estabelecer protocolos para purificação das enzimas produzidas solúveis na etapa “b”.
- d. Caracterizar os parâmetros cinéticos das enzimas purificadas na etapa “b” em condições ótimas de temperatura e pH.

- e. Realizar ensaios de complementação do coquetel enzimático em desenvolvimento no CTBE com as enzimas selecionadas nas etapas anteriores.
- f. Cristalizar as enzimas purificadas na etapa “b”, visando obter suas estruturas tridimensionais em alta resolução pelo método de cristalografia de raios-X, que são instrumentais para o desenho racional das mesmas visando otimizá-las para aplicações industriais.
- g. Determinar a estrutura cristalográfica dos alvos cristalizados na etapa “f”.
- h. Inserir no genoma da plataforma microbiana CTBE/CNPEM os genes das enzimas selecionadas na etapa “e”
- i. Avaliar a performance da plataforma geneticamente modificada na sacarificação de bagaço ou palha de cana de açúcar pré-tratados.
- j. Submeter patentes para as enzimas que apresentarem resultados mais promissores na etapa “e”.
- k. Redação e submissão dos manuscritos sobre o consórcio descrito no item “a” e sobre a caracterização da estrutura e função das enzimas para as quais for possível alcançar as metas “b-g”.

Este desenvolvimento está fortemente atrelado ao desenvolvimento do pré-tratamento e irá envolver o conhecimento e infraestrutura de todos os LNs em principal LNBio e LNLS.

#### 5.4.2 – Bolsas

Formação Acadêmica / Titulação	Área de Experiência	Objetivo Específico	PCI categoria/nível	Número Máximo de Meses	Quantidade Maxima de Bolsas
Doutorado	Biologia, Biotecnologia, Engenharias, Química e afins	1,2	D-B	60	2

## 6. Projeto 6. Microbiologia do solo

### 6.2. Introdução

Os microrganismos presentes em ambientes naturais e/ou associados a hospedeiros tem ganhado cada vez mais relevância recentemente, pois desempenham papéis fundamentais nos ambientes que habitam. Microorganismos associados ao solo tem um papel chave tanto em ecossistemas naturais quanto em solos com manejos, pois interferem na ciclagem de nutrientes, manutenção da fertilidade do solo e no sequestro de carbono no solo, além de influenciar na produtividade de culturas [34].

Estima-se que um grama de solo contém milhares de táxons microbianos individuais, incluindo bactérias, arqueais, fungos e vírus [35]. Embora a maioria dos microrganismos do solo é desconhecida, avanços recentes em técnicas de análises moleculares, que incluem análises de genes marcadores, análises genômicas e metagenômicas, permitem caracterizar o microbioma do solo e identificar os fatores que moldam as comunidades microbianas do solo, com base em suas estratégias ecológicas [36, 37]. Esta abordagem pode ser muito interessante para prover informações genômicas e prever atributos funcionais associados à táxons individuais, pois ainda é pouco entendido o papel da microbiota do solo tanto no desenvolvimento vegetal bem como nas propriedades físicas e químicas do solo. Um desafio nesta área é entender como manipular e gerenciar o microbioma do solo para aumentar a fertilidade do solo, melhorar a produção agrícola e melhorar a compreensão de como os ecossistemas terrestres responderão às mudanças ambientais [34].

Espera-se que, com esse projeto, possa ser possível entender como o microbioma do solo pode para aumentar a fertilidade do solo, melhorando a produção agrícola e, também melhorar a compreensão de como os ecossistemas terrestres respondem às mudanças ambientais provocadas pela aplicação de vinhaça. Para isso serão utilizadas as instalações de Sequenciamento de Alto Desempenho NGS CTBE/CNPEM para as análises multi-ômicas, instalação Agrícola CTBE/CNPEM para o delineamento e realização de experimentos de campo e determinação de propriedades químicas do solo e a infraestrutura de outros LN como o LNLS para determinação de propriedades físicas do solo.

### 6.3. Objetivo Geral

Estudar a microbiota do solo por meio de técnicas multi-ômicas visando correlacionar e entender os impactos da microbiota nas propriedades físico-químicas do solo, emissões de gases de efeito estufa e na produtividade vegetal.

Objetivo Específico 1: Avaliação da Microbiota do solo em áreas com e sem aplicação de vinhaça.

Estudar os impactos da microbiota na qualidade do solo e suas emissões de gases de efeito estufa. Para isso serão realizadas análises físico-químicas e da microbiota do solo por meio de técnicas multi-ômicas em áreas com e sem aplicação de vinhaça, focando em entender e correlacionar como a composição da microbiota interfere nas propriedades físico-químicas do solo e qualidade do solo, além das emissões de gases de efeito estufa.

### 6.4. – Bolsas

Formação Acadêmica / Titulação	Área de Experiência	Objetivo Específico	PCI categoria/nível	Número Máximo de Meses	Quantidade Máxima de Bolsas
Doutorado	Biologia, Biotecnologia, Microbiologia, Bioinformática e afins	1	D-B	60	1

## 7. Projeto 7: Hidrocarbonetos renováveis

### 7.2. Introdução

O consumo de energia fóssil para o transporte no país é largamente representado pelo uso de óleo diesel, isto é, cerca de 45 % do consumo total do petróleo é destinado para esse combustível (ANP, <http://www.anp.gov.br/>). O diesel é um combustível usado para abastecer veículos de carga pesada (principalmente aqueles de trajeto de longa distância), tratores para a agroindústria, veículos marítimos (navios e submarinos) e, pode ser precursor do combustível para aviação, o que ratifica sua importância na economia e desenvolvimento do Brasil. Por outro lado, o uso desse combustível resulta em impactos ambientais bastante negativos para o planeta, fazendo-se necessárias estratégias de substituição por fontes mais limpas e mais benéficas. É de comum conhecimento que os veículos abastecidos com diesel dificilmente serão substituídos por tecnologia elétrica e provavelmente não terão seus motores e principais peças modificadas para atender a um novo tipo de combustível. Por isso, é imprescindível o desenvolvimento de novas tecnologias para a aplicação e utilização de biocombustíveis alternativos ao diesel, que além de ter caráter mais sustentável sejam também compatíveis com a infraestrutura e com os motores já existentes em caminhões,

tratores, navios e aviões. Nesse sentido, uma alternativa promissora são os chamados biocombustíveis *drop-in*, os quais são considerados ideais para a substituição dos combustíveis fósseis utilizados no setor de transportes, pois possuem características físicas e químicas muito similares aqueles originados a partir do petróleo e são compatíveis tanto com a infraestrutura como os motores já existentes. Diante disso, há um enorme estímulo para que novas rotas de produção de biocombustíveis *drop-in* sejam desenvolvidas e impulsionadas. Mediante a notoriedade do Brasil no cenário de biocombustíveis e a urgência para diminuir a emissão de CO<sub>2</sub> dos transportes aéreos, é de extremo interesse e estratégico para o país atuar no estudo e desenvolvimento de tecnologias que visam à produção de biocombustíveis *drop-in*.

Os biocombustíveis *drop-in* são constituídos de biohidrocarbonetos (ou hidrocarbonetos renováveis), formados por cadeias médias e longas de alcenos ou alcanos, os quais apresentam composições químicas e características físicas semelhantes aos combustíveis convencionais de petróleo e podem compartilhar a infraestrutura utilizada na distribuição da gasolina, diesel e combustível de aviação; além de ser compatível com os atuais motores dos veículos de transporte rodoviário, marítimo e aéreo.

O maior desafio para a produção de biocombustíveis *drop-in* a partir de óleos vegetais ou de materiais lignocelulósicos é a presença de intermediários oxigenados e insaturação (duplas ligações entre os carbonos) ao longo das cadeias de hidrocarbonetos. Esses elementos causam corrosão nas peças e motores dos veículos, além de contribuir para modificar a densidade e ponto de congelamento do combustível. Esse problema é ainda mais intensificado no setor aéreo, já que as temperaturas em altas altitudes são baixas e a presença do oxigênio resultará na modificação do líquido, conferindo um aspecto gelatinoso ao combustível. Os biohidrocarbonetos podem ser produzidos por processos químicos que requerem o uso de catalisadores metálicos de alto custo, altas pressões e temperaturas, além de grande quantidade de H<sub>2</sub>, o que os desfavorecem economicamente e os tornam prejudiciais ao meio ambiente. Uma rota alternativa e promissora para obtenção de hidrocarbonetos renováveis é a plataforma bioquímica fazendo uso de microrganismos engenheirados com enzimas altamente específicas e eficientes.

### 7.3. Objetivo Geral

O projeto propõe descobrir e desenvolver novas enzimas para que possam ser utilizadas em plataformas de produção de biocombustíveis avançados. O projeto estará focado em dois tipos de enzimas:

- Descarboxilases: que possuem atividade na remoção do oxigênio de ácidos graxos;
- Redutases: que possuem atividade na quebra da ligação dupla entre carbonos dos hidrocarbonetos.

**Objetivo Específico 1:** Prospecção e caracterização de descarboxilases e redutases para produção de hidrocarbonetos renováveis.

- a. Seleção das enzimas alvos por meio de análises *in-silico* e construção de redes de similaridade;
- b. Obtenção heteróloga das enzimas alvos de forma solúvel e pura;
- c. Obtenção das características estruturais das enzimas alvos;
- d. Desenvolvimento de métodos analíticos para o estudo funcional das enzimas;
- e. Realização de engenharia protéica e customização de enzimas;
- f. Avaliação da atuação sinérgica das enzimas em diferentes substratos e biomassas.

#### 7.4. Bolsas

Formação Acadêmica / Titulação	Área de Experiência	Objetivo Específico	PCI categoria/nível	Número Máximo de Meses	Quantidade Máxima de Bolsas
doutorado	Biologia, Biotecnologia, Engenharias, Química e afins	1	D-B	60	1

#### 8. Referências Bibliográficas

- [1] U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox. In Nassir Navab, Joachim Hornegger, William M. Wells, and Alejandro F. Frangi, editors, *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*, pages 234–241. Springer International Publishing, 2015.
- [2] Watersheds in digital spaces: An efficient algorithm based on immersion simulations. L. Vincent and P. Soille. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 13(6), Jun 1991
- [3] The image foresting transform: theory, algorithms, and applications. A. X. Falcão, J. Stolfi, and R. A. Lotufo. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 26(1):19–29, 2004.
- [4] Avizo guide. <http://www.fei.com/software/avizo-3d-user-guide.pdf>. Acessado em 27 de abril de 2018 às 14:20.
- [5] An active learning paradigm based on a priori data reduction and organization. Priscila T.M. Saito, Pedro J. de Rezende, Alexandre X. Falcão, Celso T.N. Suzuki, and Jancarlo F. Gomes. *Expert Syst. Appl.*, 41(14):6086 – 6097, 2014.
- [6] Crystal structure of the human b2 adrenergic G-protein-coupled receptor. Rasmussen et al., 2007. *Nature*, 450(15): 383-388.
- [7] A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment. Lee et al., 2016. *Nature Protocols* 11(7): 1149-1162.
- [8] Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. Cook D et al., 2014. *Nat Rev Drug Discov.* 2014. 13(6):419-31.
- [9] The ascendance of microphysiological system to solve the drug testing dilemma. Dehne E-M, Hasenberg T, Marx U. *Futur Sci.* 31, 2017, vol.3,2.
- [10] Sistemas microfisiológicos compostos por organoides humanos em dispositivos microfluídicos: avanços e desafios. TM Marin, Pagani E. *Visa em Debate* 2, 2018, Vol. 6, p 74
- [11] <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-awards-15-million-support-development-3-d-human-tissue-models>
- [12] <https://ncats.nih.gov/files/Tissue-Chip-factsheet.pdf>
- [13] Rede Nacional de Métodos Alternativos – RENAMA renovada pela portaria Nº 3.586, de 30 de junho de 2017 do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.
- [14] <https://ncats.nih.gov/tissuechip>
- [15] Wood-Derived Materials for Green Electronics, Biological Devices, and Energy Applications; Hongli Zhu, Wei Luo, Peter N. Ciesielski, Zhiqiang Fang, J. Y. Zhu, Gunnar Henriksson, Michael E. Himmel, Liangbing Hu; *Chem. Rev.* **2016**, 116, 9305–9374.
- [16] Cellulose-based Supercapacitors: Material and Performance Considerations; Zhaohui Wang Petter Tammela, Maria Strømme, Leif Nyholm; *Adv. Energy Mater.* **2017**, 7, 1700130.
- [17] Use of nanocellulose in printed electronics: a review; Fanny Hoeng, Aurore Denneulin, Julien Bras; *Nanoscale* **2016**, 8, 13131–13154.
- [18] An insight into nanocellulose as soft condensed matter: Challenge and future prospective toward environmental sustainability; Khang Wei Tan, Sung Ku Heo, Mei Ling Foob, Irene Mei Leng Chew, Chang Kyoo Yoo; *Science of the Total Environment* **2019**, 650, 1309–1326.



- [19] Bio-based nanostructured carbons toward sustainable technologies; Murilo Santhiago, Pamela S. Garcia, Mathias Strauss; *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2018**, 12, 22–26.
- [20] Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review; István Siró, David Plackett; *Cellulose* **2010**, 17, 459–494.
- [21] How safe are nanomaterials? E. Valsami-Jones, I. Lynch; *Science* **2015**, 350:6259, 388-389
- [22] Synchrotron radiation techniques for nanotoxicology; Yu-Feng Li, Jiating Zhao, Ying Qu, Yuxi Gao, Zhenghang Guo, Zuoliang Liu, Yuliang Zhao, Chunying Chen; *Nanomedicine – Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2015**, 11: 1531-1549
- [23] Advanced tools for the safety assessment of nanomaterials; Bengt Fadeel, Lucian Farcas, Barry Hardy, Socorro Vázquez-Campos, Danail Hristozov, Antonio Marcomini, Iseult Lynch, Eugenia Valsami-Jones, Harri Alenius and Kai Savolainen; *Nature Nanotechnology* **2018**, 13: 537-543.
- [24] Low-cost and rapid-production microfluidic electrochemical double-layer capacitors for fast and sensitive breast cancer diagnosis; Ricardo De Oliveira, Caroline Nicoliche, Anielli Pasqualetti, Flavio Shimizu, Iris Ribeiro, Matias Melendez, Andre Carvalho, Angelo Gobbi, Ronaldo Faria, Renato S. Lima; *Analytical Chemistry* **2018**, 90: 8b02605.
- [25] Monitoring the Surface Chemistry of Functionalized Nanomaterials with a Microfluidic Electronic Tongue; Flavio Shimizu, Anielli Pasqualetti, Fagner Todão, Jessica De Oliveira, Luis Vieira, Suely Gonçalves, Gabriela Silva, Mateus Cardoso, Angelo Gobbi, Diego Martinez, Osvaldo Oliveira, Renato S. Lima. *ACS Sensors* **2018**, 3: 716-726.
- [26] Defeating Bacterial Resistance and Preventing Mammalian Cells Toxicity through Rational Design of Antibiotic-Functionalized Nanoparticles; Jessica De Oliveira, Ângela Saito, Ariadne Bido, Jörg Kobarg, Hubert Stassen, Mateus B. Cardoso; *Scientific Reports* **2017**, 7: 1326
- [27] Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals: A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology. Zhou Z, Lei F, Li P, Jiang J. *Biotechnol Bioeng*. 2018 Jun 30.
- [28] Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. Rocha, G. J. M., Vm Nascimento, Ar Goncalves, Vfn Silva. *Industrial Crops and Products* 64, 52-58, 2015.
- [29] Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. Ragauskas, A. J., Gregg T. Beckham, Mary J. Bidy, Richard Chandra, Fang Chen, Mark F. Davis, Brian H. Davison, Richard A. Dixon, Paul Gilna, Martin Keller, Paul Langan, Amit K. Naskar, Jack N. Saddler, Timothy J. Tschaplinski, Gerald A. Tuskan, Charles E. Wyman. *Science* vol. 344, (2014).
- [30] Physicochemical characterization of residue from the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse in a cellulosic ethanol process at pilot scale. Menezes, Fabrícia Farias ; Da Silva Fernandes, Renan Henrique; George Jackson De Moraes Rocha; Maciel Filho, Rubens. *Industrial Crops and Products*, v. 94, p. 463-470, 2016.
- [31] The mechanism by which a distinguishing arabinofuranosidase can cope with internal di-substitutions in arabinoxylans. Dos Santos CR, de Giuseppe PO, de Souza FHM, Zanphorlin LM, Domingues MN, Pirolla RAS, Honorato RV, Tonoli CCC, de Morais MAB, de Matos Martins VP, Fonseca LM, Büchli F, de Oliveira PSL, Gozzo FC, Murakami MT. *Biotechnol Biofuels*. 2018 Aug 11;11:223.
- [32] Structural basis of exo- $\beta$ -mannanase activity in the GH2 family. Domingues MN, Souza FHM, Vieira PS, de Morais MAB, Zanphorlin LM, Dos Santos CR, Pirolla RAS, Honorato RV, de Oliveira PSL, Gozzo FC, Murakami MT. *J Biol Chem*. 2018 Aug 31;293(35):13636-13649.
- [33] A novel  $\beta$ -glucosidase isolated from the microbial metagenome of Lake Poraquê (Amazon, Brazil). Toyama D, de Morais MAB, Ramos FC, Zanphorlin LM, Tonoli CCC, Balula AF, de

Miranda FP, Almeida VM, Marana SR, Ruller R, Murakami MT, Henrique-Silva F. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2018 Apr;1866(4):569-579.

[34] Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. N. Fierer. *Nat. Rev. Microbiol.* 15 (2017) 579–590. doi:10.1038/nrmicro.2017.87.

[35] Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. H.M. Serna-Chavez, N. Fierer, P.M. van Bodegom. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 22 (2013) 1162–1172. doi:10.1111/geb.12070.

[36] Molecular Approaches to Studying the Soil Biota. E.A. Paul, J.E. Thies. *Soil Microbiol. Ecol. Biochem.* (2015) 151–185. doi:10.1016/B978-0-12-415955-6.00006-2.

[37] Physiological and Biochemical Methods for Studying Soil Biota and Their Functions. E.A. Paul, E. Kandeler. *Soil Microbiol. Ecol. Biochem.* (2015) 187–222. doi:10.1016/B978-0-12-415955-6.00007-4.