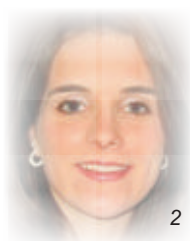


PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS INTRACELULARES PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS



1. Francislene Andréa Hasmann

Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo. Caixa Postal: 116 – 12.602 810. Lorena/SP.
Email: francislene@debiq.eel.usp.br; São Paulo – SP

2. Priscila Gava Mazzola

Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, CEP 05508-000

3. Pérola de Oliveira Magalhães

Universidade de Brasília - Faculdade de Ciências da Saúde -
Curso de Ciências Farmacêuticas; CEP 70910-900 Brasília.

4. Thereza Christina Vessoni Penna

Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, CEP 05508-000

5. Adalberto Pessoa Junior

INTRODUÇÃO

Os produtos de origem microbiana (bioprodutos ou biomoléculas), dos mais elaborados (como os vetores de terapia gênica) aos tradicionais (como o etanol), ocupam posição central nas sociedades atuais. A obtenção destes produtos normalmente é efetuada por processos de bioconversão, síntese bioquímica ou ainda por extração de fontes naturais. Assim, o produto desejado pode ter sido liberado pelas células num meio complexo após a bioconversão, ser a própria célula, ou ainda ser um metabólito celular que deve ser reti-

rado do interior das células. Em bioprocessos, qualquer tratamento aplicado com o intuito de se extrair uma biomolécula é conhecido como “*downstream processing*”, ou seja, operações unitárias aplicadas em bioprocessos e biomoléculas.

O processo de purificação de biomoléculas intracelulares (aquelas que são produzidas pelas células, mas não são naturalmente liberadas) constitui etapa complexa do processo produtivo por dois principais motivos: i) envolve uma etapa adicional de rompimento celular, gerando assim um meio ainda mais complexo, cha-

mado homogeneizado, com *debris* celulares, organelas, ácidos nucleicos, proteínas contaminantes, componentes do meio de cultura, pigmentos, polissacarídeos, entre outros, os quais além de aumentar a complexibilidade do meio podem ainda danificar a estrutura biológica da biomolécula e ii) devido às características das biomoléculas de interesse, as quais no geral, são sensíveis à temperatura, pH, entre outros. Dentre as biomoléculas intracelulares de interesse merecem destaque aquelas produzidas por leveduras, tais como: enzimas (glicose-6-fosfato desidrogenase, hexo-

quinase), peptídeos (antígeno de superfície da Hepatite B) e proteínas (HIV-1 gp 120, interferon- α) (Kula 1982, Mazzola *et al.* 2006).

Embora cada esquema de purificação envolva etapas diferentes, a Figura 1 apresenta uma seqüência genérica de etapas de purificação de biomoléculas intracelulares.

A produção industrial de biomoléculas de interesse depende estritamente das técnicas de purificação adotadas. Dada a sua complexibilidade - número de operações unitárias necessárias, entre outros fatores - a etapa de purificação contribui substancialmente para os custos totais da obtenção de uma biomolécula. Estima-se aproximadamente que a razão entre os custos da produção e os de purificação seja de 60:40 (*upstream* e *downstream*, respectivamente). No entanto, estes custos tornam-se maiores quando são exigidos graus de pureza elevados, uma vez que podem ser necessárias: etapas de alto custo, tais como cromatografia de afinidade e troca iônica (Chang & Chase 1996), número elevado de etapas, ou ainda, quando estas biomoléculas são obtidas em baixas concentrações nas células ou biorreatores.

Assim, a pesquisa e o desenvolvimento de técnicas mais econômicas e simplificadas para a purificação de enzimas e biomoléculas apresentam grande interesse tecnológico. Dentre as técnicas estudadas para recuperação e/ou purificação de biomoléculas, destaca-se a extração líquido-líquido devido à sua eficiência, versatilidade, baixo custo e facilidade de ampliação em escala. Esta operação unitária é empregada na indústria, e consiste basicamente na utilização de sistemas formados de água/solventes orgânicos para extração de diversas substâncias, como por exemplo, na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos. A extração convencional aplicada na indústria química, entretanto, consiste em sistemas água-solvente orgânico, de forma que apresenta elevado risco de danos às biomoléculas. Na purificação de biomoléculas, com a finalidade de capitalizar os benefícios da extração líquido-líquido convencional, fluidos aquosos complexos têm sido utilizados nos processos de extração, formando sistemas mais amenos (Belter *et al.* 1988).

Destacam-se as extrações líquido-líquido por sistemas micelares de duas fases aquosas, sistemas de micelas reversas, e sistemas poliméricos de duas fases aquosas. Estes processos de extração lí-

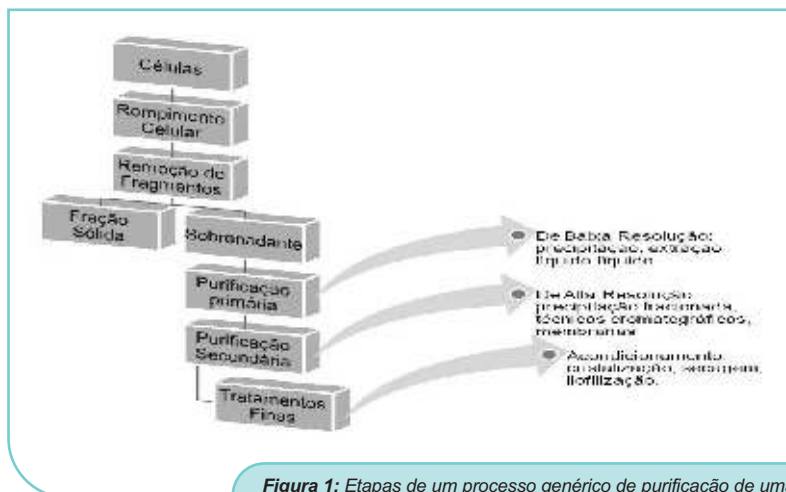


Figura 1: Etapas de um processo genérico de purificação de uma biomolécula intracelular (Adaptado de Pessoa-Jr & Kilikian 2005).

quido-líquido têm sido usados com êxito na purificação de biomoléculas, entre elas as enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, hexoquinase, xilitol desidrogenase e outras.

PROCESSOS DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A extração líquido-líquido é um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira. Dentre os diferentes tipos de sistemas de extração líquido-líquido propostos para este fim, estão os Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA), constituídos primariamente por moléculas de tensoativos que tendem a formar micelas. Oferecem simultaneamente um ambiente hidrofóbico e outro hidrofílico, o que permite a seletividade na partição das biomoléculas (Rangel-Yagui 2003).

Na composição destes sistemas, são empregados polímeros hidrofílicos ou tensoativos não-iônicos adicionados a soluções aquosas, que formam duas fases imiscíveis. O elevado teor de água das fases formadas, de 75 a 90% em massa, garante a manutenção das propriedades biológicas das biomoléculas de interesse. Assim, biomoléculas podem ser purificadas em decorrência da partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as fases líquidas.

São fatores decisivos as propriedades de superfície das proteínas, tais como: carga elétrica, hidrofobicidade e massa molecular (Albertsson 1986).

O método de separação de biomoléculas por SMDFA explora a característica

que alguns sistemas possuem de que, quando submetidos a determinadas condições, podem espontaneamente se separar em duas fases líquidas aquosas e imiscíveis. Considerável interesse tem sido verificado na utilização destes sistemas para purificar e concentrar compostos como BSA, bacteriófagos, antibióticos, lisozima e outras enzimas, vitaminas lipossolúveis e compostos orgânicos (Rangel-Yagui 2003; Quina & Hinze 1999).

Agentes tensoativos são moléculas tipicamente compostas por duas partes quimicamente distintas: uma porção hidrofílica e outra, hidrofóbica. Em função desta estrutura química diferenciada, quando estas moléculas de agentes tensoativos são dissolvidas em água ocorre formação espontânea de estruturas agregadas nanométricas conhecidas como micelas. Nestas, as caudas hidrofóbicas se atraem minimizando o contato com a água, enquanto que as cabeças hidrofílicas permanecem na superfície externa da micela para maximizar esse contato (Chevalier & Zemb 1990). A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo forças de Van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (Israelachvili 1991).

Sob determinadas temperaturas e concentrações de agentes tensoativos, uma solução aquosa micelar homogênea pode se separar em duas fases macroscópicas, ambas contendo micelas, porém, com uma delas apresentando maior concentração destes agregados. Esta separação de fases é induzida pelo "aumento da temperatura" do sistema e pode ser representada por uma curva em forma de sino deno-

minada de curva binodal, que é construída variando-se a concentração do tensoativo e a temperatura. Esta representa o limite de separação na qual a solução micelar se separa em duas fases macroscópicas, como resultado da competição entre os efeitos da "energia interna" que promove a separação das micelas da água e os efeitos entrópicos, que promovem a miscibilidade das micelas na água (Blankschtein *et al.* 1986).

Embora os agentes tensoativos, em particular os iônicos (dodecil sulfato de sódio), possam se ligar a proteínas resultando em sua desnaturação, existem tensoativos não-carregados (Triton X-114, óxido de n-decil-tetraetileno (C₁₀E₄)) que não se ligam de forma intensa a estas biomoléculas e, portanto, não as desnaturam. Desse modo, os SMDFA constituídos por agentes tensoativos não-carregados podem proporcionar um ambiente ameno e compatível com as biomoléculas. As micelas, por serem susceptíveis a modificações em sua estrutura, possibilitam o controle e otimização da partição de biomoléculas pelo ajuste das suas características como tamanho e forma através da variação da temperatura, concentração do tensoativo e adição de sais. Além disso, a seletividade da partição pode ser melhorada com a utilização de ligantes de afinidade específicos à biomolécula-alvo ou misturas de tensoativos iônicos e não-iônicos (Makino *et al.* 1973).

O trabalho pioneiro que mostrou a possibilidade de extração de proteínas por sistemas micelares, utilizando-se o tensoativo não-iônico Triton X-114, foi o de Bordier,

em 1981. Soluções aquosas de Triton X-114 se separam em duas fases quando a temperatura é aumentada acima de 20 °C. Posteriormente, Minuth *et al.* (1996) realizaram a purificação da enzima colesterol oxidase em somente duas etapas, SMDFA seguido de cromatografia de troca-iônica, obtendo um fator de purificação de 160 e recuperação enzimática total de 80%.

Adicionalmente, a seletividade na partição de proteínas em SMDFA pode ser otimizada pela presença de ligantes de afinidade. Se o ligante de afinidade apresentar partição preferencial para uma das fases, existe a possibilidade deste influenciar a partição da proteína-alvo sem necessidade de ligação covalente do ligante ao tensoativo. É desejável, portanto, que o ligante de afinidade particione de maneira desigual entre as fases e influencie a partição da proteína-alvo para a mesma fase à qual ele migra (Quina & Hinze 1999).

Semelhantemente ao que ocorre em meio aquoso, quando substâncias anfifílicas como os tensoativos são dissolvidas em meio solvente orgânico, formam agregados nanométricos denominados micelas reversas. Estas estruturas se formam tanto na ausência quanto na presença de água, todavia, se a estrutura é completamente livre de água, os agregados são muito pequenos e polidispersos. Esta agregação em meio solvente é mais complexa do que a formação de micelas em meio aquoso, dependendo adicionalmente de fatores tais como tipo e concentração de tensoativo e/ou solvente empregado.

Na extração líquido-líquido por sistemas micelares reversos (SMR), é possível

não somente purificar biomoléculas, mas também concentrá-las, uma vez que geralmente são obtidas em baixas concentrações nos biorreatores. É um método de purificação no qual com a alteração de parâmetros como pH, concentração de tensoativo, tipo e concentração de solvente, temperatura, entre outros, pode-se alterar a especificidade do sistema, melhorando o processo de extração. Esta técnica apresenta-se promissora para purificação de biomoléculas, e está fundamentada em tradicionais e bem estabelecidas operações de engenharia, tornando simples a sua execução em sistema descontínuo e contínuo, possibilitando ainda a ampliação de escala. O método tem despertado o interesse de pesquisadores sendo que a nano-solubilização de componentes biologicamente ativos tais como aminoácidos (Furusaki *et al.* 1990), peptídeos (Leodidis & Hatton 1990), enzimas (Hasmann *et al.* 2007b) entre outros, tem sido amplamente estudada.

As micelas reversas possuem três áreas nas quais as biomoléculas podem ser nano-encapsuladas: i) no centro aquoso, ii) na interface entre as porções hidrofílicas do tensoativo; e iii) na fase orgânica externa. Os tensoativos mais comumente empregados em sistemas de micelas reversas podem ser divididos com relação à carga da sua porção polar em: i) **aniônicos**, como o aerosol-OT (AOT); ii) **catiônicos**, como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB); iii) **neutros**, como o Triton; e iv) **zwiteriônicos**, como a lecitina de soja. A escolha do tensoativo num processo de purificação deve considerar o ponto isoelétrico (pI) da biomolécula e o tamanho da micela desejada.

O mecanismo de nano-encapsulação por micelas reversas não está totalmente elucidado. No entanto, a teoria mais aceita descreve a formação das micelas reversas como um mecanismo cooperativo entre biomoléculas e tensoativo: a interface entre as duas fases (aquosa e micelar) se deforma em torno da biomolécula, formando a micela reversa e transferindo-a para a fase orgânica, conforme ilustrado na Figura 4 (Dungan, *et al.* 1991).

Vários fatores têm sido reportados como significativos para a extração de biomoléculas por SMR, como: grau de hidratação, pH, solventes e co-solventes (tipo e concentração), temperatura, dentre outros.

O comportamento de proteínas é dependente do pH da solução, pois este determina a rede de cargas da proteína.

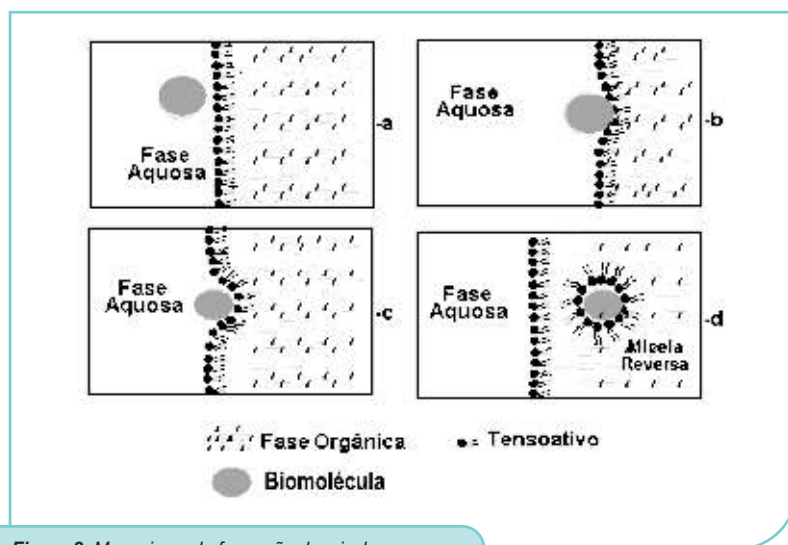


Figura 2: Mecanismo de formação de micelas reversas.

Usando soluções com valores de pH inferiores aos do ponto isoelétrico da proteína, esta apresentará carga líquida positiva, ao contrário, terá carga líquida negativa. Portanto, para que o não-encapsulamento da proteína ocorra, através de interações eletrostáticas, é necessário que exista diferença de cargas entre esta e o tensoativo (Hasmann *et al.* 2001), sendo possível que as extrações ocorram tanto por interações eletrostáticas quanto por forças hidrofóbicas (Hasmann *et al.* 2000 e 2001).

Várias correlações têm sido estabelecidas entre os solventes e co-solventes e as suas propriedades no tocante a mudanças no comportamento e estabilidade das biomoléculas e o tamanho das micelas (Hou *et al.* 1988). Hilhorst *et al.* (1995) estudando a extração de -amilase, utilizando Aliquat 336, verificaram ser o processo sensível às variações no tipo de co-solvente utilizado no sistema, alterando a sua capacidade de extração.

A temperatura é também um fator de importância na absorção de biomoléculas por micelas reversas, pois influencia a capacidade máxima de absorção das micelas reversas. Dentro de uma determinada faixa de temperatura, as micelas reversas são formações estáveis, o que favorece a absorção de moléculas, a temperaturas mais elevadas vai depender mais da sua termoestabilidade do que da capacidade de absorção da micela (Krei & Hustedt 1992, Pessoa & Vitolo 1998). Outros fatores também têm sido estudados e demonstram a influência sobre o processo: força iônica, tipo e concentração do tensoativo, emprego de aditivos, etc.

Vários estudos empregando SMR têm sido conduzidos com êxito. Hasmann *et al.* (2007a,b) empregando SMR formado pelo tensoativo zwitteriônico lecitina de soja (em iso-octano e hexanol) em estudos de purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (presente em células de *S. cerevisiae*) obtiveram um aumento de pureza de 5,4 vezes para enzima presente no homogeneizado livre de células. Cortez *et al.* (2004), empregando CTAB em iso-octano/hexanol/butanol, alcançaram fatores de purificação de 5,6 e 1,6 vezes respectivamente, para as enzimas intracelulares xilose redutase e xilitol desidrogenase, presentes no homogeneizado celular de *Candida guilliermondii*. Empregando este SMR, Peffi e colaboradores (2005) alcançaram valores de recuperação superiores a 90% para a enzima glicose oxidase obtida de *Aspergillus niger*.

Outra possibilidade tecnológica, o uso

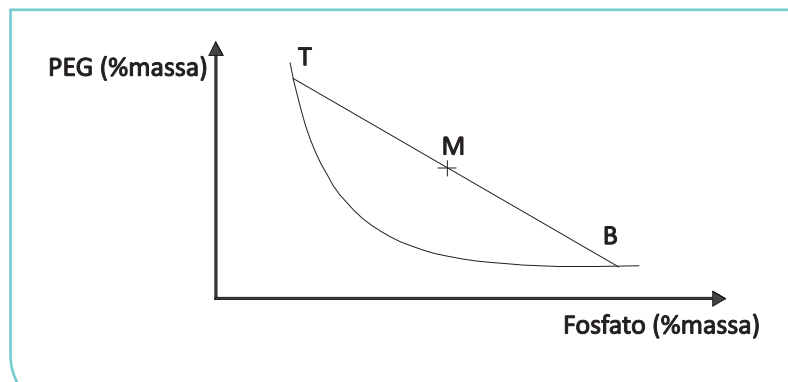


Figura 3: Curva de equilíbrio do sistema PEG/fosfato (Pessoa-Jr & Kilikian 2005).

de sistemas aquosos bifásicos ou sistemas de duas fases aquosas (SAB ou SDFA), tem sido avaliada como alternativa aos métodos tradicionais de extração líquido-líquido desde 1956. A técnica é utilizada na purificação de diferentes biomoléculas de origem animal, vegetal e microbiana, na extração de vírus, organelas e ácidos nucleicos, devendo-se destacar a aplicação na purificação de enzimas.

Estes sistemas são formados pela reunião de determinados polímeros, polieletrólitos, ou ainda, polímeros em combinação com solutos de baixa massa molar, em uma mesma solução, formando quatro tipos de sistemas possíveis. Em todos os casos, são obtidas duas fases aquosas imiscíveis com elevado teor de água, de 75% a 80% em massa, garantindo, desta forma, a integridade das biomoléculas. A purificação é resultado de uma partição diferenciada da molécula alvo e impurezas entre as duas fases (Silva & Franco 2000).

Num primeiro grupo de SDFA podem ser englobados os sistemas formados por dois polímeros não iônicos, como o polietilenoglicol PEG/Dextrana (Dx) e polipropilenoglicol (PPG)/dextrana. Num segundo, sistemas formados por um polieletrólito e um polímero, como sulfato dextrana de sódio/polipropileno glicol e carboximetilcelulose de sódio/metil celulose. Os SDFA formados por dois polieletrólitos constituiriam um terceiro grupo. São exemplos, os sistemas sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio e carboximetildextrana de sódio / carboximetilcelulose de sódio. E, num quarto grupo, tem-se um polímero não iônico e um composto de baixa massa molar, tais como PPG/fosfato de potássio e PEG/fosfato de potássio. Os sistemas formados por PEG e sal, são muito empregados devido à rápida separação das fases, baixos custos e al-

ta seletividade na separação (Silva & Franco 2000).

O SDFA é representado em um diagrama de fases no qual a ordenada, representa a composição em massa da molécula que apresenta maior concentração na fase de topo (PEG, por exemplo) e a abscissa, representa a composição da molécula de maior concentração na fase de fundo (sal ou dextrana, por exemplo). Composições representadas por pontos acima da curva de equilíbrio, também denominada curva binodal, levam à formação de duas fases e, abaixo da curva, a uma só fase, como representado na Figura 5.

Após o estabelecimento do equilíbrio, o sistema cuja composição inicial era dada pelo ponto M, apresenta as composições indicadas pelos pontos T (fase de topo) e B (fase de fundo), de tal modo que ambos os componentes do sistema estão presentes nas fases líquidas. A reta TMB é chamada linha de amarração ('tie-line'). Os sistemas cuja composição inicial encontra-se sobre uma mesma linha de amarração possuem a mesma composição final (fases de topo e fundo). Porém, a relação de volumes entre as fases é diferente para cada composição, de acordo com a razão entre os segmentos TM e BM, a qual é igual à razão entre os volumes de fase de fundo e topo. As diversas linhas de amarração são paralelas entre si.

Os principais fatores que influenciam a posição do equilíbrio em um SDFA são a massa molar do polímero, tipo de sal e concentração dos componentes (Kula *et al.* 1982). A literatura apresenta significativa variedade de modelos e teorias, o que denota o pouco conhecimento sobre os fundamentos que explicam a formação de duas fases líquidas imiscíveis, sobretudo no equilíbrio de sistemas polímero-polímero e polímero-sal. A grande maioria dos mode-

los está contida em dois grupos básicos: um grupo baseado na teoria da solução de polímeros e outro com teorias adaptadas dos tratamentos termodinâmicos do equilíbrio de fases líquidas (Pessoa Jr. & Kilikian 2005).

A diferença de viscosidade entre as duas fases líquidas, bem como a diferença de força iônica (relacionadas à condição de menor potencial químico), sobretudo no caso dos sistemas PEG/sal, auxilia na manutenção da segregação das fases. A partição de proteínas ou outras biomoléculas entre as duas fases é regida pela condição de menor potencial químico ou maior solubilidade, isto é, a biomolécula apresentará maior concentração na fase em que o seu potencial químico for menor ou a sua solubilidade for maior. Desta forma, as características físico-químicas das proteínas (hidrofobicidade, carga superficial e massa molar) e da solução (pH e força iônica), serão determinantes para a partição. Considerando-se que a maior parte da solubilidade de proteínas está baseada nas interações das cargas superficiais com íons em solução, a distribuição de cargas é fator importante na extração em SDFA. Portanto, pH e força iônica são importantes ao processo.

A influência da força iônica do meio ocorre, sobretudo, em sistemas contendo sulfatos ou fosfatos, devido à alta concentração dos sais, entre 0,5 e 2 M, que atua reduzindo a solubilidade da molécula na fase salina, que migra para a fase menos polar na qual apresentará maior solubilidade, um efeito de "salting-out". O tipo de polímero e a sua massa molar também influem na partição, sistemas constituídos por PEG de massa molar superior a 1500 Da, a partição é favorável à fase salina devido ao mecanismo da exclusão molecular.

Além da exclusão molecular, a elevada massa molar gera alta área de contato entre biomoléculas e componentes do sistema e, de acordo com as características da molécula e tipo de interação, ela terá mais afinidade por uma das fases. Este fator é importante quando da separação de moléculas com massas molares diferentes. De modo geral, a partição é menos eficiente e diminui com o aumento da massa molar da proteína. Células e seus fragmentos podem ser extraídos em um SDFA, o que é particularmente vantajoso quando se trata de sólidos de pequena dimensão, como os fragmentos celulares, e bolores, cuja densidade próxima à da água, dificulta ou até mesmo inviabiliza a clarificação por centrifugação. Além disso, pode-se integrar o processo, uma vez que frequentemente células e os seus fragmentos localizam-se na interface do sistema ou na fase de fundo, quando esta fase é rica em sal.

BIOMOLÉCULAS INTRACELULARES DE LEVEDURAS DE INTERESSE COMERCIAL

As leveduras são organismos eucarióticos unicelulares que existem no solo, ar, plantas, frutos e alimentos. A espécie mais estudada é a *Saccharomyces cerevisiae* e encontra-se no centro da Biotecnologia tradicional, pelo seu papel milenar na produção de pão, vinho e cerveja, devido à sua capacidade de produzir álcool (sobretudo o etanol, presente em bebidas fermentadas) e dióxido de carbono (que permite a expansão da massa do pão), a partir de açúcares. Além de desempenhar um importante papel em processos biotecnológicos relevantes, esta levedura é amplamente utilizada como modelo experimental eucariótico em estudos de biologia fundamental e aplicada.

Outros gêneros de levedura como *Schwanniomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Yarrowia* e *Candida* também têm sido amplamente usadas na biotecnologia moderna, como hospedeiros na produção de proteínas recombinantes. Destaque às leveduras metilotróficas, *P. pastoris* e *H. polymorpha*, os hospedeiros escolhidos por várias companhias biofarmacêuticas no desenvolvimento de proteínas terapêuticas obtidas por tecnologia de DNA recombinante (Cereghino & Cregg 1999; Geymonat, et al. 2007). Na Tabela 2 encontram-se algumas leveduras e as suas biomoléculas de interesse comercial.

Uma série destas biomoléculas purificadas de leveduras foram secretadas no meio de cultivo pelo microrganismo, tornando o processo de *downstream* menos complexo. Deve-se à engenharia genética a possibilidade de hoje muitas proteínas intracelulares serem secretadas extracelularmente. Entretanto, existem inúmeras biomoléculas intracelulares produzidas por leveduras, as quais apresentam interesse para aplicações na saúde e na alimentação humana e animal. Dentre as biomoléculas intracelulares de importância existem enzimas (glicose-6-fosfato desidrogenase), peptídeos (antígeno da hepatite B) e proteínas (interferon- α 8).

Diferentes técnicas foram utilizadas no processo de purificação destas biomoléculas. O antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) derivado de *H. polymorpha* é de grande importância no desenvolvimento terapêutico e foi purificado por cromatografia de interação hidrofóbica por diferentes pesquisadores (Zhou, et al. 2007). O interferon- α 8 produzido por *S. cerevisiae*, foi purificado usando cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica (Di Marco et al. 1996).

TABELA 2: BIOMOLÉCULAS PRODUZIDAS POR LEVEDURAS

LEVEDURAS	PRODUTOS	LEVEDURAS	PRODUTOS
<i>H. polymorpha</i>	a-galactosidase Glicoamilase Glicose oxidase Albumina sérica humana Antígeno de superfície	<i>S. cerevisiae</i>	a-galactosidase Interferon-g Humano Pro-uroquinase humana tPA humana Prochymosin
<i>K. lactis</i>	a-galactosidase Lisozima bovina a-amilase	<i>S. pombe</i>	Antitrombina III Fator XIIa β -galactosidase
<i>P. pastoris</i>	Proquimiosina Insulina humana Estreptoquinase Fator de necrose tumoral Fragmento C (toxina tetânica)	<i>Y. lipolytica</i>	Bacterio-rhodopsin Proquimiosina Bovina Invertase β -galactosidase Anafilatoxina humana C5a

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), produzida por *S. cerevisiae* teve a sua purificação por extração líquido-líquido estudada (Hasmann *et al.* 2007). Esta enzima catalisa a primeira etapa da via das pentoses fosfato. Devido à sua alta atividade catalítica e especificidade ao substrato, G6PD tem sido amplamente usada como reagente em muitos doseamentos enzimáticos, como na determinação da concentração de ATP e hexoses. Estes autores obtiveram em processo contínuo um rendimento de aproximadamente 100%.

BIOMOLÉCULAS INTRACELULARES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS DE INTERESSE COMERCIAL

A proteína verde fluorescente recombinante, GFPuv, é expressada intracelularmente por bactérias, tais como *Escherichia coli*, podendo ser produzida em maior quantidade por processos fermentativos. No entanto, para se utilizar GFP como indicador biológico é necessário que seja desenvolvido um método de purificação simples e com boa relação custo-benefício. A proteína verde fluorescente (GFP) pode ser empregada como indicador biológico devido a facilidade de sua detecção por espectrofluorimetria ou por inspeção visual utilizando lâmpada UV portátil (Penna *et al.*, 2004). A proteína GFP demonstrou em trabalhos anteriores resistência à exposição à agentes químicos e à temperaturas elevadas (Penna *et al.*, 2004). A resistência da GFP possibilita sua utilização como indicador biológico, pois após um determinado tratamento a ausência ou diminuição da intensidade de fluorescência emitida indica que microrganismos presentes também foram afetados.

Outro composto interessante e que vem ganhando importância atualmente, devido a necessidade de substituir polímeros sintéticos por compostos naturais biodegradáveis é o polihidroxibutirato (PHB).



Figura 6: Grânulos de PHB acumulados em *Alcaligenes latus*. (fonte: http://www.nrc-cnrc.gc.ca/highlights/2007/0703maplesap_e.html)

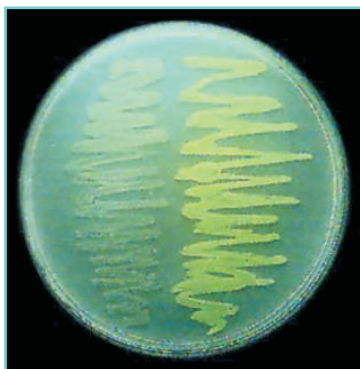


Figura 4: Células de *E. coli* transformadas expressando a proteína verde fluorescente (GFP), sob luz UV. (fonte: <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/chalfie.html>)

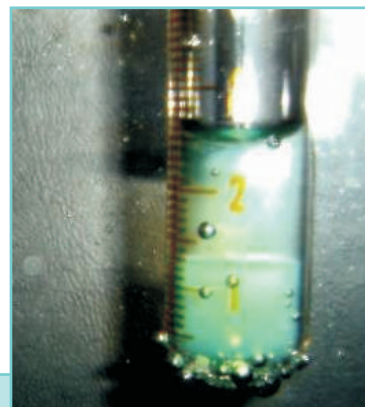


Figura 5: Proteína verde fluorescente (GFP), sob luz UV, após extração em Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas, no qual a proteína particiona preferencialmente para a fase inferior.

O PHB é um composto de uma classe dos polímeros termoplásticos chamados “polihidroxialcanoatos” que atuam como reserva de carbono para obtenção de energia. Tais polímeros, em condições apropriadas de cultivo bacteriano, são acumulados na forma de grânulos intracelulares, que podem ser removidos após rompimento celular, gerando resina plástica com propriedades semelhantes às dos plásticos de origem petroquímica (Coutinho *et al.*, 2004). O PHB pode ser produzido a partir do cultivo de diversas bactérias gram-negativa, incluindo *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus* e *Escherichia coli* recombinante (Lee *et al.*, 1999; Coutinho *et al.*, 2004).

As bactérias Gram-negativas apresentam toxinas estáveis que constituem a estrutura da membrana celular, denominadas endotoxinas, as quais participam na interação com o ambiente e com possíveis hospedeiros (Park *et al.*, 2004). Ainda que ligadas às células, as endotoxinas continuamente se liberam ao meio (Píluso, Martinez, 1999). Estas toxinas não atuam diretamente sobre células ou órgãos, mas sim através do sistema imunológico, principalmente por ação dos monócitos e macrófagos os quais desencadeiam reações que geram determinados mediadores como as interleucinas e fator de necrose tumoral, além de radicais livres. Estas substâncias constituem potentes agentes biológicos e são responsáveis pelos efeitos adversos decorrentes da exposição às endotoxinas, os quais incluem: alterações na função e estrutura de células e órgãos, alteração de funções metabólicas, aumento da temperatura corpórea, ativação da cascata de co-

agulação sanguínea, modificações hemodinâmicas, culminando com choque séptico (Bamba, 1996; Martich *et al.*, 1993; Poxon, Hughes, 1999). A extração de endotoxinas pode ter dois objetivos distintos: (i) remoção de contaminante, neste caso, alto grau de pureza e alto teor de atividade biológica não constituem o objetivo principal; e (ii) concentração e purificação para uso como ferramenta de análise, uma vez que o LPS é utilizado como agente de controle de infecção em ensaios imunológicos, uma vez que estimula em diferentes graus (dependendo da concentração) o sistema imune de modelos animais para ensaios com novos fármacos e vacinas.

Outros exemplos de biomoléculas intracelulares produzidas por bactérias são a α -amilase de *Thermotoga maritima* e a peroxidase de *Bacillus sphaericus*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além destas biomoléculas, várias outras poderiam ser citadas, considerando que as leveduras tornaram-se importantes no desenvolvimento da biotecnologia moderna, com as suas aplicações nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (Walker 1999).

A obtenção de diferentes biomoléculas de valor comercial e de interesse farmacêutico impetrou nos últimos anos intensos avanços. No entanto, os processos de purificação não alcançaram o mesmo grau de desenvolvimento tecnológico, o que torna fundamental o estudo de métodos e técnicas que possibilitem a purificação destes bioprodutos e que ofereçam ao mesmo tempo boa relação custo-benefício, resí-

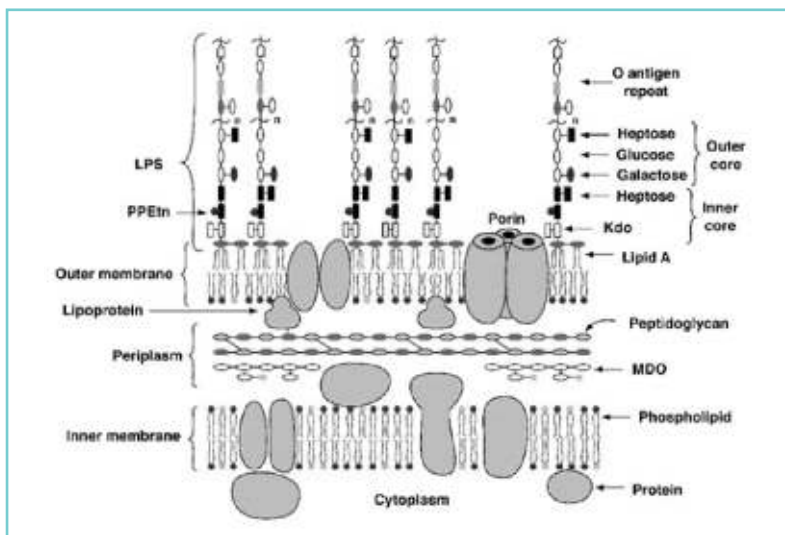


Figura 7: Estrutura química da endotoxina de *E. coli* O111:B7, extraída de Ohno & Morrison (1989). Hep, L-glicero-D-manno-heptose; Gal, galactose; Glc, glicose; KDO, ácido 2-ceto-3-deoioctônico; NGa, N-acetil-galactosamina; NGc, N-acetil-glicosamina.

duos de fácil descarte e facilidade de ampliação de escala, especialmente quando comparados aos métodos tradicionais.

Assim, os processos de extração líquido-líquido têm apresentado resultados relevantes na purificação de biomoléculas, e a compreensão dos mecanismos de extração, identificação de fatores críticos e otimização das condições de condução dos processos têm crescido consideravelmente.

REFERÊNCIAS

Albertsson, P.A. 1986. Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems. Pp. 709-771. In: Albertsson, P.A (ed) Partition of Cell Particles and Macromolecules, 3rd Edition, New York, Wiley Intersciences.

Bamba, T., Matsui, R., Watabe, K. Enhancing effect of non-ionic surfactant on the inactivation of lipopolysaccharide by steam-heat treatment. *J. Pharm. Sci. Technol.*, v.50, n.6, p.360-365, 1996.

Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Hu, W.S. 1988. Bioseparations: downstream processing for biotechnology. 421p. New York: John Wiley.

Blankschtein, D.; Thurston, G.M.; Benedek, G.B. 1986. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. *J. Chem. Phys.* 85: 7268-7288.

Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256:1604-1607.

Campbell, B. 2003. Cell disruption: breaking the mould: An overview of yeast and bacteria high-pressure cell disruption. *Intern. Labmat*, p 16-17.

Carvalho, C.M.L.; Cabral, J.M.S. 2000. Reverse micelles as reaction media for lipases, *Biochimie* 82: 1063-1085.

Cereghino, G.P.L.; Cregg, J.M. 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 422-427.

Chang, Y.K.; Chase, H.A. 2000. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: The effect of the degree of bed expansion on adsorption performance *Biotechnol. Bioeng.* 49: 512-526.

Chao, K.C.; Mc Carthy, E.F.; Mc Coneghy, G.A. 1980. *Yeast autolysis process*. Patente 4, 218, 481. EUA, 19Ago 1980.

Chevalier, Y.; Zemb, T. 1990. The structure of micelles and microemulsions. *Rep. Prog. Phys.* 53: 279-371.

Cortez, E.V.; Pessoa Jr., A.; Felipe, M.G.A.; Roberto, I.C.; Vitolo, M. 2004. Optimized extraction by cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate. *J. Chrom. B* 807:47-54.

Coutinho, B. C.; Miranda, G. B.; Sampaio, G. R.; De Souza, L. B. S.; Santana W. J.; Coutinho, H. D. M. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). *Holos*, p. 76-81, 2004.

Di Marco, S.; Fendrich, G.; Meyhack, R.; Grutter, M.G. 1996. Refolding, isolation and characterization of crystallizable human interferon- γ expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 50: 63-73.

Doran, P.M. 1995. Unit Operations. Pp. 229-231. In: Doran, P.M. (ed). *Bioprocess Engineering Principles*, London: Academic Press.

Dungan, S.R.; Bausch, T.; Hatton, T.A.; Plucinski,

P.; Nitsch, W. 1991. Interfacial transport processes in the reversed micellar extraction of proteins. *J. Coll. Interface Sci.* 145: 33-50.

Ferreira, L.F.P.; Taqueda, M.H.; Vitolo, M.; Converti, A.; Pessoa A. 2005. Purification of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by liquid-liquid cationic reversed micelles extraction. *Biotechnol. Prog.* 21: 868-874.

Furusaki, S.; Kishi, K. 1990. Extraction of amino acids by reversed micelles, *J. Chem. Eng. Jpn.*, p. 91-93.

Geymonat, M.; Spanos, A.; Sedgwick, S.G. 2007. A *Saccharomyces cerevisiae* autoselection system for optimized recombinant protein expression. *Gene* 399: 120-128.

Grootwassink, J.W.D.; Fleming, S.E. 1980. "Non-specific -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties". *Enz Microb Technol.*, v. 2.

Hasmann, F.A.; Cortez, D.V.; Gurrilhaes, D.B.; Santos, V.C.; Roberto, I.C.; Pessoa Jr., A. 2007. Continuous counter-current purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase using liquid-liquid extraction by reversed micelles. *Biochem. Eng. J.* 34: 236-241.

Hasmann, F.A.; Gurrilhaes, D.B.; Roberto, I.C.; Pessoa Jr., A. 2007. Response surface methodology for the evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase enrichment process by soybean lecithin reversed micelles. *J. Chrom. B* 847: 262-266.

Hasmann, F.A.; Pessoa Jr., A.; Roberto, I.C. 2000. -xylosidase recovery by reversed micelles: use of cationic surfactant, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 1101-1111.

Hasmann, F.A.; Pessoa Jr., A.; Roberto, I.C. 2001. Screening of variables in -Xilosidase recovery using cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93: 719-728.

Hedenskog, G.; Mogren, H. 1973. Some methods for processing of single cell protein. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 129-142.

Hensing, M.; Rouwenhorst, R.; Heijnen, S.; van Dijken, H.; Pronk, J. 1995. Physiology and technology aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. Pp. 17-46. In: Hensing, M. (ed) *Production of extracellular proteins by Kluyveromyces yeasts*, Netherlands.

Hilhorst, R.; Segeeva, M.; Heering, D.; Rietveld, P.; Fijneman, P.; Wolbet, R.B.G.; Dekker, M.; Bijterbosh, B.H. 1995. Protein extraction from aqueous phase into a reversed micellar phase: effect of water content and reversed micellar composition. *Biotechnol. Bioeng.* 4: 375-387.

Hou, M.J.; Kim, M.; Shah, D.O. 1988. A light scattering study on the droplet size and interdroplet interaction in microemulsions of AOT-oil-water system *J. Coll. Interf. Sci.* 123: 398-412.

Israelachvili, J.N. 1991. Intermolecular and surface forces. 2.ed. Academic, London and San Diego.

Kilikian, B.V.; Pessoa Jr, A. 2001. Purificação de Produtos Biotecnológicos. Pp. 493-520. In:

- Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica* (Ed), 1ª ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda.
- Krei, G.A.; Hustedt, H. 1992. Extraction of enzymes by reverse micelles. *Chem. Eng. Sci.* 47: 99-111.
- Kula, M.R.; Kroner, K.L.; Hustedt, H. 1982. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Adv. Biochem. Eng. Biot.* 24:73-118.
- Lee, S.Y.; Choi, J.; Han, K.; Song, J.Y. 1999. Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(6):2762-2764.
- Leodidis, E.B.; Hatton, T.A. 1990. Amino acids in AOT reversed micelles. Determination of interfacial partition coefficients using the phase method. *J. Phys. Chem.* 64:6400-6411.
- Liu, C.L.; Nikas, Y.J.; Blankschtein, D. 1996. Partitioning of proteins using two-phase aqueous surfactant systems. *AIChE J* 41:991-995.
- Madigan, M.T. 2000. *Biology of microorganisms*. New Jersey: Prentice Hall. 9ed. 991p.
- Makino, S.; Reynolds, J.A.; Tanford, C. 1973. The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins. *J. Bio. Chem.* 248: 4926-4932.
- Marsaioli Jr., A.; Arévalo, Z.D.F. 2001. **Estudo da termólise de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de usina de álcool usando energia de microondas**. B.CEPPA, 19: 53-64.
- Martich, G.D., Boujoukos, A.J., Suffredini, A.F. Response of man to endotoxin. *Immunobiology*, v.187, p.403-416, 1993.
- Martinek, K.; Klyachko, N.L.; Kabanov, A.V.; Khmel'nitsky, Y.L.; Levashov, A.V. 1989. Micellar enzymology: relation to membranology. **Biochim. Biophys. Acta.** 981: 161-172.
- Mazzola, P.G.; Lam, H.; Kavooosi, M.; Haynes, C.A.; Pessoa Jr., A.; Penna, T.C.V.; Wang, D.I.C.; Blankschtein, D. 2006. Affinity-tagged green fluorescent protein (GFP) extraction from a clarified *E. coli* cell lysate using a two-phase aqueous micellar system. *Biotechnol. Bioeng.* 93:998-1004.
- Minuth, T.; Hommes, J.; Kula, M.R. 1996. A Closed Concept for Purification of the Membrane-Bound Cholesterol Oxidase from *Nocardia rhodochrous* by Surfactant-Based Cloud-Point Extraction, Organic-Solvent Extraction and Anion-Exchange Chromatography. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23:107-13.
- Moura, E.C.U. 1986. Fontes protéicas não convencionais: perspectivas do seu emprego na alimentação. Pp. 43-63. In: Nobrega, F.J. **Desnutrição intrauterina e pós natal** (ed). 2ed., São Paulo: Panamed.
- Ohno, N., Morrisom, D.C. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, v.269, p.4434-4441, 1989.
- Park, J.H., Szponar, B., Larsson, L., Gold, D.R., Milton, D.K. Characterization of lipopolysaccharides present in settled house dust. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.262-267, 2004.
- Penna, T.C.V., Ishii, M., Cholewa, O., Souza, L.C. Thermal Characteristics of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) extracted from *Escherichia coli*. *Let. Appl. Microbiol.* v.38, p.135-139, 2004.
- Pessoa Jr., A. 2005. Rompimento Celular. Pp. 2-24. In: Pessoa-Jr, A.; Kilikian, B.V. (ed) *Purificação de produtos biotecnológicos Barueri/SP: Manole*.
- Pessoa Jr., A.; Vitolo, M. 1998. Recovery of inulinase using BDBAC reversed micelles. *Process Biochem.* 33:291-97.
- Pessoa, A.; Kilikian, B.V. 2005. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. 1ª. ed, 2005. 444p. Barueri/SP: Editora Manole Ltda
- Pessoa, A.; Kilikian, B.V. Introdução: Purificação de Produtos Biotecnológicos. Pp. 1-5. In: Pessoa Jr., A.; Kilikian, B.V. (ed). *Purificação de produtos biotecnológicos, Barueri/SP: Editora Manole Ltda.*
- Piluso, L.G., Martinez, M.Y. Resolving liposomal inhibition of quantitative LAL methods. *J. Pharm. Sci. Technol.*, v.53, n.5, p.260-263, 1999.
- Poxon, S.W., Hughes, J.A. Foam fractionation as a method to separate endotoxin from recombinant biotechnology products. *J. Pharm. Sci. Technol.*, v.53, n.1, p.23-26, 1999.
- Quina, F.H.; Hinze, W.L. 1999. Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach. *Ind. Eng. Chem.* 38:4150-4168.
- Rangel-Yagui, C.O.; Lam, H.; Kamei, D.T.; Wang, D.I.C.; Pessoa Jr., A.; Blankschtein, D. 2003. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. *Biotechnol. Bioeng.* 82:445-456.
- Saitoh, T.; Hinze, W.L. 1995. Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins. *Talanta* 42: 119-127.
- Silva, ME; Franco, T.T. 2000. Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing - a review paper. *Braz. J. Chem. Eng.* 17: 1-17.
- Walker, G.M. 1999. *Yeast Technology*. Pp. 265-311. In: Walker, G.M. (ed). *Yeast Physiol. Biotechnol.* New York, John Wiley & Sons.
- Wheelwright, S.M. 1991. Protein purification: design and scale up of downstream processing. 1ª. Ed. Munich, Hanser Publishers.
- Zhou, W.; Bi, Jingxiu; Zhao, L.; Wang, Y.; Li, Y.; Huang, Y.; Ma, G.; Su, Z. 2007. A highly efficient hydrophobic interaction chromatographic absorbent improved the purification of hepatitis B surface antigen (HBsAg) derived from *Hansenula polymorpha* cell. *Process Biochem.* 42: 751-756.