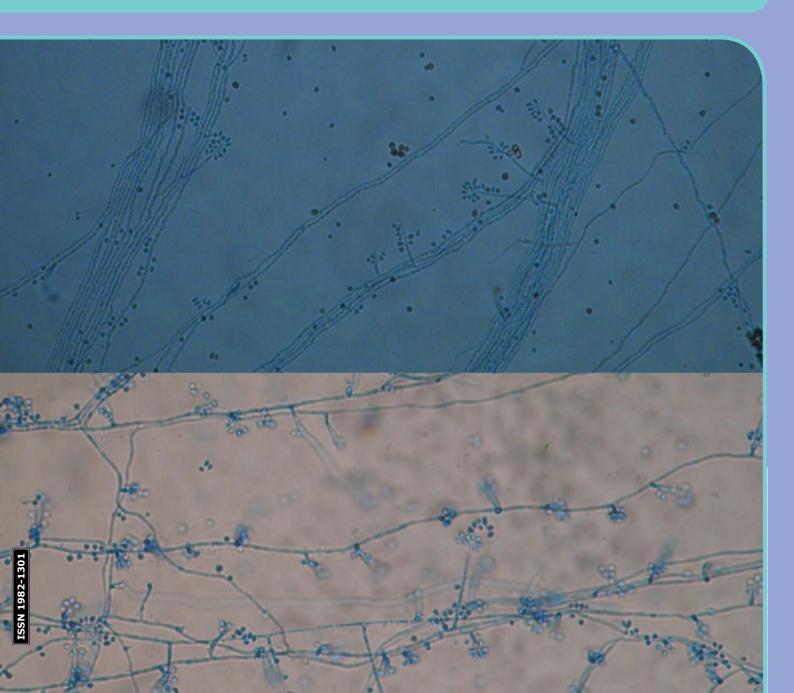
SBM SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA # 19

# VICROBIOLOGIA informativo sbm • ano 5 / 2012

A revista do Microbiologista.

www.sbmicrobiologia.org.br



Editorial Índice

# Prezado Microbiologista,

É com grande satisfação que publicamos a 19ª edição da Revista Microbiologia in Foco. Continuamos com os objetivos iniciais selecionando temas abrangentes e de interesse na divulgação da Microbiologia.

Voltamos a enfatizar que esperamos e contamos com a colaboração ativa dos leitores sugerindo temas e encaminhando artigos para publicação.

Esperamos que comunidade de microbiologistas continue a colaborar ativamente para que essa iniciativa possa alcançar o objetivo de divulgar a microbiologia nos mais diversos setores da comunidade brasileira.

Lembramos que a revista é de informação e divulgação e é composta de várias seções:

Seção 1: Ciência in foco: artigos de informação sobre temas relevantes

Seção 2: Resenhas: comentários sobre livros

Seção 3: Resumos comentados de trabalhos científicos relevantes

Seção 4: Homenagem a profissionais com destaque na fundação da SBM e no desenvolvimento da Microbiologia

Seção 5: Ensino em Microbiologia

Seção 6: Departamento in Foco: Departamentos em destaque: Noticias de interesse da Microbiologia

Seção 7: Leitor in Foco: espaço aberto ao leitor

Seção 8: Empresas in Foco - Informes publicitários: espaço destinado a empresas

Agradecemos a todos que colaboraram com a edição número 19 da revista Microbiologia in Foco e contamos com a colaboração dos colegas para futuros artigos.







Adalberto Pessoa Junior Presidente Marina B. Martinez Editora Carlos P. Taborda Editor

# Expediente

SBM in Foco Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Ano 5, nº 19 São Paulo: SBM, 2012

Periodicidade Trimestral

### **Editores:**

Carlos P. Taborda e Marina B. Martinez

### Tiragem:

2000 exemplares - Circulação Nacional Distribuição gratuita para sócios SBM

### Impressão:

Vox Editora Ltda. (11) 3871-7300

# Ciência in Foco

ESCHERICHIA COLI
ENTEROINVASORA:
CARACTERISTICAS, FATORES
DE VIRULÊNCIA E RELAÇÃO
PARASITA-HOSPEDEIRO 5
VIGILÂNCIA LABORATORIAL DA
ESPOROTRICOSE ANIMAL NA
GRANDE SÃO PAULO 12
PRODUÇÃO DE PROTEASES POR
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS
DO CERRADO BRASILEIRO 17
REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS
BACTERIANAS - UM DESAFIO NA
INDÚSTRIA BIOTECNOLÓGICA 24
SELO DE QUALIDADE SBM 35
SBM IN FOCO 36
AGENDA IN FOCO 37
~ .
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO
E APERFEIÇOAMENTO EM
MICROBIOLOGIA 38
FIQUE SÓCIO 39

### Diagramação:

Hermano Design Editorial hermano@nextis.com

### Responsabilidade autoral:

Todos os artigos assinados são de responsabilidade dos respectivos autores

### Responsabilidade editorial:

Tífani Luri N. Hanashiro

# ESCHERICHIA COLI ENTEROINVASORA: CARACTERISTICAS, FATORES DE VIRULÊNCIA E RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO







Lucas Gonçalves Ferreira<sup>1</sup>, Hadassa Cristhina de Azevedo Soares dos Santos<sup>1</sup>,

### Marina Baquerizo Martinez<sup>2</sup>

1. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo, SP, Brasil. 2. Universidade de São Paulo, Hospital Universitário, Laboratório Clínico, São Paulo, SP, Brasil

A disenteria bacilar é uma doença inflamatória intestinal aguda, que tem como agentes principais *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e as espécies de *Shigella*. Essas bactérias invadem o epitélio do cólon intestinal de humanos, causando uma intensa inflamação, que caracteriza a doença (PARSOT, 2005). As manifestações clínicas comumente relatadas são: febre, mal-estar generalizado, cólicas abdominais e diarreia aquosa, seguida de disenteria, constituída de muco, sangue e poucas fezes (DuPONT *et al.*, 1971).

A primeira descrição de *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) foi realizada por EWING e GRAWATTI (1947). Uma amostra de *E.coli* foi isolada a partir de fezes de soldados americanos com diarreia, durante a segunda guerra mundial. No Brasil, a primeira amostra de EIEC foi isolada das fezes de um paciente com enterite aguda por Trabulsi e colaboradores em 1965 (TRABULSI *et al.*,1965), cujo potencial invasor pode ser avaliado pela capacidade de EIEC causar ceratoconjuntivite em cobaias – ensaio

denominado teste de Serèny (SERÈNY, 1957).

Os primeiros trabalhos enfatizando as características bioquímicas particulares de amostras de EIEC foram apresentados simultaneamente, no Brasil, por TRABULSI e colaboradores (1967) e no Japão por SAKAZAKI e colaboradores (1967). As 28 amostras estudadas no Brasil pertenciam aos sorogrupos O28, O124, O136, O144 e O152. Destas, 92,8% haviam sido isoladas a partir de casos diarréicos tanto de crianças como de adultos (TRABULSI et al., 1967). As 374 amostras de EIEC do Japão foram isoladas de crianças e adultos com diarreia e pertenciam aos sorogrupos O28, O112, O124, O136, O143 e O144 (SAKAZAKI et al., 1967).

Até o momento, foram relatados 15 sorotipos de EIEC: O28ac:H<sup>-</sup>, O29:H<sup>-</sup>, O112ac:H<sup>-</sup>, O121:H<sup>-</sup>, O124:H<sup>-</sup>, O124:H<sup>-</sup>, O135:H<sup>-</sup>, O136:H<sup>-</sup>, O143:H, O144:H<sup>-</sup>, O152:H<sup>-</sup>, O159:H<sup>-</sup>, O164:H<sup>-</sup>, O167:H<sup>-</sup> e O173:H<sup>-</sup> (ORSKOV *et al.*, 1991; MATSUSHITA *et al.*, 1993; NATARO & KAPER, 1998).

EIEC foi responsabilizada por vários surtos epidêmicos, porém, há poucos relatos sobre vias de transmissão e a distribuição dessa bactéria na natureza. Áqua e queijo foram descritos como possíveis fontes (BÓRIAN et al., 1959; TULLOCH et al., 1973; VALENTINI et al., 1992), assim como a transmissão direta através do contato pessoa a pessoa (HARRIS et al., 1985). Na década de 1970 foi relatado um importante surto de diarreia nos Estados Unidos, que acometeu 387 pacientes. O veículo de transmissão foi um queijo importado, contaminado pelo sorogrupo O124 (MARIER et al., 1973). Segundo o órgão de controle de alimentos e drogas dos Estados Unidos (Food and Drug Administration-FDA), os surtos causados por EIEC têm sido associados com leite e seus derivados e carne bovina; no entanto, qualquer alimento ou água contaminados com fezes humanas de um indivíduo doente pode causar a doença em outros indivíduos (FDA,

Pouco se conhece sobre a epidemiologia de EIEC, todavia os relatos mostram que a prevalência não obedece a um padrão de uniformidade, varia de 0.5 a 15%. Os dados relatados nos estudos sobre diarreia mostram que a prevalência de diarreia com envolvimento de EIEC depende da população investigada (ALMEIDA et al., 1998; ECHEVERRIA et al., 1992: OGUNSANYA et al., 1994: PRATS & LLOVET, 1995; TAYLOR et al., 1986; TAMURA et al., 1996; TOLEDO & TRABULSI, 1990; VIEIRA et al., 2007). No estudo de duas populações, esta bactéria foi encontrada em 17(15,8%) das 107 crianças com diarreia que moravam em favelas e em 16 (2,3%) das 701 crianças com diarreia que não moravam em favelas. No primeiro grupo, EIEC foi o enteropatógeno mais frequentemente isolado das crianças com mais de 2 anos de idade, já no segundo grupo, na mesma faixa etária, foi o quarto agente mais isolado (TOLEDO & TRABULSI, 1990). No Brasil, dois estudos realizados fora da cidade de São Paulo mostraram baixa prevalência desta bactéria.

As cepas de EIEC possuem características bioquímicas, genéticas e patogênicas semelhantes às espécies de Shigella. São caracterizadas bioquimicamente e geneticamente com propriedades específicas, que diferem das E. coli não invasoras, EIEC não descarboxila a lisina e tem a presenca do gene ipaH. similares aos observados no gênero Shigella. Utilizando-se antissoros específicos é possível diferenciar a EIEC das amostras do gênero Shigella (VAN DEN BELD & REUBSAET, 2011). Estas características fenotípicas podem, muitas vezes, dificultar a identificação correta deste patotipo, principalmente guando não se utiliza antissoros específicos anti--shigella, uma vez que alguns sorotipos de S. flexneri possuem o mesmo perfil bioquímico de EIEC (imóvel, não descarboxila a lisina, não fermenta a lactose e produz indol).

Devido à grande similaridade entre as duas espécies, pode-se supor que as duas compartilhariam um mesmo ancestral e que num dado momento da evolução houve uma divisão. O clone formado pelas EIEC seria o elo da cadeia. No entanto, dados obtidos por diferentes grupos nos levam a sugerir que as amostras de EIEC formam clones distintos dos de *Shigella* e dos outros grupos de *E. coli* (BANDO et al., 1998; LAN et al., 2004; PUPO et al., 1997; ROLLAND et al., 1998)

Devido à maior incidência, os estudos que abordam a patogenicidade e a resposta do hospedeiro ficaram praticamente restritos às amostras de *S. flexneri*. Essa escassez de dados de EIEC na literatura deixou sem resposta importantes questões sobre a fisiologia e virulência de EIEC, bem como a resposta imune do hospedeiro na infecção por este micro-organismo, o que nosso grupo de pesquisa tem como objetivo esclarecer.

Os micro-organismos patogênicos têm desenvolvido uma série de estratégias para invadir o hospedeiro, evitar ou resistir a resposta imune e colonizar sítios específicos do organismo humano no intuito de estabelecer e manter a infecção (SANSONETTI & DI SANTO, 2007). Sabe-se que na mucosa intestinal é que ocorre o início da colonização bacteriana de EIEC no hospedeiro e, como consegüência, os sintomas da doença. A barreira gastrointestinal é formada por uma monocamada de células epiteliais. um complexo número de agentes na superfície luminar e por tecidos linfóides organizados, constituídos por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, T e NK residentes, designados a uma função protetora contra antígenos estranhos (NEWBERRY & LORENZ, 2005). Para manter a função intestinal ótima, a resposta imune inflamatória, vital no combate aos enteropatógenos, deve ser intimamente controlada.

Há um processo complexo na colonização e sobrevivência de EIEC na barreira gastrointestinal. Nesse processo, múltiplos genes bacterianos estão envolvidos, tanto cromossomais, como plasmidiais. Os mecanismos essenciais de patogenicidade bacteriana de EIEC e *Shigella* nas células do hospedeiro (invasão, sobrevivência, escape e disseminação) dependem da presença de um plasmídio de virulência de 213 Kb (pINV) (HARRIS et al., 1982; SANSONETTI et

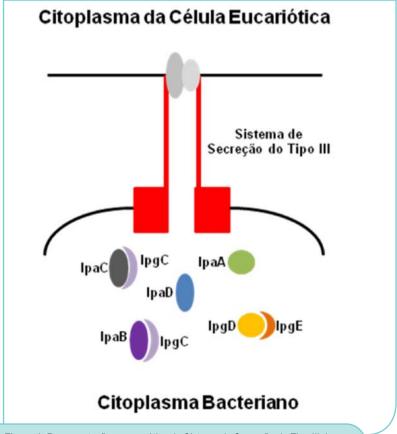


Figura 1. Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo III de EIEC. Ipa - proteina de invasão, Ipg – chaperonina.

al., 1982a). Foi demonstrado que não há diferenças significativas entre os plasmídios de virulência das duas espécies (FORMAL et al., 1983). Observa-se também que bactérias sem o plasmídio de virulência não causam ceratoconjuntivite em cobaias, sendo consideradas avirulentas (SANSONETTI et al., 1982b).

A maioria dessas funções está relacionada a proteínas codificadas por um fragmento de 31Kb do plasmídio de virulência formado por 38 genes. Neste fragmento, encontram-se os genes responsáveis pela invasão e escape bacteriano, pela disseminação celular e inibição da autofagia, pela regulação da resposta imune do hospedeiro e pelo aparato do sistema de secreção do tipo III (SSTT). Este sistema de secreção é considerado um complexo sistema de transferência de proteínas, capaz de injetar diversos substratos protéicos diretamente do citoplasma bacteriano para o interior da celula do hospedeiro (Figura 1). Uma vez injetados no interior da célula hospedeira, os fatores de virulência ou efetores irão induzir ou inibir as vias de sinalização da célula. As modificações induzidas pemitem a sobrevivência intracelular desses micro-organismos (COSSART & SANSONETTI, 2004; PARSOT, 2005; OGAWA et al., 2008).

EIEC, assim como Shigella e outros enteropatógenos, utiliza as células M (microfold cells) presentes na mucosa intestinal como porta de entrada para a mucosa intestinal (PARSOT & SANSO-NETTI, 1996; SANSONETTI & PHALI-PON, 1999). As células M apresentam a capacidade de capturar antígenos solúveis, células apoptóticas do epitélio intestinal ou bactérias do compartimento luminal e transportá-los para o sub--epitélio (Placas de Peyer), onde esses antígenos são reconhecidos por macrófagos e células dendríticas residentes (NEWBERRY & LORENZ, 2005). A fagocitose por essas células é o primeiro passo para a produção da resposta inflamatória contra as cepas bacterianas. Após o escape dos macrófagos e células dendríticas, a bactéria penetra na célula intestinal, pelo lado basolateral e se dissemina para as células adjacentes, causando uma intensa resposta inflamatória no local, caracterizada pela secreção de mediadores inflamatórios que atuam

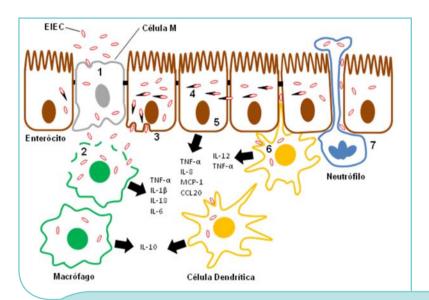


Figura 2: Representação esquemática da patogênese da infecção por EIEC. Através das células M, presentes na mucosa intestinal (1), a bactéria encontra macrófagos residentes na lâmina própria e a fagocitose por esses macrófagos é o primeiro passo para a produção da resposta inflamatória (2). Após o escape dos macrófagos, a bactéria penetra na célula intestinal, pelo lado basolateral (3) e se dissemina para as células adjacentes (4), causando uma intensa resposta inflamatória no local, caracterizada pela secreção de mediadores inflamatórios por enterócitos (5) e células dendríticas (6) que atuam no recrutamento de células do sistema imune inato, como os neutrófilos e monócitos (7).

no recrutamento de células do sistema imune inato, como neutrófilos e monócitos (Figura 2). A migração dessas células para o local da infecção causa desestabilização do epitélio intestinal, permitindo, assim, a passagem de um maior número de micro-organismos que irão invadir os enterócitos pela superfície basolateral, levando a destruição tecidual (TRAN VAN NHIEU & SANSONETTI, 1999; SCHROEDER & HILBI, 2008; ASHIDA et al., 2011)

Apesar das semelhanças no mecanismo de invasão e nos sintomas da doença (disenteria bacilar), a dose infectante de EIEC é muito maior do que a de *Shigella* (DuPONT *et al.*, 1971). Além disso, a doença causada por EIEC apresenta-se em uma forma mais branda e autolimitante.

Nos ensaios de Serèny realizados em nosso laboratório, foi possível observar que EIEC induz uma forma mais branda da doença (inflamação leve/moderada), enquanto que a *Shigella* induz uma resposta pró-inflamatória exacerbada (inflamação severa). Além disso,

a ceratoconjuntivite desenvolve-se mais rapidamente em cobaias inoculadas com *Shigella* (dois dias) do que em cobaias inoculadas com EIEC (4 a 5 dias) (MO-RENO et al., 2009).

Um aspecto importante na sobrevivência de enteropatógenos no hospedeiro é a sobrevivência ao stress ambiental. Enquanto transitam pelo trato gastrointestinal, devem suportar pH baixo do estômago (~2,5) – devido à presença do ácido clorídrico – e alto (~8,0) no duodeno, bem como os ácidos graxos presentes no intestino e nas fezes. Estudos realizados por nosso grupo evidenciaram que o pH baixo leva a modificações na expressão do lipopolissacarídeos (LPS) e nas proteínas de membrana externa (OMPs) de EIEC, assim como na habilidade de causar ceratoconjuntivite em cobaia (Teste de Serèny negativo). O pH estomacal causa, portanto, alterações importantes na célula bacteriana, que poderão provocar alteracões na patogenicidade de EIEC. Foi observado, porém, que após a bactéria retornar ao pH neutro, essas alterações são reversíveis dentro de 3 a 6 horas, dependendo do sorotipo (AZEVEDO, 1998). Essas alterações são similares aos resultados observados anteriormente nas espécies de *Shigella* (BEARSON *et al.*, 1997). Contudo, foi observado que dependendo do sorotipo de EIEC o restabelecimento da patogenicidade é mais lento que em *S flexneri*. Esses dados mostram a capacidade de EIEC sobreviver em condições ácidas encontradas no estômago e iniciar sua colonização no intestino humano.

Outro aspecto bastante importante na colonização bacteriana é a captação de ferro (Fe) sob condições limitadas no hospedeiro. O ferro é um elemento essencial para todos os organismos vivos, funcionando, na forma iônica como um biocatalisador bastante versátil. Apesar de sua importância, o ferro não está prontamente disponível nos hospedeiros, nem mesmo em ambientes aquáticos ou terrestres. Estima-se que os micro-organismos requerem ferro em concentrações entre 10-8 a 10-6 M para suprir suas necessidades metabólicas. Contudo, apesar do conteúdo de ferro do plasma humano ser alto (20µM), a quantidade de ferro livre está na ordem de 10<sup>-18</sup> M. Esta concentração extremamente baixa é insuficiente para o crescimento bacteriano. A maior parte do ferro disponível é encontrada intracelularmente associada às proteínas, tais como mioglobina, ferritina, hemossiderina e em proteínas heme, como a hemoglobina. A pequena quantidade de ferro extracelular está ligada às glicoproteínas transferrina e lactoferrina. Essas proteínas estão envolvidas no transporte ou na estocagem do ferro e constituem sistemas complexos de regulação e controle da concentração do íon no hospedeiro. A presença de proteínas insaturadas ligadas ao ferro inibe o crescimento de uma variedade de espécies bacterianas defectivas em seus sistemas de captação de ferro (GUERRINOT, 1994; LITWIN et al., 1993; PAYNE, 1993).

Como a concentração de ferro é limitada, diversas estratégias têm sido usadas pelas bactérias para obter tanto o ferro livre quanto o complexado. A capacidade de aquisição de ferro, quando a concentração é escassa, é um dos fatores mais importantes para a patogênese bacteriana (PAYNE, 1993).

Na membrana externa das bactérias,

estão localizadas várias proteínas que exercem diversas funções. A expressão de muitas moléculas destas proteínas está sujeita às variações ambientais, nesta categoria, incluem-se as proteínas relacionadas com o metabolismo do ferro (IROMP) (NEILANDS, 1982). As IROMPs são muitas vezes sintetizadas em grande quantidade, quando as células estão sob condições limitadas de ferro. Nosso grupo evidenciou que sistemas de alta afinidade para transporte de ferro foram expressos por amostras de EIEC durante o crescimento em meio de cultura com baixa concentração de Fe (DALL'AGNOL & MARTINEZ, 1999; AN-DRADE et al., 2000). Esses dados sugerem que EIEC tem uma alta capacidade de adaptação, usando, se necessário, o sistema de captação de Fe que consome menos energia. A capacidade de captar Fe de diferentes fontes pode facilitar o desenvolvimento de processos infecciosos por esta bactéria.

EIEC é considerada uma bactéria imóvel quando se utiliza a prova clássica de motilidade para enterobactérias, porém ANDRADE e colaboradores (2002) demonstraram que este patotipo de E. coli também é capaz de expressar flagelina e fazer a montagem completa do flagelo. Estudos mostraram a presença dos genes da flagelina em S. flexneri e S. sonnei, porém considerados como genes crípticos, e não são expressos durante o ciclo de vida bacteriano. Algumas mutações apareceram no gene, sugerindo um evento recente na evolução e este fato, por sua vez, indicou a razão da falta de motilidade do gênero Shigella (TOMINAGA et al., 1994). Esta ausência de motilidade no gênero Shigella foi sugerida como um mecanismo para escapar da resposta imune, favorecendo assim a sua colonização no hospedeiro (COIMBRA et al., 2001). O encontro de flagelo em EIEC consideradas imóveis indica a necessidade de se esclarecer se a flagelina é um fator de virulência na patogenicidade de EIEC, uma vez que foi demostrado que flagelina está envolvida no processo inflamatório (MIAO et al., 2007). Nossos resultados mostraram a presença do gene fliC no DNA genômico de EIEC, a sua transcrição em RNAm, assim como a sua motilidade, no entanto, a Shigella não apresentou nenhuma

motilidade, sugerindo uma possível diferença de patogenicidade entre EIEC e Shigella.

GIBOTTI e colaboradores em 2004 observaram que amostras de diferentes sorotipos de EIEC apresentaram polimorfismo em algumas regiões de genes envolvidos na invasão. O polimorfismo presentes em cepas de EIEC é sorotipo--dependente, uma vez que os padrões de restrição foram conservados entre as cepas pertencentes ao mesmo sorotipo. Contudo, as alterações observadas nestes genes plasmidiais não explicam a diferença na patogenicidade entre EIEC e Shigella (GIBOTTI et al., 2004). Além disso, estudos mais recentes mostraram que os genes responsáveis pela disseminação celular e inibição da autofagia e pela regulação da resposta imune do hospedeiro também não possuem alterações que possam explicar a diferença na patogenicidade entre EIEC e Shigella.

Nosso grupo descreveu pela primeira vez, características fenotípicas e genotipicas que justificam a menor capacidade de EIEC causar a doença quando comparada com as espécies de Shigella. Para isso, foram utilizados modelos experimentais que mimetizam o microambiente intestinal do hospedeiro, como culturas de células epiteliais intestinais, macrófagos e células dendriticas. Nossos resultados evidenciaram que a capacidade inicial de invadir a célula intestinal é semelhante entre EIEC e Shigella, porém, a expressão de genes de virulência, a capacidade de escape do fagossoma, proliferação intracelular e disseminação de EIEC, bem como a capacidade de causar danos celulares durante a infecção é bastante inferior aos obtidos com a Shigella (MORENO et al., 2009). Foi observado ainda um número significativamente maior de EIEC no interior dos macrófagos em relação à Shigella após a fagocitose. Além disso, a Shigella apresentou maior capacidade de escape dos macrófagos, uma vez que esta bactéria foi recuperada em maior concentração no sobrenadante da cultura dos macrófagos infectados, quando comparada a EIEC. Também foram evidenciadas a expressão de genes de virulência, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a morte dos macrófagos infectados por EIEC, ainda que

em menores níveis quando comparados aos de Shigella (BANDO et al., 2010). Os macrófagos podem morrer por diversas vias, como a piroptose, a apoptose, a autofagia, a necrose e a pironecrose (FERNANDEZ-PRADA et al., 1997; NO-NAKA et al., 2003; SUSUKI et al., 2007, WILLINGHAM et al., 2007; SUSUKI et al., 2008). Nossos dados recentes mostraram que a morte dos macrófagos infectados por EIEC, diferentemente da morte induzida por Shigella, é um processo independente da piroptose e da apoptose. Especulamos como possíveis processos de morte celular dos macrófagos infectados por EIEC a necrose e/ou a autofagia.

Nosso grupo também avaliou a interação bacteriana com as células dendriticas, consideradas essenciais na condução da resposta imune inata e adaptativa na mucosa intestinal. Nossos resultados mostraram que EIEC induziu a produção de IL-10, IL-12 e TNF-α pelas células dendriticas infectadas, enquanto que a Shigella induziu apenas a produção de TNF-α. Ao contrário de Shigella, a infecção por EIEC aumentou a expressão do receptor TLR-4 e TLR-5 em células dendriticas e diminuiu a expressão de moléculas co-estimulatórias. que podem cooperar para induzir a proliferação de linfócitos T. Além disso, foi possível observar que ocorre uma maior proliferação de linfócitos imunizados com Shigella do que aqueles imunizados com EIEC (MORENO et al., 2012). Interessantemente, a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por macrófagos foi maior na infecção por EIEC do que a Shigella (BANDO et al., 2010). Corroborando com esses resultados, em ensaios in vivo foi observada uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias na infecção por Shigella, enquanto EIEC estimulou uma maior produção de IL-10.

Tais dados, em conjunto com os dados obtidos recentemente pelo nosso grupo de pesquisa, nos levam a especular que (i) o hospedeiro é mais responsivo à infecção por EIEC quando comparado às espécies de *Shigella*, e que (ii) a EIEC apresenta uma menor virulência no processo infeccioso quando comparado com a *Shigella*, e isso justificaria a forma mais branda da doença desencadeada por EIEC.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHIDA, H. OGAWA H., MIMURO H, KO-BAYASHI T, SANADA T, SASAKAWA C. *Shi-gella* are versatile mucosal pathogens that circumvent the host innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 23:448–455, 2011

ALMEIDA, M.T.G.; SILVA, R.M.; DONAIRE, L.M.; MOREIRA, L.E.; MARTINEZ, M.B. Enteropatógenos associados com diarréia aguda em crianças. *J. Pediatria*, 74:291-298, 1998.

ANDRADE, A.; DALL'AGNOL, M.; NEWTON, S.; MARTINEZ, M. B. . The iron uptake mechanisms of enteroinvasive Escherichia coli.. Brazilian Journal of Microbiol., 31, p. 200-205, 2000

ANDRADE, A.; GIRÓN, J. A.; AMHAZ, J. M. K.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Expression and characterization of flagella in nonmotile enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from diarrhea cases. *Infect. Immun.*, v.70, p.5882-5886, 2002.

AZEVEDO, M.E.F. A influência do pH ácido na expressão do lipopolissacarídeo e das proteínas de membrana externa de *Escherichia coli* enteroinvasora. São Paulo. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 1998.

BANDO, S.Y.; VALLE G.R.F.; MARTINEZ, M.B.; TRABULSI, L.R.; MOUREIRA-FILHO, C.A.; MARTINEZ, M.B. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains by RAPD analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 165:159-165, 1998.

BANDO, S.Y.;MORENO, A.C.R.; ALBUQUER-QUE, J.A.T.; AMHAZ, J.M.K.; MOUREIRA-FILHO, C.A.; MARTINEZ, M.B. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(6):001-006, 2010.

BEARSON S, BEARSON B, FOSTER JW. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.*, Feb 15;147(2):173-80, 1997.

BORIAN, A.; CSIZMAZIA, F.; KARVALY, E.; MIHALFFY, F.; REDEY, B. Enterocolitis epidemic caused by water contamined with Coli O124 in Veszpren. *Orv. Hetil*, 100:1072-1074, 1959

COIMBRA, R.S., GRIMONT, F., GRIMONT,

P.A.D. Colonal relationships among *Shigella* serotypes suggested br cryptic flagellin gen polymorphism. *Journal of clinical microbiology*, 2001.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigm of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304:242-248, 2004.

DALL'AGNOL, M. & MARTINEZ, M.B. (1999). Iron uptake from host compounds by enteroinvasive *Escherichia coli* . *Rev. Microbiol.*, 30, p. 149-152, 1999.

DUPONT, H. L.; FORMAL, S. B.; HORNICK, R. B.; SNYDER, M. J.; LIBONATI, J. P.; SHE-HAN, D. G.; LABREC, E. H.; KALAS, J. P. Phatogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.*, 285:1-9, 1971.

ECHEVERRIA, P.; SETHABUTR, O.; SERICHANTALERGS, O.; LEXOMBOON, U.; TAMURA, K. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections in households of children with dysentery in Bangkok. J. Infect. Dis., 165:144-147, 1992.

EWING, W.H.; GRAWATTI, J.L. Shigella types encountered in the Mediterranean area. *J. Bacteriol.*, 53:191-195, 1947.

FDA - Food and Drug Administration. Enteroinvasive escherichia coli (EIEC). http://www. fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornelllness/ FoodbornelllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071298.htm. 2009.

FERNANDEZ-PRADA, C. M., HOOVER, D. L., TALL, B. D. & VENKATESAN, M. Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexneri in vitro* undergo a rapid cytolytic event similar to oncosis but not apoptosis. *Infect. Immun.*, 65:1486–1496, 1997

FORMAL, S.B.; HALE, T.L.; SANSONETTI, P.J. Invasive enteric pathogens. *Rev. Infect. Dis.*, 5:702-707, 1983.

GUERINOT, L.M. Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.48, p.743-772, 1994.

GIBOTTI, A., TANAKA, T.L., OLIVEIRA, V.R., TADDEI, C.R., MARTINEZ, M.B. Molecular characterization of enteroinvasive Escherichia coli ipa genes by PCR-RFLP analysis. *Braz. J. Microbiol.*, v. 35, p. 74-80, 2004.

HARRIS, J.R.; MARIANO, J.; WELLS, J.G.; PAYNE, B.J.; DONNELL, H.D.; COHEN, M.L. Person-to-person transmission in an outbreak

of enteroinvasive Escherichia coli. Am. J. Epidemiol., 122:245-252, 1985.

HARRIS, J.R.; WACHSMUTH, I.K.; DAVIS, B.R.; COHEN, M.L. High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. *Infect. Immun.*, 37:1295-1298, 1982.

LAN R, ALLES MC, DONOHOE K, MARTI-NEZ MB, REEVES PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Esche*richia coli and *Shigella* spp. *Infect Immun.*, 72(9):5080-8, 2004.

LITWIN, C.M; CALDERWOOD, S. B. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev.*, v.2, p.137-49,1993.

MARIER, R.; WELLS, J.C.; SWANSON, R.C.; CALLAHAN, W.; MEHLMAN, I.J. An outbreak of enteropathogenic *E. coli* foofborne disease traced to imported cheese. *Lancet*, 1:1376-1378, 1973.

MATSUSHITA, S.; YAMADA, S.; KAI, A.; KU-DOH, Y. Invasive strains of *Escherichia coli* belonging to serotype O121:NM. *J. Clin. Microbiol.*, 31:3034-5, 1993.

MIAO. E.A.; ANDERSEN-NISSEN, E.; WAR-REN, S.E.; ADEREM, A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol.* 29(3):275-88, 2007.

MORENO, A.C., FERREIRA, L.G., MARTI-NEZ, M.B. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression affect virulence. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 301, p. 156-163, 2009.

MORENO AC, FERREIRA KS, FERREIRA LG, ALMEIDA SR, MARTINEZ MB. Recognition of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* by dendritic cells: distinct dendritic cell activation states. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Feb;107(1):138-41, 2012.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev.*, 11:142-201, 1998.

NEWBERRY, R.D., LORENZ, R.G. Organizing a mucosal defense. *Immunol. Rev.*, 206:6-21, 2005.

NEILANDS, J.B. - Microbiol envelope proteins related to iron. *Annu. Rev. Microbiol.*, 36, p.285-309, 1982.

NONAKA, T., KUWABARA, T., MIMURO, H., KUWAE, A., IMAJOH-OHMI, S. Shigella-

induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. *Microbiology*, 149:2513-2527, 2003.

OGAWA M, HANDA Y, ASHIDA H, SUZUKI M, SASAKAWA C. The versatility of Shigella effectors. *Nat Rev Microbiol*, 6:11-16, 2008.

OGUNSANYA, T.I.; ROTIMI, V.O.; ADENUGA, A. A study of etiological agents of childhood diarrhoea in Lagos, Nigeria. *J. Med. Microbiol.*, 40:10-14, 1994.

ORSKOV, I.; WACHSMUTH, K.; TAYLOR, D.N. Two new *Escherichia coli* O groups: O172 from 'shiga-like' toxin II-producing strains (EHEC) and O173 from enteroinvasive *E. coli* (EIEC). *APMIS*, 99:30-32, 1991.

PAYNE, S.M. Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol.*, v.1, p.66-69, 1993.

PARSOT, C. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. FEMS Microbiol. Lett., 252:11-18, 2005.

PARSOT, C., SANSONETTI, P.J. Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 209:25-42,1996.

PRATS, G.; LLOVET, T. Enteroinvasive *Escherichia coli*: Pathogenic mechanisms and epidemiology. *Microbiologia*, 11:91-96, 1995.

PUPO, G.M.; KARAOLIS, D.K.R.; LAN, R.; REEVES, P.R. Evolutionary relationships among pathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect. Immun.*, 65:2685-2692, 1997.

ROLLAND K, LAMBERT-ZECHOVSKY N, PICARD B, DENAMUR E. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains of *E. coli*. *Microbiology*. 144 ( Pt 9):2667-72, 1998.

SANSONETTI, P. J.; HAUTEVILLE, H.; FOR-MAL, S.B.; TOUCAS, M. Plasmid mediated invasiveness of 'Shigella-like' Escherichia coli. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, 132A:351-355, 1982a.

SANSONETTI, P. J.; KOPECKO, D.; FOR-MAL, B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, 35:852-860, 1982b.

SANSONETTI, P.J., DI SANTO, J.P. Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity*, 26(2):149-61, 2007.

SANSONETTI, P.J.; PHALIPON, A. M. cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin. Immunol.* 11, 193–203, 1999.

SCHROEDER, G.N., HILBI, H. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by Type III Secretion. *Clinical Microbiol. Reviews.*, v. 21, p. 134-156, 2008.

SERÉNY, B. Experimental keratoconjuctivitis shigellosa. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 4:367-376. 1957.

SUZUKI, T. FRANCHI, L.; TOMA, C. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via lpaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog.* 3:111, 2007.

SUZUKI, T; NUNEZ, G. A role for Nod-like receptors in autophagy induced by *Shigella* infection. *Autophagy* 4: 73–75, 2008.

TAMURA, K.; SAKAZAKI, R.; MURASE, M.; KOSAKO, Y. Serotyping and categorization of Escherichia coli strains isolated between 1958 and 1992 from diarrhoeal diseases in Asia. *J. Med. Microbiol*, 45:353-358, 1996.

TAYLOR, D.N.; ESCHEVERRIA, P.;. PAL, T.; SETHABUTR, O.; ROWE, B.; CROSS, J. The role of *Shigella sp*, enteroinvasive *Escherichia coli* and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. *J. infect. Dis.*, 153:1132-1138, 1986.

TOMINAGA, A, MUKAHARA, T., MAH-MOUND, M. A., ENOMOTO, M. Molecular characterization of intact, but cryptic, flagellin genes in the genus *Shigella*. *Molecular Microbiology*, 12, 227-285, 1994.

TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L.R. Frequency of enteroinvasive *Escherichia coli* in children with diarrhea and healthy controls, in São Paulo, SP, Brazil. *Rev. Microbiol.*, 21:1-4, 1990.

TRABULSI, L.R.; FERNANDES, M.R.F.; ZU-LIANI, M.E. Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 9:31-39, 1967.

TRABULSI, L.R.; ZULIANI, M.E.; SERRANO, J.A. On two new enterobacteria pathogenic to the guinea-pig eye (cultures 185T-64 and 193T-64). *Rev. Inst. Med. Trop.*, 7:241-6, 1965.

TRAN VAN NHIEU, G. AND SANSONETTI, P.J. Mechanism of *Shigella* entry into epi-



thelial cells. Curr. Opin. Microbiol. 2, 51–55, 1999

TULLOCH, J.E.F.; RYAN, K.J.; FORMAL, S.B.; FRANKLIN, F.A. Invasive enterophatic *Escherichia coli* dysentery. *Ann. Intern. Med.*, 79:13-17, 1973.

VALENTINI, S.R.; GOMES, T.A.T.; FALCAO, D.P. Lack of virulence factors in *Escherichia coli* strains of enteropathogenic serougroups

isolated from water. *Appl. Envir. Microbiol.*, 58:412-414, 1992.

VAN DEN BELD, M.J.C.; REUBSAET, F.A.G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:1395-7, 2011.

VIEIRA, N., BATES, S.J., SOLBERG, O.D., PONCE, K., HOWSMON, R., CEVALLOS,

W., TRUEBA, G., RILEY, L., EISENBERG, J.N. High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(3):528-33, 2007.

WILLINGHAM, S. B. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/ NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe*, 2:147–159, 2007.

# VIGILÂNCIA LABORATORIAL DA ESPOROTRICOSE ANIMAL NA GRANDE SÃO PAULO





Hildebrando Montenegro, Maria Adelaide Galvão Dias

Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores - Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo

Elisabete Aparecida da Silva, Fernanda Bernardi

Núcleo de Vigilância Epidemiológica – Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo

A esporotricose é uma doença infecciosa que tem sido tradicionalmente atribuída ao fungo dimórfico *Sporothrix schenkii*. Tem ocorrência mundial, mas uma prevalência maior em climas tropicais e subtropicais. A esporotricose é a micose subcutânea de maior incidência na América Latina<sup>(1)</sup>. Já foi descrita no homem e animais domésticos como cães, gatos, bovinos, porcos, camelo e aves, além de ratos e animais silvestres<sup>(2)</sup>.

A infecção é adquirida por inoculação traumática de materiais colonizados ou, raramente, inalação de conídios. No local de inoculação do fungo surge a lesão primária, que pode ficar restrita ou apresentar linfangite nodular, ou ainda se disseminar pelo sistema linfático para outros locais do tecido cutâneo e mucosas (oral e nasal), além de outros orgãos. A evolução é sub-aguda ou crônica na maior parte dos casos humanos<sup>(3)</sup>.

As formas de inoculação descritas são o manejo de matéria vegetal e inoculação por farpas de madeira, espinhos, arranhaduras ou mordeduras por animais. Pode ser considerada uma dermatose profissional, com casos descritos em agricultores, jardineiros, mineiros, veterinários e cacadores de tatu<sup>(2)</sup>.

# TAXONOMIA – BREVE HISTÓRICO

O primeiro relato de caso foi feito por Benjamin R. Schenck no E.U.A. em 1898, relatando um ferimento no dedo da mão com abcesso drenando secreção sero-purulenta. O fungo causador foi classificado por E. F. Smith, micologista do Departamento de Agricultura dos E.U.A. como *Sporotrichum* sp. (4). Em 1900, Hektoen e Perkins classificam o fungo causador como *Sporothrix schenckii* (5).

Em 1907, Lutz e Splendore relatam o primeiro caso de infecção humana no Brasil, bem como a infecção natural em ratos de esgoto (*Rattus norvegicus*)<sup>(6)</sup>.

Em 2007, Marimon et. al. caracterizaram *S. schenckii* como um complexo de espécies, com base em características moleculares, morfológicas e fisiológicas. Três novas espécies de importância médica foram propostas, além de *S. schenckii*: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix qlobosa* e *Sporothrix mexicana*<sup>(7)</sup>.

### **EPIDEMIOLOGIA**

S. schenckii é um fungo geofílico, sendo o seu reservatório o solo, plan-

tas e material de origem vegetal. Pode ser considerado um fungo endêmico na America do Sul e América Central, com casos relatados no Brasil, Colômbia, Uruguai, Peru, México e, mais raramente, no Chile e Argentina e incidência em lavradores, agricultores e caçadores. Há casos relatados em países de clima temperado como no E.U.A., Canadá, França e Espanha, com incidência em jardineiros de orquídeas e rosas<sup>(2)</sup>.

Surtos de esporotricose têm sido eventualmente relatados na literatura. Em 1942, na África do Sul, ocorreu um surto em pelo menos três mil mineradores de ouro, sendo identificada a presença do fungo na madeira da estrutura de sustentação das minas<sup>(8)</sup>.

No E.U.A., em 1988, ocorreu um surto de esporotricose envolvendo pelo menos 84 pessoas em 15 estados diferentes. Identificou-se a presença do fungo em musgo do Gênero *Sphagnum*, usado para empacotar e despachar plantas<sup>(9)</sup>.

Em 1998 teve início no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, uma epidemia de esporotricose envolvendo gatos, cães e humanos, numa proporção sem precedentes na literatura e que se estende até o presente. Dados preliminares (1998 a 2009) indicam a ocorrência da doença

em pelo menos 120 cães, 3.244 felinos e 2.200 seres humanos, atendidos no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro<sup>(10)</sup>.

Até o momento, a caracterização dos isolamentos obtidos de casos de esporotricose em humanos no Rio de Janeiro indicam que *S. brasiliensis* é a espécie responsável pela grande maioria (83,4%) dos casos observados<sup>(11)</sup>.

Os primeiros casos foram provenientes dos municípios de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Queimados e São João do Meriti, todos na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. Posteriormente ocorreu um aumento exponencial dos casos animais e humanos, envolvendo pelo menos mais 18 municípios; no entanto, a maior parte dos casos foi proveniente dos municípios do Rio de Janeiro, Duque de Caxias e São João do Meriti(10).

A epidemia apresenta um perfil bem delineado: distribuição geográfica dos casos na região metropolitana, em áreas de baixo nivel sócio-econômico (domicílios com média de quatro pessoas e renda de três salários mínimos), acometimento maior em mulheres na faixa de 40 a 59 anos que realizam atividades domésticas, seguido de estudantes. Este perfil sugere que as mulheres que trabalham em casa são o grupo mais exposto, pois são as que estão mais envolvidas com o cuidado dos felinos<sup>(10)</sup>.

No Rio de Janeiro, as formas clínicas mais comuns em humanos têm sido a forma linfocutânea, seguido da cutânea localizada, principalmente nos membro superiores, mais expostos durante o cuidado de felinos doentes. O tratamento de escolha nos casos de esporotricose humana e animal tem sido o itraconazol devido à eficácia e poucos efeitos adversos. Nos felinos ocorrem também as formas cutâneas e linfocutâneas, no entanto é comum o acometimento sistêmico, levando a formas graves que evoluem à óbito se não tratadas<sup>(10)</sup>.

Segundo Barros e colaboradores, a eliminação de animais infectados não parece ser uma medida adequada para a contenção da epidemia, sendo o incentivo à castração gratuita fundamental para manter os animais no ambiente doméstico. A prioridade deveria ser o trata-



Proprietária de felino com esporotricose, mordida no dedão. Lesão inicial e forma ascendente no antebraço. (Foto: Elisabete A. da Silva)



Felino com lesões na face. (Foto: Elisabete A. da Silva)

mento e castração dos felinos, eutanásia dos casos sem possibilidade terapêutica e educação para posse responsável de animais domésticos<sup>(10)</sup>.

### ESPOROTRICOSE NA GRANDE SÃO PAULO

A vigilância laboratorial da esporotricose no município de São Paulo foi iniciada em 2008 pelo Setor de Micologia do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores (LabZoo) do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo (CCZ-SP), em gatos ferais terminais que deram entrada ao CCZ-SP para eutanásia.

Para a vigilância laboratorial e o diagnóstico de animais com suspeita clínica, são coletadas amostras de exudato de lesões com swab estéril; no caso de lesões crostosas é realizado o raspado.



Felino com lesão crostrosa. (Foto: Elisabete A. da Silva)



Felino com lesões disseminadas pelo corpo. (Foto: Elisabete A. da Silva)

Podem ser realizadas também a coleta de mucosa oral com swab estéril e a impressão das unhas diretamente no meio de cultura. O meio de cultura utilizado é o ágar Mycosel; as culturas são feitas em duplicatas e incubadas à 25 °C. Colônias suspeitas são isoladas em ágar Saboraud, sendo realizado o microcultivo para identificação final.

No período de 2008 a 2010, nenhum caso de esporotricose em felinos

foi diagnosticado laboratorialmente, até que, em dezembro de 2010, foi comunicado ao CCZ-SP um rumor de casos de esporotricose em felinos no bairro de Itaquera, zona leste da cidade de São Paulo. A partir desse rumor, iniciou-se uma investigação onde foi confirmada laboratorialmente a presença de felinos infectados.

Já início de 2011, o Setor de Micologia do LabZoo recebeu material para

diagnóstico de um felino com suspeita de criptococose, proveniente do município de Diadema O material mostrou-se positivo para *Sporothrix* sp. A partir deste diagnóstico, mais felinos com esporotricose foram identificados em Diadema, numa região próxima à divisa com o bairro de Pedreira, zona sul da cidade de São Paulo.

Após a confirmação dos casos de esporotricose em felinos e em um cão na zona leste da cidade de São Paulo. foram realizadas palestras informativas para as unidades regionais de Vigilância em Saúde da cidade de São Paulo, clínicos veterinários da região de Itaquera e associação de clínicos veterinários de São Paulo, o que possibilitou o recebimento de amostras de outras áreas da cidade. Com o intuito de incentivar o envio de amostras clínicas dos casos suspeitos, o LabZoo passou a disponibilizar o diagnóstico gratuito de esporotricose animal também para as clínicas veterinárias particulares.

Após essas medidas, casos de esporotricose em gatos puderam ser identificados em outras áreas da cidade, bem como em outros municípios vizinhos, como Guarulhos, além de Diadema.

Nos gatos com esporotricose observados, as lesões iniciais geralmente ocorrem na cabeça, principalmente no nariz, face e orelhas. A doença pode tornar-se rapidamente sistêmica, com aparecimento de lesões em outras partes do corpo e o acometimento de órgãos como fígado e baço. As unhas e mucosa oral dos gatos doentes mostraram ser rica em *Sporothrix* sp.

Na cidade de São Paulo, no período de março de 2011 a março de 2012, 70 das 130 amostras de felinos (53,9%) e 1 de 10 amostras de caninos (9,1%) recebidas pelo LabZoo foram positivas para *Sporothrix* sp. Os resultados são mostrados na Tabela 1. Os resultados das amostras recebidas de outros municípios são mostrados na Tabela 2.

A identificação de casos de esporotricose em gatos na área urbana da Grande São Paulo é preocupante pois, conforme observado no Estado do Rio de Janeiro, a transmissão da esporotricose em ambiente urbano pode tornarse epidêmica. Assim, a estruturação da vigilância da esporotricose no Estado

TABELA 1. ESPOROTRICOSE EM AMOSTRAS DE FELINOS E CANINOS, AMOSTRADAS
OU RECEBIDAS DE DIFERENTES DISTRITOS DE SÃO PAULO, BRASIL
MARÇO/2011 A MARÇO/2012.

SÃO PAULO				
DISTRITOS	ESPECIE	POSITIVOS	NEGATIVOS	POSITIVIDADE
Cambuci	Felina	0	1	0%
Guaianazes	Felina	1	0	100%
Itaim Paulista	Canina	0	1	0%
itaim Paulista	Felina	10	7	58,8%
Harvera	Canina	1	9	10%
Itaquera	Felina	56	52	51,9%
Tremembé	Felina	2	0	100%
Vila Matilde	Felina	1	0	100%
TOTAL	Felina	70	60	53,9%
IOIAL	Canina	1	10	9,1%

TABELA 2: ESPOROTRICOSE EM AMOSTRAS DE FELINOS E CANINOS, RECEBI-DAS DE DIFERENTES MUNICÍPIOS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL MARÇO/2011 A MARÇO/2012.

### **OUTROS MUNICÍPIOS**

MUNICÍPIOS	ESPECIE	POSITIVOS	NEGATIVOS	POSITIVIDADE
•	Canina	0	1	0%
Campinas	Felina	0	1	0%
Diadema	Canina	0	NEGATIVOS  1  1  1  0  1  1  1  3  3	0%
Diagema	Felina	10		100%
Guarulhos	Canina	0	1	0%
Guarumos	Felina	3	1 1 1 0 1 1 1 1	75%
Santo André	Felina	0	1	0%
TOTAL	Canina	0	3	0%
IOIAL	Felina	13	3	81,3%

de São Paulo é estratégica para a identificação de novos casos em animais e humanos e a detecção de novas áreas de transmissão, bem como a adoção de medidas de controle.

Conhecer melhor o papel dos gatos na transmissão do fungo é provavelmente a chave para a compreensão da evolução da transmissão da esporotricose no ambiente urbano, bem como para o desenvolvimento da vigilância e medidas de controle da doença. Características do comportamento dos gatos, especialmente as luta por fêmeas e territórios ou mesmo as brincadeiras, possibilitam a transmissão da esporotricose para outros gatos através de arranhaduras e mordeduras. Em lugares onde animais não esterilizados circulam livremente, resultando no contato e, consequen-

temente, disputas, a possibilidade de transmissão da esporotricose é intensificada, assim como a transmissão para os seres humanos.

O tratamento dos animais doentes e a esterilização animal parecem ser as medidas mais efetivas em curto prazo para o controle da esporotricose. O tratamento se justifica na medida em que o animal deixa de transmitir a doença, o que ocorre somente após alguns meses de tratamento. O tratamento é longo (seis meses) e o animal deve obrigatoriamente ficar contido neste período pois, além de continuar a transmitir a doença, gatos de vida livre podem ficar vários dias ausentes da residência, descontinuando o tratamento e diminuindo sua eficácia.

Já a esterilização dos felinos tem

como objetivo diminuir o hábito de vida livre, além de diminuir também os comportamentos de disputa por fêmeas e território.

Observa-se que a esporotricose no Brasil tem mudado seu perfil epidemiológico a partir da identificação da epidemia no Estado do Rio de Janeiro: de uma doença de baixa prevalência e incidência em pessoas que lidam com material vegetal e solo, como agricultores e jardineiros, para uma maior prevalência e incidência em gatos, donos de gatos, veterinários e auxiliares que lidam com gatos infectados. É preocupante também o fato da doença ter potencial epidêmico em ambiente urbano, principalmente em regiões de menor nível sócio-econômico.

No momento, o conhecimento a respeito deste novo perfil epidemiológico da doença ainda é restrito. Tem-se muito ainda que avançar no conhecimento da doença e do seu agente etiológico, bem como de possíveis fatores ambientais que possam estar envolvidos.

### REFERÊNCIAS

- 1. Conti-Diaz, I.A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. Mycopathologia, 108(2): 113-116, 1989
- Acha, P.N. & Szyfres, B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. 3ª Ed. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud, 2003. (Publicación Científica y Técnica No. 580).
- 3. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-Vaccari, E.M.; Melo, N.T. Tratado de Micologia Médica Lacaz. São Paulo. Editora Sarvier. 2002.
- 4. Schenck B.R. On refractory subcutaneous abcesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. Johns Hopkins Hosp. Bull., 93: 286-90, 1898.
- 5. Hektoen L. & Perkins, C.F. Refractory subcutaneous abscesses caused by Sporothrix schenkii, a new pathogenic fungus. J. Exp. Med., 5:77-89, 1900.
- 6. Lutz, A. & Splendore, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. Rev. Med. São Paulo. 21: 433-50, 1907.
- 7. Marimon, R.; Cano, J.; Gene, J.; Sutton, D.A.; Kawasaki, M.; Guarro, J. Sporothrix brasiliensis, S. globosa and S. mexicana,

three new Sporothrix species of clinical interest. J. Clin. Microbiol., 45(10): 3198-3206, 2007.

- 8. Findlay, G.H. Sporotrichosis research in the Transvaal how it began 60 years ago. S. Afr. Med. J., 68(2): 117-8, 1985.
- 9. Coles F.B.; Schuchat, A.; Hibbs, J.R.; Kon-
- dracki, S.F.; Salkin, I.F.; Dixon, D.M.; Chang, H.G.; Duncan, R.A.; Hurd, N.J.; Morse, D.L. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with *Sphagnum* moss. Am. J. Epidemiol., 136: 475-487, 1992.
- 10. Barros, M.B.L.; Schubach, T.P.; Coll J.O.; Gremião, I.D.; Wanke, B.; Schubach A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma
- epidemia. Rev. Panam. Salud Publica, 27(6): 455-60, 2010.
- 11. Oliveira, M.M.; Almeida-Paes, R.; Muniz, M.M.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; Zancopé-Oliveira, R.M. Phenotypic and molecular identification of Sporothrix isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. Mycopathologia, 172(4): 257-67, 2011.

# PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO













### Paula Monteiro de Souza

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. paulasouza@usp.br

### Júlia Almeida Maia

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. juliamaia21@gmail.com

### Paula Marcela Duque Jaramillo

Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. jaramillo526@gmail.com

### Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. eximenes@unb.br

### Pérola Oliveira Magalhães

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

perolamagalhaes@unb.br

### Adalberto Pessoa Junior

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. pessoajr@usp.br

### 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Proteases

Proteases (ou peptídeo hidrolases) são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas existentes em moléculas de proteína, dando origem a peptídeos menores e aminoácidos (Rao et al., 1998). O mercado mundial de enzimas industriais foi estimado em 3,3 bilhões de dólares em 2010, e acredita-se que a comercialização mundial dessas substâncias movi-

menta anualmente aproximadamente 300 a 600 milhões de dólares (Abidi 2011, Savitha 2011, Gonzalez-Rabade 2011). Dentre as enzimas de interesse industrial 75% são hidrolíticas, das quais dois terços são proteolíticas (Felix 2004, Savitha 2011). A relevância desse grupo de enzimas, rico em diversidade estrutural e mecanismos de ação, reflete a importância de suas aplicações nos processos industriais, como na indústria de alimentos, têxtil, farmacêutica, de couro e de detergentes (Zanphorlin 2011).

As proteases são fisiologicamente

importantes para a vida dos organismos, estando presente em plantas, animais e microrganismos (Kumari 2012). Muitos microrganismos secretam proteases para o ambiente externo a fim de degradar as proteínas, e seus produtos de hidrólise são utilizados como fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento celular (Zanphorlin 2011). Os microrganismos representam excelente fonte de proteases devido à ampla diversidade bioquímica e à susceptibilidade à manipulação genética, além de poderem ser facilmente cultivados em larga escala e

proporcionarem altos rendimentos (Kumar 2005).

As enzimas produzidas por fungos apresentam muitas vantagens, sobretudo quando se considera que a produção de enzima é extracelular e, portanto, de mais fácil recuperação (Germanoa 2003). Muitos trabalhos relatam a biossíntese de proteases pelos gêneros Aspergillus (Kitano 2002, Shata 2005, Tunga 2003, Yang 1998); Penicillium (Durand-Poussereau 1996, Germanoa 2003); Rhizopus (Farley 1992, Kumar 2005). Humicola (Aleksieva 2000): Mucor (Andrade 2002); Thermomyces Ianuginosus (Jensen 2002, Li 1997); Thermoascus (Boyce 2012, Merheb 2007) e Fusarium (Barata 2002). Os fungos podem produzir proteases ácidas, neutras ou alcalinas, ativas numa ampla faixa de pH de 4,0 a 11,0 e utilizam ampla variedade de substrato.

As proteases ácidas de importância comercial são geralmente de origem fúngica e são enzimas extracelulares empregadas na indústria de alimentos e farmacêutica (Aleksieva 2000). As proteases ácidas são fundamentalmente de origem

fúngica, possuem propriedades similares à pepsina ou à renina, e constituem um grupo que apresenta melhor atividade a valores baixos de pH (entre 2 e 5), hidrolisam ampla faixa de ligações peptídicas e exibem geralmente atividade endo e exo proteolíticas. São sensíveis a reagentes sulfidrilas, agentes quelantes, metais pesados e ao DFP. A estabilidade de atuação está situada, na maior parte dos casos pesquisados, na faixa de pH entre 2 e 6, sendo rapidamente inativadas a pH de valores maiores, assim como a temperaturas superiores a 50°C. Várias proteases ácidas apresentam, como característica comum, a pequena quantidade de aminoácidos básicos e baixos pontos isoelétricos, sendo que a massa molar média situa-se em torno de 35000 Da. Possuem interessante capacidade de ativar tripsinogênio a pH entre 3 e 4. Os principais microrganismos utilizados são do gênero Asperaillus.

Os fungos filamentosos são usados em muitos processos industriais incluindo produção de fermentados, metabólitos primários tais como ácidos orgânicos e vitaminas, e metabólitos secundários (antibióticos, alcalóides, giberelinas) (Ward 2011). Além disso, os fungos filamentosos são excelentes produtores de diversas enzimas extracelulares (amilases, proteases, celulases, pectinases, catalases, lípases, fosfatases e gluco oxidases) (van den Hombergh 1997). Fungos filamentosos são capazes de crescer em meio de cultura de baixo custo (por exemplo, subprodutos sólidos agro-industriais) e podem produzir quantidades importantes de enzimas (Hernández-Martínez 2011).

### 1.2 Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e ocupa 23% do território nacional, abrangendo cerca de 2 milhões de km2 do Brasil Central (Ratter 1997). O Cerrado compreende todo o Distrito Federal, os estados de Goiás e Tocantins e porcões de Mato Grosso. Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Piauí, Maranhão e Rondônia. Cabe ainda salientar a ocorrência de manchas da vegetação de Cerrado nos estados do Pará, Amapá, Roraima, São Paulo e Paraná. O termo Cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central (Klink 2005). A grande diversidade de espécies de animais e plantas do Cerrado está associada com a não menos desprezível diversidade de ambientes. No Cerrado a heterogeneidade espacial (a variação dos ecossistemas ao longo do espaço) é um fator determinante para a ocorrência de um variado número de espécies. Os ambientes do Cerrado variam significativamente no sentido horizontal, sendo que áreas campestres, capões de mata, florestas e áreas brejosas podem existir em uma mesma região (Machado 2004). O clima dessa região é estacional, em que um período chuvoso, que dura de outubro a março, é seguido por um período seco, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.500mm e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, entre 18°C e 28°C em média (Klink 2005, Ratter 1997). Os solos da maior parte da área do Cerrado são distróficos, com baixo pH e disponibilidade de cálcio e magnésio, e alto teor de alumínio (Ratter 1997).



Figura 1. Vegetação do Cerrado. Fonte: Ratter, 1997.

### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

# 2.1. Isolamento dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são provenientes do solo, serrapilheira e troncos em decomposição das diferentes fitofisionomias do Cerrado brasileiro, na região entre os municípios de Planaltina de Goiás, Água Fria e Padre Bernardo, que ficam na região chamada Entorno do Distrito Federal. As amostras de solo, serrapilheira e tronco foram moídas e homogeneizadas durante doze horas em um moedor de bolas, e depois trituradas num triturador elétrico SKYMSEN.

Para realizar o isolamento dos fungos foi utilizado o método de plaqueamento direto e diluição seriada em placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura: DRCB (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol); DG 18 (Dicloran Glicerol 18%); e Ágar Aveia 4% (20g de farinha de aveia, 12,5g de Ágar) contendo antibiótico 100 ppm (Estreptomicina, Penicilina ou Tetraciclina).

A diluição seriada foi realizada pesando-se 100g de amostra de tronco moído e solo peneirado misturado com 900 ml de solução salina (NaCl 0.9%) previamente autoclavada. A diluição foi feita até 10-3. Foram retiradas alíquotas de 100 µl de cada diluição (10, 10-2 e 10-3) para o plaqueamento direto nos meios de cultura já citados. A diluição e o plaqueamento foram feitos em triplicata. As placas de Petri foram incubadas a três temperaturas 28°C, 38°C e 45°C. Aquelas contendo meio Ágar-aveia permaneceram incubadas por cerca de três dias, sendo este o tempo médio para aparecimento das colônias. Já as placas contendo meio DRBC e DG18 permaneceram incubadas entre cinco e sete dias. Ao término do tempo de incubação, foi feita a contagem das colônias e extraída a raiz quadrada do número de colônias. No valor resultante foi baseada a escolha de quantas colônias diferentes seriam repicadas para proceder ao iso-

Adotou-se também o procedimento de inóculo direto de pequenas quantidades de amostra de compostagem (solo, tronco e serrapilheira) em placas contendo meio de cultura como alternativa adicional ao isolamento de colônias, visto que nem sempre o plaqueamento direto das três diluições resultou em colônias numerosas.

As diferentes colônias escolhidas (tanto das placas com plaqueamento direto quanto aquelas com diluição seriada da amostra) foram submetidas a subculturas periódicas até a purificação de cada morfoespécie. Os critérios para obtenção das subculturas foram baseados na macromorfología das colônias, como cor, textura, grau de crescimento (lento ou rápido). Os fungos isolados foram enviados para a Universidade Federal de Lavras para serem identificados sob a supervisão do Prof. Luís Roberto Batista do laboratório de Microbiologia Agrícola.

Foram analisadas 17 espécies diferentes de fungos filamentosos isolados do Cerrado da Região do Centro-Oeste Brasileiro, pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB). As espécies utilizadas para avaliação da produção de protease encontram-se na Tabela 1.

### 2.2. Condições de cultivo

Os fungos previamente armazenados em glicerol a -80°C foram reativados em meio inclinado contendo ágar batata dextrose (BDA) e incubados a 28°C por 7 dias até completo crescimento. O micélio foi suspenso em aproximadamente 5 mL de solução esterilizada composta de 0,9% NaCl e Tween 80. Esta suspensão micelial (108 esporos/mL) foi inoculada em frasco *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 50 mL do meio de cultivo (3% caldo *Sabouraud*, 2% peptona e 1% leite

desnatado). As culturas foram incubadas durante 7 dias à 28°C. Após incubação as culturas foram filtradas e o filtrado foi utilizado para a quantificação da atividade proteolítica.

# 2.3. Triagem para atividade de proteases

Os estudos de seleção dos fungos produtores de proteases foram realizados em placas de Petri contendo 10% de leite desnatado em ágar (Geok 2003, Pereira 2001, Saran 2007). O ágar foi adicionado em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 5) e esterilizado separadamente do leite, a fim de evitar a coagulação e caramelização dos seus componentes, e posteriormente o leite foi adicionado ao ágar sob condições assépticas. O meio preparado foi vertido ainda quente em placas de Petri, sendo 20 mL por placa. Cada cultivo mantido durante 7 dias à 28°C foi inoculado na superfície de uma placa de Petri. A leitura das placas foi feita após 24, 48 e 72 horas. Após esse período, as placas foram analisadas e os fungos produtores de proteases foram confirmados com a formação e visualizacão de um halo ao redor das colônias. Foi considerado como produtor de protease todo fungo que ao redor do crescimento do seu micélio formasse um halo. independente de seu diâmetro.

# 2.4. Determinação da atividade proteolítica

Para medida da atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por Charney & Tomarelli (1947), com algumas modificações. A reação foi iniciada

TABELA 1. FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO.

ESPÉCIES			
Aspergillus flavus	Penicillium citrinum		
Aspergillus foetidus	Penicillium crustosum		
Aspergillus versicolor	Penicillium decumbens		
Fusarium solani	Penicillium fellutanum		
Fusarium sp.	Penicillium glandicola		
Mucor sp.	Penicillium restrictum		
Paecylomices lilacinus	Penicillium roqueforti		
Paecylomices variotti	Penicillium rugulosum		
	Trichoderma sp.		

por incubação de 500 µL do filtrado a 37°C, na presenca de 500 µL de azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. A reação foi interrompida após 40 min pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação da caseína não hidrolisada. Após centrifugação a 3000g por 10 min; 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 1,0 mL de KOH 5,0 N. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no tubo teste, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 430 nm.

O branco da reação foi feito com 500 µL de tampão em substituição ao extrato enzimático. Este branco foi utilizado como solução de referência para zerar o espectrofotômetro. Além disso, para cada amostra foi feito um branco adicionando-se ácido tricloroacético (TCA) antes da adição do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0.001/min.

### 3. RESULTADOS

# 3.1 Seleção de fungos filamentosos produtores de proteases

Na literatura encontram-se diferentes métodos desenvolvidos para detectar a produção de enzimas por espécies de microrganismos em meio de cultura sólido. A vantagem na determinação enzimática em meio sólido deve-se principalmente à análise de numerosas espécies de fungos, as quais crescem com predominância em substrato sólido. Como método qualitativo, a vantagem do uso da incorporação de diferentes substratos em ágar nutriente consiste na sua simplicidade e baixo custo (Teixeira 1996).

No processo de tecnologia de fermentação, os fungos filamentosos têm sido utilizados como produtores de diferentes metabólitos primários, incluindo ácidos orgânicos, como ácido cítrico, glutâmico e kójico e ácidos graxos. Também são importantes produtores de metabólitos secundários, especialmente utilizados na terapêutica, por exemplo a penicilina, cefalosporina, lovastatina e taxol. Além disso, os fungos filamentosos são utilizados como produtores de uma série de enzimas, tais como amilases, celulases, pectinases, lipases e proteases (Ward 2011).

Inicialmente, a produção de protease extracelular pelos fungos filamentosos foi verificada em placas contendo ágar-leite, após um período de 24 horas à temperatura de 28°C. Dessa forma, foram avaliadas neste trabalho 17 espécies diferentes de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros Aspergillus, Fusarium, Mucor, Penicillium, Paecilomyces e Trichoderma.

Dentre as espécies analisadas 8 fungos não apresentaram formação do halo ao redor das colônias apesar de ter sido observado crescimento celular. No entanto, 9 espécies de fungos filamentosos isolados do solo de Brasília apresentaram formação de halo claro ao redor das colônias nos ensaios para detecção da produção de protease em meio de cultivo sólido contendo caseína de leite. Estas espécies foram: Aspergillus foetidus, Aspergillus versicolor, Fusarium solani, Paecylomices variotti, Penicillium citrinum, Penicillium crustosum, Penicillium fellutanum, Penicillium decumbens e Penicillium restrictum (Figura 2).

Da mesma forma. Rodarte et al. (2011) avaliaram a produção de protease de fungos filamentosos utilizando placas de Petri contendo ágar-leite. Dentre os 66 isolados de fungos filamentosos submetidos ao teste qualitativo para hidrólise da caseína, espécies do gênero Aspergillus, Fusarium, Paecilomyces e Penicillium apresentaram a formação de halo claro ao redor da colônia, caracterizando-os como produtores de proteases. Dentre as espécies avaliadas, os autores também encontraram formação de halo de hidrólise de caseína nos fungos Fusarium solani, Paecilomyces sp., Penicillium citrinum, Penicillium crustosum, Penicillium fellutanum (Rodarte 2011). Halo de hidrólise de caseína já foi observado para a espécie Penicillium decumbens isolada do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) (Silva 2011). Apesar da espécie Aspergillus foetidus não ter apresentado

a formação do halo claro no estudo feito por Rodarte (2011), no presente estudo a mesma espécie demonstrou ser um bom produtor de protease.

Dessa forma, os resultados obtidos no teste qualitativo para a seleção de fungos filamentosos proteolíticos também mostraram que espécies diferentes ou mesmo isolados diferentes de uma mesma espécie podem apresentar resultados diferentes com relação à produção de proteases, ou seja, a produção da enzima é específica para um isolado e não para uma determinada espécie (Adinarayana 2002, Braga 1998, Rodarte 2011).

# 3.2. Determinação da atividade proteolítica

Além da avaliação qualitativa, 17 espécies de fungos filamentosos foram avaliadas quanto à atividade proteolítica. A metodologia escolhida para essa avaliação utilizou como substrato a azocaseína. O método para determinação da atividade proteolítica de enzimas utilizando azocaseína como substrato foi desenvolvido por Charney & Tomarelli (1947). A azocaseína é um derivado da caseína, ao qual foi adicionado um grupo sulfonilamida, que tem coloração alaranjada. A digestão de uma solução de azocaseína por enzimas proteolíticas resulta na formação de componentes coloridos solúveis em ácido tricloroacético. A intensidade da cor desenvolvida no sobrenadante, resultante da centrifugação do substrato digerido após a adição do TCA, é função da atividade proteolítica da enzima na solução (Charney & Tomarelli 1947). Alguns autores consideram a azocaseína como um dos melhores substratos utilizados para a dosagem de atividade de proteases, devido a sua maior solubilidade (Bendicho 2002). Porém, a capacidade do organismo em utilizar vários tipos de substratos (caseína, azocaseína, hemoglobina, gelatina ou BSA) deve-se às diferenças nas especificidades do substrato da enzima produzida, ou pode ser consegüência de parâmetros que afetam a produção da enzima protease, como composição do meio, pH e temperatura (Corzo 2011, Vermelho 1996). Ou seja, a quantifica-

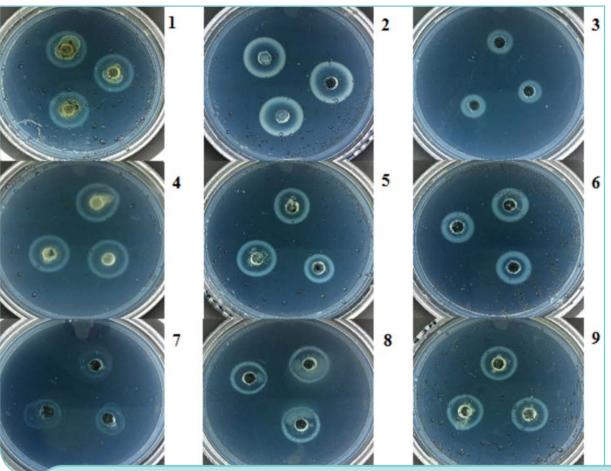


Figura 2. Espécies de fungos filamentosos que apresentaram formação de halo em Ágar-leite. (1) Aspergillus foetidus; (2) Aspergillus versicolor; (3) Fusarium solani; (4) Paecilomyces variotti; (5) Penicillium citrino; (6) Penicillium crustosum; (7) Penicillium decumbens; (8) Penicillium fellutanum; (9) Penicillium restrictum.

ção da atividade enzimática de protease dependerá das condições ótimas do substrato utilizado e do tipo de protease que o organismo é capaz de produzir.

As melhores atividades proteolíticas em pH 5,0, nas condições do experimento, foram apresentadas pelas espécies Aspergillus foetidus, Aspergillus versicolor, Fusarium solani, Paecylomices variotti, Penicillium citrinum, Penicillium decumbens, Penicillium fellutanum e Penicillium restrictum (Tabela 2). Espécies de Penicillium possuem grande potencial biotecnológico para a produção de proteases e outras enzimas. A maior atividade de protease extracelular, expressa pelos fungos estudados, foi encontrada no sobrenadante do meio de cultura das espécies Penicillium citrinum e Penicillium fellu-

tanum. Apresentaram produção de protease com atividades iguais a 25,43 U/ mL e 25,83 U/mL, respectivamente. Em outro estudo, uma atividade proteolítica igual a 10,89 U/mL foi observada na espécie Penicillium citrinum em pH 5,0 (Rodarte 2011). Outros estudos também caracterizaram a produção de protease da espécie Penicillium citrinum (Yamaguchi 1993, Yamamoto 1993). O fungo Penicillium restrictum quando cultivado em meio sólido apresentou atividade proteolítica igual a 7,8 U/mL (Gombert 1999). A espécie Penicillium decumbens também apresentou alta atividade proteolítica com valor igual a 14,71 U/mL. Apesar de a espécie Penicillium roqueforti apresentar atividade proteolítica baixa (4,45 U/mL), essa espécie é bastante descrita em relação

à produção de uma aspártico-protease extracelular (Durand-Poussereau 1996, Houmard 1979, Larsen 1998).

As espécies do gênero Aspergillus são de grande importância para a biotecnologia devido a sua alta capacidade de produzir diferentes tipos de proteases. Os isolados das espécies Aspergillus versicolor e Aspergillus foetidus apresentaram atividades proteolíticas em pH 5,0 iguais a 10,20 U/mL e 10,60 U/ mL, respectivamente. Recentemente, um estudo demonstrou que um isolado de Aspergillus flavus apresentou alta atividade proteolítica igual a 640 U/mL (Kranthi 2012). A espécie Fusarium solani também apresentou atividade proteolítica (14,45 U/mL) e isolados da mesma espécie também apresentaram atividade enzimática (Rodarte 2011).

### TABELA 2. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE 17 ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO, UTILIZANDO COMO SUBSTRATO AZOCASEÍNA EM pH 5.

ESPÉCIE	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA (U/ML)
Aspergillus flavus	0,95 ± 0,15
Aspergillus foetidus	10,60 ± 0,20
Aspergillus versicolor	10,20 ± 0,31
Fusarium solani	14,45 ± 0,27
Fusarium sp.	1,31 ± 0,20
Mucor sp.	$2,88 \pm 0,08$
Paecylomices lilacinus	0,00 ± 0,17
Paecylomices variotti	5,38 ± 0,11
Penicillium citrinum	25,43 ± 1,22
Penicillium crustosum	$3,46 \pm 0,26$
Penicillium decumbens	14,71 ± 0,49
Penicillium fellutanum	25,83 ± 1,36
Penicillium glandicola	3,41 ± 0,20
Penicillium restrictum	18,38 ± 0,53
Penicillium roqueforti	4,45 ± 0,39
Penicillium rugulosum	$0.86 \pm 0.70$
Trichoderma sp.	1,81 ± 1,00

<sup>&#</sup>x27;Uma unidade de atividade proteolítica (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001(430 nm) em 40 min a 37°C.

### 4. CONCLUSÃO

A metodologia utilizada para seleção dos fungos filamentosos isolados do cerrado do Centro-Oeste brasileiro mostrou que 9 dentre os 17 fungos filamentosos testados apresentaram atividade proteolítica, ou seja, produziam a enzima protease. As espécies de fungos filamentosos que apresentaram formação de halo claro ao redor das colônias nos ensaios para detecção da produção de protease em meio de cultivo sólido foram: Aspergillus foetidus, Fusarium solani, Paecylomices variotti, Penicillium citrinum, Penicillium crustosum, Penicillium fellutanum, Penicillium glandicola e Penicillium restrictum. As maiores atividades proteolíticas em pH 5,0, utilizando azocaseína como substrato, foram apresentadas pelas espécies Aspergillus versicolor, Aspergillus foetidus, Fusarium solani, Paecylomices variotti, Penicillium citrinum, Penicillium decumbens. Penicillium fellutanum e Penicillium restrictum. Neste sentido faz-se necessária a otimização do processo fermentativo dos fungos acima citados que apresentaram expressão de proteases

extracelulares em meio líquido, uma vez que com a otimização das variáveis do processo poderá ser possível a indução de maior atividade proteolítica.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao apoio financeiro da FAPESP, do CNPq e FAPDF.

### 5. REFERÊNCIAS

ABIDI F, CHOBERT J-M, HAERTLÉ T,MARZOUKI MN (2011) Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. Process Biochemistry 46:2301–2310.

ADINARAYANA K,ELLAIAH P (2002) Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated Bacillus sp. J Pharm Pharm Sci 5:272-278.

ALEKSIEVA P, PEEVA L (2000) Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. Enzyme and Microbial Technology 26:402-405.

ANDRADE VS, SARUBBO LA, FUKUSHIMA K, MIYAJI M, NISHIMURA K,TAKAKI GMC (2002) Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. Brazilian Journal of Microbiology 33:106-110.

BARATA RA, ANDRADE MHG, RODRIGUES RD, CASTRO IM (2002) Purification and Characterization of an Extracellular Trypsin-Like Protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. Journal of Bioscience and Bioengineering 94:304-308.

BENDICHO S, MARTÍ G, HERNÁNDEZ T,MARTÍN O (2002) Determination of proteolytic activity in different milk systems. Food Chemistry 79:245–249.

BOYCE A, WALSH G (2012) Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. Chemosphere 88:211-218. doi:S0045-6535(12)00350-5 [pii] 10.1016/j. chemosphere.2012.03.022

BRAGA AA, DE MORAIS PB, LINARDI VR (1998) Screening of yeasts from Brazilian Amazon rain forest for extracellular proteinases production. Syst Appl Microbiol 21:353-359.

CHARNEY J,TOMARELLI RM (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J Biol Chem 171:501-505.

CORZO CA, WALISZEWSKI KN, WELTI-CHANES J (2011) Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. Food Chemistry 133:631-635.

DURAND-POUSSEREAU N, FEVRE M (1996) Characterization of a protease deficient strain of Penicillium roqueforti generated by heterologous plasmid integration: potential use for protein production. J Biotechnol 51:97-105.

FARLEY PC, IKASARI L (1992) Regulation of the secretion of Rhizopus oligosporus extracellular carboxyl proteinase. J Gen Microbiol 138:2539-2544.

FELIX CR, NORONHA EF, DE MARCO JL (2004) Proteases: características e aplicações industriais. In: Summa L (ed) Enzimas como agentes biotecnológicos, pp 327-347

GEOK L (2003) Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. Biochemical Engineering Journal 13:73-77.



GERMANOA S, PANDEY A, OSAKU CA, RO-CHA SN, SOCCOL CR (2003) Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 32:246–251.

GOMBERT AK, PINTO AL, CASTILHO LR, FREIRE DM (1999) Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. Process Biochemistry 35:85-90.

GONZALEZ-RABADE N, BADILLO-CORONA JA, ARANDA-BARRADAS JS, OLIVER-SAL-VADOR Mdel C (2011) Production of plant proteases in vivo and in vitro--a review. Biotechnol Adv 29:983-996. doi:S0734-9750(11)00149-2 [pii] 10.1016/j.biotechadv.2011.08.017.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ R, GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ G, BERGMANN CW, LOERA-CORRAL O, ROJO-DOMÍNGUEZ A, HUER-TA-OCHOA S, REGALADO-GONZÁLEZ C, PRADO-BARRAGÁN LA (2011) Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumiga*tus. Process Biochemistry 46:2001–2006.

HOUMARD J, RAYMOND MN (1979) Further characterization of the Penicillium roqueforti acid protease. Biochimie 61:979-982.

JENSEN B, NEBELONG P, OLSEN J, RE-ESLEV M (2002) Enzymes production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. Biotechnology Letters 24:41-45.

KITANO H, KATAOKA K, FURUKAWA K, HARA S (2002) Specific expression and temperature-dependent expression of the acid protease-encoding gene (pepA) in Aspergilus oryzae in solid-state culture (Rice-Koji). J Biosci Bioeng 93:563-567.

KLINK CA, MACHADO RB (2005) A conservação do Cerrado brasileiro. Megadiversidade 1:

KRANTHI VS, RAO DM, JAGANMOHAN P (2012) Production of Protease by *Aspergilus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. International Journal of Microbiological Research 3:12-15.

KUMAR S, SHARMA NS, SAHARAN MR, SINGH R (2005) Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. Process Biochemistry 40:1701–1705.

KUMARI M, SHARMA A, JAGANNADHAM

MV (2012) Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. Food Chemistry 131:1295–1303.

LARSEN MD, KRISTIANSEN KR, HANSEN TK (1998) Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of Penicillium roqueforti for production of blue veined cheeses. Int J Food Microbiol 43:215-221. doi:S0168-1605(98)00114-7 [pii]

LI D, YANG Y, SHEN C (1997) Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Mycol. Res. 101:18-22.

MACHADO RB, NETO MBR, PEREIRA PGP, CALDAS EF, GONÇALVES DA, SANTOS NS, TABOR K, STEININGER M (2004) Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório Conservação Internacional 1-23.

MERHEB CW, CABRAL H, GOMES E, DA-SILVA R (2007) Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermo*ascus aurantiacus, and its hydrolytic activity on bovine casein. Food Chemistry 104:127– 131

PEREIRA CI, CRESPO MT, ROMAO MV (2001) Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in Lactobacillus curvatus and L. homohiochii. Int J Food Microbiol 68:211-216.

RATTER JA, RIBEIRO JF, BRIDGEWATER S (1997) The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. Annals of Botany 80:223-230.

RODARTE MP, DIAS DR, VILELA DM, SCHWAN RF (2011) Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). Acta Scientiarum. Agronomy 33:457-464.

SARAN S, ISAR J, SAXENA RK (2007) A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. J Biochem Biophys Methods 70:697-699.

SAVITHA S, SADHASIVAM S, SWAMINA-THAN K, LIN FH (2011) Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 42:298–304.

SHATA HM (2005) Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of Aspergillus oryzae. Pol J Microbiol 54:241-247.

SILVA DCV, TIAGO PV, MATTOS JLS, PAIVA LM, SOUZA-MOTTA CM (2011) Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. Revista Brasileira de Botânica 34:607-610.

TEIXEIRA MFS, FERNANDES OCC, HERRERA AM, DURÁN N (1996) Determinação qualitativa de proteases: método de cupplate modificado. Rev. UFAM. Série: Ciências da Saúde 4/5 (1/2):39-45.

TUNGA R, SHRIVASTAVA B, BANERJEE R (2003) Purification and characterization of a protease from solid state cultures of Aspergillus parasiticus. Process Biochemistry 38:1553-1558.

van den HOMBERGH JPTW, van de VONDERVOORT PJI, FRAISSINET-TACHET L, VISSER J (1997) *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. Trends in Biotechnology 15:256-263

VERMELHO AB, MEIRELLES MN, LOPES A, PETINATE SD, CHAIA AA, BRANQUINHA MH (1996) Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. Mem Inst Oswaldo Cruz 91:755-760.

WARD OP (2011) Production of recombinant proteins by filamentous fungi. Biotechnology Advances

YAMAGUCHI M, HANZAWA S, HIRANO K, YAMAGATA Y, ICHISHIMA E (1993) Specificity and molecular properties of penicillolysin, a metalloproteinase from Penicillium citrinum. Phytochemistry 33:1317-1321.

YAMAMOTO N, MATSUMOTO K, YAMAGATA Y, HIRANO K, ICHISHIMA E (1993) A heat-labile serine proteinase from Penicillium citrinum. Phytochemistry 32:1393-1397.

YANG F, LIN I (1998) Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. Enzyme and Microbial Technology 23:397-402.

ZANPHORLIN LM, CABRAL H, ARANTES E, ASSIS D, JULIANO L, JULIANO MA, DA-SILVA R, GOMES E, BONILLA-RODRIGUEZ GO (2011) Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. Process Biochemistry 46:2137–2143.

# REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS - UM DESAFIO NA INDÚSTRIA BIOTECNOLÓGICA













André M. Lopes<sup>1</sup>, Valéria C. S. Ebinuma<sup>1</sup>, Priscila G. Mazzola<sup>3</sup>, Pérola O. Magalhães<sup>2</sup>, Carlota Rangel-Yagui<sup>4</sup>, Adalberto Pessoa Jr.<sup>1</sup>

### **RESUMO**

Endotoxinas, também denominadas lipopolissacarídeos (LPS), são os principais contaminantes encontrados em biomoléculas comercialmente disponíveis ou substâncias biologicamente ativas, e que muitas vezes dificultam o estudo dos efeitos biológicos das moléculas alvo. A presença de pequenas quantidades de endotoxinas em preparações de biomoléculas recombinantes pode causar efeitos secundários no organismo hospedeiro, tais como choque endotóxico, lesão de tecidos, e mesmo ocasionar morte. Devido a estas reações, é essencial a remoção de endotoxinas de soluções injetáveis e outros produtos biológicos e farmacêuticos. Uma visão geral sobre o tema é o escopo deste trabalho. Está sendo apresentada uma revisão da literatura no que diz respeito aos métodos

para a remoção de endotoxinas a partir de preparações biotecnológicas. Uma breve história sobre as endotoxinas é apresentada, seguida por uma revisão das propriedades químicas e físicas destas moléculas e os seus efeitos fisiopatológicos quando o organismo é exposto ao LPS excessiva ou sistemicamente. Uma revisão das técnicas de remoção de endotoxinas a partir de preparações biotecnológicas é descrita, enfatizando que a remoção de endotoxinas pode ser conduzida de forma mais econômica com base em comparações com processos propostos na literatura (por exemplo, adsorção, extração líquido--líquido, ultrafiltração, cromatografia). Diferentes métodos são mencionados com valores de recuperação de proteína relativamente altos. No entanto, é dada especial atenção aos sistemas micelares de duas fases aguosas, que apresentam potencial para a remoção de endotoxinas de biomoléculas recombinantes, pois fornecem ambiente ameno para materiais biológicos. A remoção eficiente e rentável destes contaminantes de preparações farmacêuticas é um grande desafio na indústria biotecnológica. Apesar do desenvolvimento de novos métodos, tais como os sistemas micelares de duas fases aquosas, em anos recentes, ainda faz-se necessária maior investigação neste campo.

### 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante tem, nos últimos anos, possibilitado a produção em larga escala de várias proteínas e peptídeos destinados a aplicações terapêuticas. A recuperação e purificação do produto é uma etapa fundamental, na qual é desejável a obtenção de alta pureza associada a um baixo custo. Através da tecnologia do DNA recombinante, proteínas podem ser obtidas intra ou extracelularmente em uma célula hospedeira, sendo comumente utilizada a bactéria *Escherichia coli* por ser considerada um micro-organismo modelo com características genéticas bem conhecidas. Estas proteínas são denominadas heterólogas, por serem obtidas por células que não as produzem naturalmente<sup>(8,19,40)</sup>.

Durante a produção destas proteínas recombinantes, somente a etapa de recuperação e purificação representa, aproximadamente, de 60 a 70% dos custos operacionais. E, no caso da *E. coli*, a recuperação e purificação do bioproduto recombinante exige a remoção de fragmentos celulares de alguns precursores de proteínas e de impurezas e contaminantes derivados da cultura celular, sobretudo das endotoxinas<sup>(7)</sup>.

As endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) derivados da membrana celular de bactérias Gram-negativas e são responsáveis pela sua organização e estabilidade. Em indústrias farmacêuticas, é possível encontrar endotoxinas durante os processos de produção ou no produto final. Apesar dos LPS estarem ligados à parede celular bacteriana, estes podem ser continuamente liberados ao meio. A liberação não acontece somente com a morte das células, mas também durante o crescimento e divisão celular. Além disso, sabendo que muitas bactérias crescem em meios pobres de nutrientes, como em água, solução salina e solução tampão, é possível encontrar LPS em quase todos os ambientes.

A presença dos LPS, no entanto, é indesejável devido a sua potente atividade biológica que causa efeitos fisiopatológicos no hospedeiro. Em condições de exposição aos LPS, mesmo em concentrações muito baixas (<1,0 unidade endotóxicas por mL), uma resposta inflamatória sistêmica pode ocorrer, levando a múltiplos efeitos, tais como choque endotóxico, lesão tecidual e morte(5,20,39,63,102). Contudo, os LPS não agem diretamente contra as células ou órgãos, mas através da ativação do sistema imune, especialmente através de monócitos e macrófagos, com a liberação de uma série de mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL-6 e IL-1). O nível máximo de LPS por aplicação em via intravenosa de produtos farmacêuticos e biológicos é definido como 5,0 unidades endotóxicas (UE) por kg de peso por hora, preconizado em todas as farmacopéias<sup>(15)</sup>. O termo UE descreve a atividade biológica de uma endotoxina, por exemplo, 100 pg de uma endotoxina padrão EC-5 e 120 pg de endotoxina proveniente de *E. coli* O111:B4 têm atividade de 1,0 UE<sup>(15)</sup>.

Na indústria biotecnológia, bactérias como E. coli são amplamente utilizadas para gerar bioprodutos a partir de DNA recombinante, tais como peptídeos e proteínas. Consequentemente, estes produtos estão contaminados com LPS(25). Por esta razão, biomoléculas obtidas a partir de bactérias Gram-negativas devem ser livres de LPS para não induzir nenhum tipo de efeito quando administradas em animais ou seres humanos. No entanto. os LPS são moléculas estáveis e resistem a extremas variações de temperaturas e de pH em comparação com as proteínas(25,66). Diferentes processos têm sido desenvolvidos para a remoção de LPS de proteínas, baseados nas propriedades físico-químicas destas moléculas. Estes processos incluem resinas de afinidade por LPS, extrações por sistemas de duas fases aquosas, ultrafiltração, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca-iônica, entre outros. Estes procedimentos promovem diferentes graus de sucesso na separação de LPS de proteínas, que são estritamente dependentes das propriedades da biomolécula de interesse(41).

Antes de contemplar as principais técnicas de remoção de LPS de preparações biotecnológicas, tópicos como as propriedades físico-químicas e os mecanismos de ação destas moléculas devem ser considerados.

# 1.1. LPS e suas propriedades físico-químicas

As bactérias Gram-negativas apresentam toxinas estáveis que constituem a estrutura da membrana celular, os LPS (também conhecidos como endotoxinas ou pirogênios), os quais participam na interação com o ambiente e com possíveis hospedeiros<sup>(65)</sup>. Ainda que ligados às células, os LPS são continuamente liberados no meio(67).

Em geral, os lipopolissacarídeos apresentam estrutura anfifilica composta de uma cabeça polar heteropolissacarídica e uma cauda apolar (lipídeo), como esquematizado na Figura 1. Na maioria das espécies, estes LPS são constituídos por três regiões distintas: (a) a região O-Antígeno, que é variável e define a sorologia e identidade da bactéria; (b) a Região Interna oligossacarídica, que corresponde a uma estrutura conservada dentre as bactérias sendo que até o momento foram definidos 5 tipos diferentes; e (c) a Região lipídica ou lipídeo A. que é altamente conservada(73). A região lipídica mantém a molécula ligada à membrana, enquanto que a região heteropolissacarídica, constituída do interior oligossacarídico e da superfície antigênica, é exposta ao ambiente.

O lipídeo A é responsável pela maioria das atividades biológicas da molécula; ou seja, pela sua ação tóxica(51,66,97). É composto de um dissacarídeo de glucosamina, altamente substituído por ácidos graxos de cadeia longa com grupamentos amida e éster. O ácido graxo com ligação amida mais comum, com cadeia de 14 carbonos, é o ácido 3-hidroximirístico. Os ácidos graxos com ésteres ligados são mais variáveis e comumente incluem os ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico(68). Essa parte hidrofóbica da molécula dos LPS organiza-se em uma forma hexagonal, resultando em uma estrutura mais rígida, quando comparada com o restante da molécula. Até o momento, não são conhecidos LPS livres de lipídeo A(45,66,76).

O oligossacarídeo possui sua estrutura formada por uma região com o ácido 2-ceto-3-deoxioctônico (KDO) ligado a heptoses e outra região ligada a hexoses. O KDO está sempre presente na molécula de LPS e vem sendo utilizado como um indicador na análise de LPS (Figura 2). Em *E. coli* cinco diferentes tipos de sequência de oligossacarídeos são conhecidas. Na espécie *Salmonella* somente uma sequência foi descrita<sup>(68)</sup>. Os oligossacarídeos próximos à região lipídica e o lipídeo A são parcialmente fosforilados (pK<sub>1</sub>=1,3; pK<sub>2</sub>=8,2 dos grupos fosfatos no lipídeo). Dessa maneira,

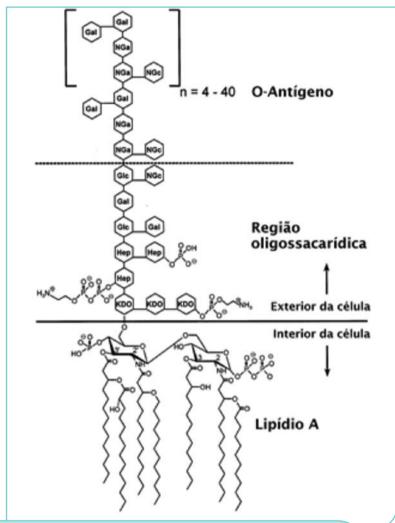


Figura 1. Estrutura química dos LPS de E. coli O111:B4 de acordo com Ohno e Morrison (1989)<sup>(64)</sup>. Abreviações: Hep (L-glicerol-D-mano-heptose); Gal (galactose); Glc (glicose); KDO (ácido 2-ceto-3-deoxioctónico); NGa (N-acetil-galactosamina) e NGc (N-acetil-glicosamina).

as moléculas de LPS exibem carga negativa em soluções com pH superiores a 2,0<sup>(26)</sup>.

A região do O-antígeno é geralmente composta por uma sequência de oligossacarídeos idênticos (3-8 monossacarídeos), os quais são específicos para cada espécie de bactéria e determinam a identidade sorológica da respectiva bactéria, permitindo a identificação de mais de 1000 sorotipos de *Salmonella* e mais de 100 sorotipos de *E. coli*<sup>(66)</sup>.

A massa molar de um monômero de endotoxina varia entre 2,5 e 70 kDa, devido à variabilidade da cadeia de oligossacarídeo. As massas molares de 2,5 kDa são deficientes em O-Antígeno e de 70 kDa apresentam O-Antígeno muito longo. Estudos demonstraram que os LPS podem formar vários agregados supramoleculares em solução aquosa, pois sua estrutura apresenta caráter anfipático. Provavelmente isso ocorre devido às interações não polares entre cadeias lipídicas, bem como ligações geradas entre os grupos fosfato por cátions divalentes<sup>(5)</sup>.

Os agregados formados vêm sendo estudados por microscopia eletrônica e outras técnicas analíticas, tais como difração de raios-X, espectroscopia FT-IR

e RMN (ressonância magnética nuclear). Os resultados têm mostrado que os LPS em soluções aquosas podem agregarse em diferentes estruturas, formando arranjos invertidos cúbicos e hexagonais, como micelas e vesículas, com diâmetros acima de 0,10 µm e tamanho molecular superior a 1.000 kDa (vesículas), com alta estabilidade, dependendo das características da solução como pH, presença de íons, tensoativos, entre outros<sup>(16,23)</sup>.

Como mencionado anteriormente. estas moléculas são altamente estáveis à temperatura e não são destruídas em processos de esterilização (121 °C por 30 minutos, calor úmido). Para a inativação da molécula de LPS é necessário aplicar temperatura de 250 °C por mais que 30 minutos ou 180 °C por mais que 3 horas<sup>(23,80)</sup>. Os LPS são destruídos também por determinados agentes oxidantes como permanganato de potássio. mistura sulfocrômica, água oxigenada, entre outros, dependendo, contudo, do tempo de contato utilizado. Soluções de ácidos e bases devem apresentar concentração maior que 0,10 mol/L para serem capazes de inativar os LPS em equipamentos de laboratório(69).

## 1.2. Mecanismos de ação dos LPS

Os LPS exercem seus efeitos quando a parede celular de bactérias Gram--negativas sofre lise. Os antibióticos usados para tratar doenças causadas por bactérias Gram-negativas podem lisar as células bacterianas. Essa reação libera os LPS e pode levar a uma piora imediata dos sintomas, mas a condição usualmente melhora à medida em que os LPS são degradados. Os principais sintomas do hospedeiro são calafrios, febre, fraqueza, dores generalizadas e, em alguns casos, choque, podendo até mesmo levar o indivíduo a óbito. Outra consequência da ação dos LPS é a ativação das proteínas da coagulação do sangue, causando a formação de pequenos coágulos. Esses coágulos obstruem os capilares e o resultante suprimento sanguíneo diminuído induz à morte dos tecidos. Essa condição é referida como coagulação intravascular disseminada(96).

A ação biológica dos LPS está associada à porção lipídica da molécula.

Porém, a porção O-Antígeno dos LPS é responsável, em grande parte, pela antigenicidade específica das bactérias Gram-negativas, que responde por milhares de sorotipos. A perda do O-Antígeno resulta na perda da virulência e sugere que esta porção é importante durante a interação parasita-hospedeiro. Endotoxinas "mutantes", livres dessa porção, são mais susceptíveis a serem fagocitadas e eliminadas. Mutantes ausentes da porção lipídica não foram isolados, exceto em condições letais, segundo Beutler e Cerami (1988)<sup>(10)</sup>, os quais acreditam que essa região deva ser essencial para a viabilidade da célula.

Os humanos são extremamentes sensíveis aos LPS. Quantidades muito pequenas são suficientes para deflagrar o estado de choque. Frente à infecção por bactérias Gram-negativas, o indivíduo está exposto tanto ao LPS ligado à membrana da bactéria, quanto à endotoxina livre (fragmentos da parede celular), que normalmente é liberada durante a multiplicação bacteriana. Os LPS são capazes de induzir as células mononucleares humanas (MNC) a produzirem interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), que são duas citocinas integrantes da resposta imune<sup>(56)</sup>. Dentre os múltiplos efeitos biológicos da IL-1 destaca-se: a febre (ação no hipotálamo); a neutrofilia (ação na medula óssea); a proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos); a liberação de aminoácidos dos músculos; a produção de IL-2 (ação nas células T) e a produção de anticorpos (ação nas células B)(56). Os LPS interagem com diferentes fases do sistema imunológico. Após penetrarem na circulação, ligam-se a lipoproteínas plasmáticas, que resulta em redução de sua atividade biológica. Mesmo assim, ativam o complemento, induzem a coagulação, afetam a função hepática e o sistema neuro-endócrino. Essa diversidade de respostas fisiológicas leva à eliminação dos LPS, seus fragmentos, e até mesmo de bactérias Gram-negativas. Porém, devido às altas concentrações ou maior sensibilidade aos LPS, as ações do sistema imunológico tornam-se incontroláveis e insuficientes para o organismo(82).

Nos últimos 20 anos inúmeros esforcos têm sido feitos para desenvolver

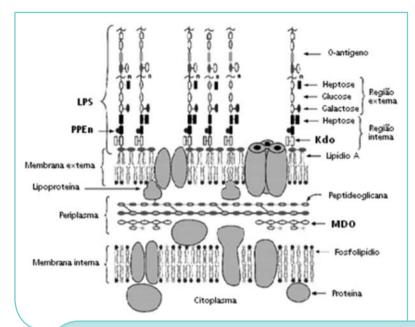


Figura 2. Membrana interna e externa de E. coli K-12 de acordo com Raetz et al. (1991)<sup>(72)</sup>. Nos LPS os desenhos ovais e retangulares representam resíduos de açúcares, enquanto círculos representam grupos com cabeça polar de vários lipídeos.

proteínas terapêuticas, baseadas em anticorpos IgG e IgM, que visam à proteção contra a intoxicação por LPS, um problema comum em hemodiálises e infecções bacterianas agudas. Apesar de mostrarem-se promissoras, as tentativas clínicas não obtiveram sucesso, sendo uma das razões a grande variedade das estruturas químicas dos LPS(9.17,91,95.103).

Em síntese, acredita-se que a febre (resposta pirogênica) causada por LPS ocorra como ilustrado na Figura 3. Quando as bactérias Gram-negativas são ingeridas por células fagocíticas (etapa 1) e degradadas em vacúolos (etapa 2), os LPS da parede celular bacteriana são liberados. Estes LPS induzem à formação de pequenas moléculas protéicas pelos macrófagos, denominadas interleucinas-1 (IL-1), que são transportadas pelo sangue até o hipotálamo (etapa 3). A IL-1 induz o hipotálamo a liberar lipídeos denominados prostaglandinas (etapa 4), que reajustam o termostato do hipotálamo a uma temperatura maior. O resultado dessa sequência de reações é a febre (96).

O choque séptico (ou choque endotóxico) está relacionado à secreção de uma substância pelos macrófagos. A fagocitose de bactérias Gram-negativas faz com que os fagócitos secretem um polipetídeo denominado fator de necrose tumoral. Este fator liga-se a muitos tecidos no organismo, e um dos seus efeitos é lesar os capilares sanguíneos: sua permeabilidade é aumentada, e eles perdem grandes quantidades de líquido. O resultado é uma queda na pressão arterial que leva ao choque. Essa pressão baixa tem efeitos sérios sobre os rins, pulmões e no trato gastrointestinal. A presença de LPS no organismo não desencadeia a formação de antitoxinas efetivas para conter o efeito de toxicidade<sup>(96)</sup>.

### 2. TÉCNICAS DE REMOÇÃO DE LPS

O tema sobre a remoção de LPS tem sido o motivo de muitas pesquisas científicas. A discussão de aspectos pertinentes no tocante à remoção de LPS de preparações biológicas, bem como uma ampla revisão das pesquisas existentes são obrigatórias para elucidação de estudos futuros.

Afinal de contas, as moléculas de LPS podem ser consideradas estáveis

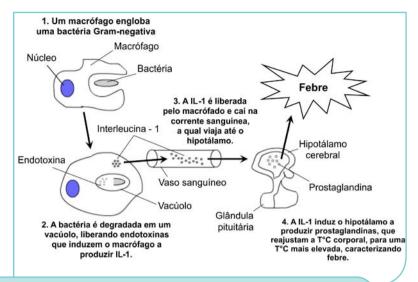


Figura 3. Mecanismo proposto pelo qual os LPS causam febre. Adaptado de Tortora et al. (2000)<sup>(96)</sup>.

frente à temperatura e pH; consequentemente, a remoção dessas substâncias se torna uma das tarefas mais difíceis nos processos de purificação de biomoléculas de interesse produzidas por bactérias Gram-negativas<sup>(87,75)</sup>.

Os avanços na biotecnologia abriram inúmeras possibilidades para a produção em grande escala de muitas biomoléculas que são importantes para a pesquisa nas áreas farmacêuticas e industriais. O desenvolvimento de técnicas e métodos de separação e purificação de proteínas e outras biomoléculas tem sido de fundamental importância para muitos desses avanços no setor biotecnológico(77,78). As biomoléculas provenientes de E. coli recombinante podem ser expressas de forma solúvel extracelular, solúvel intracelular, constituição de membranas ou corpos de inclusão. Nos três últimos casos, é necessário o uso de processos de ruptura celular para recuperar a biomolécula de interesse, que levam à liberação de grandes quantidades de LPS.

A remoção dos LPS se torna mais desafiadora quando associada a biomoléculas sensíveis à temperatura e ao pH, como as proteínas por exemplo (35). Inúmeros métodos são tradicionalmente utilizados para reduzir a contaminação por LPS de preparações protéicas, incluindo cromatografia de troca-iônica, adsorção por afinidade, como L-histidina imobilizada, poli-L-lisina, polimixina B,

cromatografia de filtração em gel, ultrafiltração, centrifugação de gradiente de sacarose e separação de fases por Triton X-114<sup>(2,6,40,45,50,60,81,91,93,100)</sup>. O ponto fundamental para o sucesso destas técnicas de remoção de LPS dependerá das características físico-químicas da biomolécula-alvo requerida<sup>(41)</sup>.

Algumas técnicas geralmente empregadas para remoção de LPS são ultrafiltração e cromatografia de troca-iônica. A ultrafiltração, embora efetiva, remove LPS da água e é um método ineficiente na presença de proteínas que podem ser danificadas por forças físicas, sobretudo tensão de cisalhamento(71,88,92). Para a remoção de LPS de preparações de proteínas recombinantes, a solução de proteína pode atravessar uma coluna que contém polimixina B imobilizada em Sepharose 4B, com o objetivo de que o contaminante seja capturado pela coluna. Similarmente, histidina também imobilizada em Sepharose 4B tem capacidade para capturar LPS de soluções protéicas, já que apresenta afinidade pelos grupos fosfatos presentes na estrutura dos LPS, e também pode ser um método empregado na remoção deste contaminante(50).

Outro processo utilizado para a remoção de LPS, a cromatografia de troca-iônica, possui a vantagem de apresentar resinas carregadas e tem sido extensivamente usada para adsorção

de moléculas de LPS. Porém, quando proteínas negativamente carregadas necessitam ser purificadas, elas podem co-adsorverem sobre a matriz e causar perda significativa do material biológico de interesse. E ainda, proteínas positivamente carregadas podem formar complexos com os LPS, o que pode causar assim um arraste das proteínas pelos LPS ao longo da coluna, e consequentemente, minimizarem a eficiência do processo de purificacão<sup>(5)</sup>.

Uma variedade de técnicas de remocão de endotoxinas foram analisadas(99). Adsorventes, como carvão ativado(61) ou resinas de troca-iônica(88), ocasionam baixa seletividade e baixa recuperação de proteína-alvo. Ultrafiltração(22,85) e cromatografia de exclusão exigem que haja grande diferença de tamanho entre a proteína-alvo e os LPS, e ainda não são eficazes se este contaminante se liga fortemente à proteína-alvo<sup>(6)</sup>. Ligantes de afinidade para LPS, como a histamina(58), histidina<sup>(6)</sup>, e polimixina B<sup>(6,28)</sup> ou poli aminatos como g-metil L-glutamato(24) são razoavelmente eficazes para remoção de LPS e com recuperação de proteína relativamente alta. A imobilização por poli-L-lisina-Sepharose e DEAE-Sepharose<sup>(6)</sup> também tem se mostrado eficaz para remoção de LPS de soluções de proteínas com taxas de remoção de até 104 UE/mL, com contaminação inicial de 106 UE/mL. Ambos os processos citados só podem ser utilizados se os níveis de contaminação são iquais ou inferiores a 106 UE/mL, a fim de se obter níveis toleráveis de contaminação final inferiores a 5,00 UE/mL<sup>(6)</sup>. Altas concentrações iniciais de LPS, variações do ponto isoelétrico (pl) da proteína e de força iônica podem ocasionar baixa recuperação da proteína-alvo(24) e baixas taxas de remoção de LPS(6,54).

O sucesso destas técnicas para a remoção de LPS é estritamente dependente das características físico-químicas da proteína-alvo requerida<sup>(41)</sup>. No entanto, a baixa concentração obtida e sensibilidade térmica da proteína-alvo podem trazer dificuldades para a purificação de biomoléculas de interesse biotecnológico e, portanto, envolver técnicas de alto custo.

Na busca por métodos alternativos, processos por extração líquido-líquido

realizado em vários tipos de sistemas aquosos têm sido largamente investigados na área de Biossepara-cão (3.11,30-34,46-49,52,53,62,74,89,90)

Estudos prévios mostraram que o uso da separação de fases por Triton X-114 também pode ser aplicado para a remoção de altas concentrações de LPS para a purificação de proteínas(1,2,12,14,29,45-48,55,75,79,84). Além disso, apresentam baixo custo, fácil manipulação, e oferecem um ambiente ameno para as biomoléculas.

Esse processo proporciona seletividade na partição de proteínas de interesse e dos contaminantes, segundo a hidrofobicidade de cada componente. Desta maneira, o SMDFA pode ser empregado para remover LPS contaminante proveniente da produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico.

# 2.1 Sistemas de duas fases aquosas

O Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA) é um tipo específico de extração líquido-líquido que explora o fato de algumas moléculas de tensoativo, sob determinadas condições, serem capazes de se separar espontaneamente em duas fases aquosas, ainda que imiscíveis, sendo que proteínas e outras biomoléculas podem se distribuir de forma desigual entre essas fases(43).

Agentes tensoativos são moléculas anfifilicas compostas por uma porção hidrofílica, região da molécula que possui afinidade pela molécula de água e que é denominada de "cabeça polar", ou simplesmente "cabeça", e uma porção hidrofóbica, região da molécula que não possui afinidade pela molécula de água e que é denominada de "cauda apolar", ou simplesmente "cauda" (Figura 4).

Os tensoativos podem ser classificados em: (a) iônicos, que possuem cabeça positivamente ou negativamente carregada; (b) não-iônicos, possuindo cabeça polar capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água; e (c) zwitteriônicos, possuindo cabeça caracterizada por um dipolo. Dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), polioxietileno p-t-octil fenol (Triton X-114) e dioctanoilfosfatidilcolina

(C8-lecitina) são exemplos de tensoativos aniônico (carregado negativamente), catiônico (carregado positivamente), não-iônico e zwitteriônico, respectivamente<sup>(27)</sup>.

Em solução aguosa as moléculas tensoativas podem exibir diversos tipos de comportamento, dependendo da concentração e características da solução. Em soluções com concentração de tensoativo abaixo da concentração micelar crítica (CMC), específica para cada tensoativo, as moléculas deste deslocam na interface ar-água, projetando suas caudas apolares em direção à fase ar de forma a minimizar o contato com a água. Esse fenômeno explica a terminologia inglesa surfactant (surface-active agent). A maioria dos tensoativos apresenta solubilidade mínima na fase aguosa, devido ao caráter hidrofóbico do grupo apolar. Por outro lado, em soluções com concentrações de tensoativos superiores à CMC, além da adsorção na interface, as moléculas desses formam agregados conhecidos como micelas, nos quais as caudas hidrofóbicas se associam no interior. minimizando o contato com a água, e as cabeças polares permanecem na periferia das micelas, que maximizam seu contato com a água(23,94).

De um modo mais específico, uma solução aquosa de tensoativo não-iônico é capaz de se separar macroscopicamente em duas fases, com o aumento

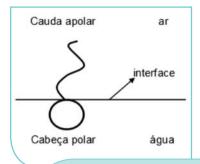


Figura 4. Estrutura do monômero de um tensoativo, na qual pode ser visualizada a porção da cabeça polar de caráter hidrofílico, e a porção da cauda apolar de caráter hidrofóbico.

da temperatura, que resulta num ambiente concentrado, rico em micelas e outro diluído, pobre em micelas, como mostra a Figura 5. Como a concentração do tensoativo em ambas as fases excede a CMC, micelas estão presentes tanto na fase superior quanto na fase inferior<sup>(44)</sup>. Ambas as fases contêm micelas cilíndricas ou esféricas, as quais podem ser modeladas como micelas formadas por um corpo cilíndrico terminado em duas micelas esféricas nas extremidades<sup>(70,98,104)</sup>.

Contudo, as micelas presentes na fase micelar (concentrada em micelas –  $F_c$ ) são maiores (mais alongadas) e mais numerosas do que as presentes na fase pobre em micelas (fase diluída –  $F_d$ ). A

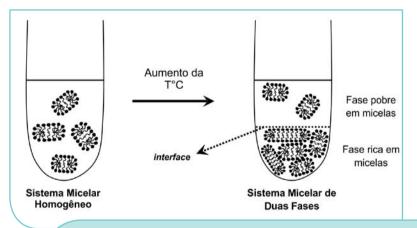


Figura 5. Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo não-iônico Triton X-114. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas; com o aumento da temperatura, se separa em uma fase rica em micelas (fase concentrada - F<sub>c</sub>) que coexiste com uma fase pobre em micelas (fase diluída - F<sub>d</sub>). Adaptado de Nikas et al. (1992)<sup>(62)</sup>.

distinção no ambiente físico-químico das duas fases formadas é a base da utilização dos sistemas que envolvem processos de extração de materiais biológicos<sup>(44)</sup>.

O êxito desse sistema depende da habilidade em manipular a composição das fases, influenciando no coeficiente de partição da biomolécula de interesse e na seletividade. Existem muitas possibilidades para manipular a composição do sistema de forma a obter fases com características diferenciadas, como por exemplo: (a) escolha dos agentes tensoativos e de sua concentração; (b) escolha da temperatura de partição do ensaio; (c) escolha do tampão e da força iônica; e (d) modificação química do tensoativo ligado à molécula com afinidade à biomolécula-alvo(101).

Esse princípio de separação tem sido extensamente utilizado com sucesso na extração e na purificação de inúmeros materiais biológicos, tais como proteínas(36,42,98), vírus(33), antibióticos(4,37,83), extração de proteína-alvo de cultura não clarificada de microorganismos(18), separação de proteínas em larga escala(59,86), DNA e ácidos nucléicos(18), solubilização de membrana(21), proteínas geneticamente modificadas(86,52,46,47), enzimas(48,74), peptídeos(32), entre outros.

A utilização dos SMDFA para remocão de moléculas contaminantes como os LPS, consiste em uma estratégia primossora já que se acredita que as moléculas de LPS sejam estruturadas em agregados micelares mistos na fase concentrada em micelas. Essas interacões possivelmente ocorrem por interações apolares de cadeias alquílicas do lípideo A e dos tensoativos. Assim, com a separação das fases pela elevação da temperatura, moléculas de LPS podem ser removidas na fase concentrada em micelas (F.). Nesse sentido, o SMDFA composto por Triton X-114 que apresenta um ponto de névoa (T<sub>NÉVOA</sub>) de aproximadamente 25,0°C (1,0% (p/p)) mostra-se vantajoso para a purificação de biomoléculas termossensíveis<sup>(2,11,44)</sup>.

Alguns trabalhos encontrados na literatura que mostram a utilização do processo por SMDFA como etapa para a remoção de LPS, foram investigados por Adam *et al.* (1995)<sup>(1)</sup>. Esses autores utilizaram o tensoativo Triton X-114 e

mostraram redução de LPS de 100 vezes em duas etapas, com concentração final de 30 UE/mg e 50,0% de perda de bioatividade. Além disso, redução de aproximadamente 100 vezes de LPS foi relatada por Cotton et al. (1994)(14) de preparações de DNA plasmídico, com concentração final de 0.1 UE em 6 ug de DNA. Uma comparação entre o processo de adsorção por afinidade e SMDFA (por Triton X-114) para a purificação de proteínas recombinantes, como mioglobina e isoenzimas de creatina quinase, foi descrito por Liu et al. (1997)(45). Esses autores concluíram que o processo por SMDFA foi o mais efetivo, o qual reduziu a concentração de LPS para 2,5-25 UE/ mg, representando remoção de aproximadamente 99,0%.

Reichelt et al. (2006)<sup>(75)</sup> testaram a remoção de LPS através da cromatogra-fia de afinidade por tag de histidina, com uma etapa de lavagem utilizando Triton X-114. A aplicação de 0,1% de Triton X-114 nas etapas de lavagem foi bem sucedida na redução de LPS durante a purificação de proteínas. Os ensaios realizados com determinadas proteínas continham concentrações de 2.500 até 34.000 UE/mg de LPS; após a purificação com Triton X-114, as concentrações finais de LPS obtidas foram de aproximadamente 4.0 a 0.20 UE/mg.

Aida e Pabst (1990)(2) relataram um método para redução de LPS em soluções protéicas usando Triton X-114 no qual o tensoativo auxilia a dissociação entre LPS e proteínas, enquanto também proporciona uma separação de fases capaz de remover os LPS. De acordo com esses mesmos autores, a separação de fases usando Triton X-114 foi efetiva e reduziu os LPS de soluções de três proteínas diferentes (citocromo c, albumina e catalase). O primeiro ciclo de separação de fases reduziu a concentração de LPS em 103 vezes. Ciclos adicionais de separação de fases resultaram em remoção completa de LPS. Os LPS foram encontrados na fase concentrada, rica em micelas, e a biomolécula de interesse foi recuperada na fase diluída do sistema.

Liu et al. (1997)<sup>(45)</sup> demonstraram que a separação de fases por Triton X-114 foi empregada também em outras preparações de proteínas recombinantes. Os

pesquisadores executaram três ciclos de separação com Triton X-114 e a concentração de LPS em todas as proteínas recombinantes derivadas de E. coli foram reduzidas a 99,0% da concentração inicial. Além disso, a imunoatividade, a integridade física e a atividade biológica da proteína permaneceram inalteradas depois do processo de separação de fases. A separação de fases pode ser repetida em passos múltiplos até que as concentrações de LPS na fase diluída alcancem um nível satisfatório. EPS (exopolissacarídeo, semelhante aos LPS) proveniente de Klebsiella sp I-714 também foram removidos depois de duas etapas de extração com 2,0% de Triton X-114, com somente o dobro da diminuição da atividade biológica(1). Além disso, esse método também foi empregado com sucesso para a remoção de LPS proveniente de Pseudomonas solanacearum, bastonete Gram-negativo(1).

Desta maneira, extração com Triton X-114 é rápida, eficiente, não degradativa e tem se mostrado bastante eficiente na remoção de moléculas de LPS de preparações biológicas. Ressalta-se, entretanto, que alguns tensoativos empregados são relativamente caros e, ainda, podem afetar a bioatividade da proteína-alvo<sup>(41)</sup>.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Apesar de todas as alternativas apresentadas, consideramos que a remoção de endotoxinas de preparações biotecnológicas continua sendo um grande desafio. Além disto, acreditamos que o emprego de sistemas micelares de duas fases aquosas para remoção de LPS é efetivamente uma estratégia interessante e que merece ser mais explorada no sentido de se estabelecerem condições que possam ser transpostas para o setor produtivo.

Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem obtido resultados promissores utilizando Triton X-114 para remover endotoxinas presentes em meio de cultura de células de *E. coli* durante a produção de proteína recombinantes. De acordo com os resultados<sup>(46,47)</sup>, a partir de uma concentração inicial de endotoxinas da ordem de 10<sup>7</sup> UE/mL, a separação de fases usando Triton X-114 foi eficaz na remoção de endotoxinas na fase concentrada em micelas com valores de 95-98%. Tais resultados demonstram a aplicabilidade dos SMDFA como primeira etapa para a purificação de soluções contendo biomoléculas recombinantes expressas em *E. coli*, no entanto, as condições otimizadas ainda foram pouco investigadas e requerem mais estudos.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e a FAPESP pelo suporte financeiro.

### **REFERÊNCIAS**

- 1. Adam, O.; Vercellone, A.; Paul, F.; Monsan, P.F.; Puzo, G. (1995). A non-degradative route for the removal of endotoxin from exopolysaccharides. *Anal. Biochem.* 225, 321–327.
- 2. Aida, Y.; Pabst, M.J. (1990). Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J. Immunol. Methods* 132 (2), 191-195.
- 3. Albertsson, P.A. (1986) Partition of cell particles and macromolecules: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3.ed. New York, Chichester: Wiley-Interscience, p. 346.
- 4. Andrade, E.G.; Silva, M.S.C.; Haga, R.B.; Santos, V.C.; Pessoa Jr., A.; Rangel-Yagui, C.O. (2011). Extraction of clavulanic acid using aqueous two-phase micellar system. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 58 (2), 103-108.
- 5. Anspach, F.B. (2001). Endotoxin removal by affinity sorbents. *J. Biochem. Bioph. Meth.* 49, 661-681.
- 6. Anspach, F.B.; Hilbeck, O. (1995). Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J. Chromatogr. A.* 711, 81–92.
- 7. Aquino, L.C.L. (2004). Purificação de próinsulina humana recombinante com cauda de poli(histidina): cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados. Campinas, Brasil, (pH.D Thesis. Faculdade de Engenharia Química. Unicamp).
- 8. Bailey, S.M.; Meagher, M.M. (2000). Separation of soluble protein form inclusion bodies in Escherichia coli lysate using crossflow mi-

- crofiltration. J. Membrane Sci. 166, 137-146.
- 9. Baumgartner, J.D.; Glauser, M.P. (1993). Immunotherapy of endotoxemia and septicemia. *Immunobiology.* 187, 464–477, 1993.
- 10. Beutler, B.; Cerami, A. (1988). Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 505-518.
- 11. Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256, 1604-1607.
- 12. Cheng, H.T.; Huang, K.C.; Yu, H.Y.; Gao, K.J.; Zhao, X.; Li, F.; Town, J.; Gordon, J.R.; Cheng, J.W. (2008). A new protocol for high-yield purification of recombinant human CXCL8<sub>(3-72)</sub>K11R/G31P expressed in *Escherichia coli. Protein Expres. Purif.* 61, 65-72.
- 13. Chevalier, Y.; Zemb, T. (1990). The structure of micelles and microemulsions. *Rep. Prog. Phys.* 53, 279-371.
- 14. Cotton, M.; Baker, A.; Saltik, M.; Wagner, E.; Buschle, M. (1994). Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus. *Gene Ther.* 1, 239–246.
- 15. Daneshian, M.; Guenther, A.; Wendel, A.; Thomas, H.; Von-aulock, S. (2006). *In vitro* pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs. *J. Immunol. Methods.* 131, 169-175.
- 16. Darkow, R.; Groth, T.; Albrecht, W.; Lutzow, K.; Paul, D. (1999) Functionalized nanoparticles for endotoxin binding in aqueous solutions. *Biomaterials*. 20, 1277-1283.
- 17. Di Padova, F.E.; Brade, H.; Barclay, G.R.; Poxton, I.R.; Liehl, E.; Schuetze, E.; Kocher, H.P.; Ransay, G.; Schreier, M.H.; Mcclelland, D.B. (1993). A broadly cross-protective monoclonal antibody binding to *Escherichia coli* and *Salmonella lipopolysaccharides*. *Infect Immun*. 61 (9), 3863–3872.
- 18. Dias, R.; Mel'nikov, S.; Lindman, B.; Miguel, M.G. (2000). *DNAphase behavior in the presence of oppositely charged surfactants. Langmuir* v.16, p.9577–9583.
- 19. Dyr, J.E.; Suttnar, J. (1997). Separation used for purification of recombinant proteins. *J. Chromatogr. B.* 699, 383-401.
- 20. Erridge, C.; Bennett-Guerrero, E.; Poxton, I.R. (2002). Structure and function of lipopoly-saccharides. *Microbes Infect.* 4, 837-851.

- 21. Everberg, H.; Leiding, T.; Schioth, A.; Tjerneld, F.; Gustavsson, N. (2006). Efficient and non-denaturing membrane solubilization combined with enrichment of membrane protein complexes by detergent/polymer aqueous two-phase partitioning for proteome analysis. *J. Chromatogr. A.* 1122 (1/2), 35–46.
- 22. Fischbach, M.; Heinrich, E.; Desprez, P.; Duringer, R. (1994). Online dialysate filtration: a method of dialysate endotoxin removalor only reduction. *Nephron.* 66 (1), 117-118.
- 23. Gorbet, M.B.; Sefton, M.V. (2006). Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials*. 26, 6811-6817.
- 24. Hirayama, C.; Makata, M.; Morimoto, S.; Tachibe, H.; Ihara, H.; Ohkuma, L.; Miyachi, Y. (1995). The removal of endotoxins from protein solutions using column packings with aminated poly (γ-methyl L-glutamate) spheres. *Chromatographia*. 40, 33-38.
- 25. Hirayama, C.; Sakata, M. (2002). Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. *J. Chromatogr. B.* 781 (1/2), 419-432.
- 26. Hou, K.C.; Zaniewski, R. (1990). Depyrigenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge. *J. Parent. Sci. Techn.* 44, 204-209.
- 27. Israelachvili, J.N., ed. *Intermolecular* and surface forces. 2.ed. London: Academic, 1991. 450p.
- 28. Issekutz, A.C. (1983). Removal of Gramnegative endotoxin from solutions by affinity chromatography. *J. Immunol. Methods.* 61, 275-281.
- 29. Jensen, L.B.; Torp, A.M.; Andersen, S.B.; Skov, P.S.; Poulsen, L.K.; Knol, E.F.; Van Hoffen, E. (2008). The biological activity of a recombinantly expressed (His)6-tagged peanut allergen (rAra h 1) is unaffected by endotoxin removal. *J. Immunol. Methods.* 335, 116-120.
- 30. Johansson, H.O.; Lundh, G.; Karlstrom, G.; Tjerneld, F. (1996). Effect of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide copolymers. Biochim. Biophys. Acta. 1290, 289-298.
- 31. Johansson, H.O.; Persson, J.; Tjerneld, F. (1999). Thermoseparating water/polymer system: a novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. *Biotechnol. Bioeng.* 66, 247-257.

- 32. Jozala, A.F.; Lopes, A.M.; Mazzola, P.G.; Magalhães, P.O.; Vessoni Penna, T.C., Pessoa Jr., A. (2008). Liquid-liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems. *Enzyme Microb. Tech.* 42 (2), 107-112.
- 33. Kamei, D.T.; King, J.A.; Wang, D.I.C.; Blankschtein, D. (2002a). Separating lysozyme from bacteriophage P22 in two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnol. Bioeng.* 80 (2), 233-236.
- 34. Kamei, D.T.; King, J.A.; Wang, D.I.C.; Blankschtein, D. (2002b). Understanding viral partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar systems. 2. Effect of entrained micelle-poor domains. *Biotechnol. Bioeng.* 78 (2), 203-216.
- 35. Kang, Y.; Luo, R.G. (1998). Chromatographic removal of endotoxin from hemoglobin preparations: effects of solution conditions on endotoxin removal efficiency and protein recovery. *J. Chromatogr. A.* 809 (1/2),13-20.
- 36. Lam, H.; Kavoosi, M.; Haynes, C.A.; Wang, D.I.C.; Blankschtein, D. (2005). Affinity-enhanced protein partitioning in decyl β-D-glucopyranoside two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 381–392.
- 37. Lee, C.K.; Su, W.D. (1999). Nonionic surfactant-mediated affinity cloud point extraction of vancomycin. *Sep Sc Technol.* 3 (16), 3267-3277.
- 38. Lee, J.H. (2000). High level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 277, 575-580.
- 39. Lezin, G.; Kuehn, M.R.; Brunelli, L. (2011). Hofmeister Series Salts Enhance Purification of Plasmid DNA by Non-Ionic Detergents. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1873-1882.
- 40. Li, J.; Shang, G.; You, M.; Peng, S.; Wang, Z.; W.U, H.; Chen, G.Q. (2011). Endotoxin removing method based on lipopolysaccharide binding protein and polyhydroxyalkanoate binding protein PhaP. *Biomacromolecules*. *12*, 602-608.
- 41. Lin, M.F.; Williams, C.; Murray, M.V.; Ropp, P.A. (2005). Removal of lipopolysaccharides from protein-lipopolysaccharide complexes by nonflammable solvents. *J. Chromatogr. B.* 816 (1/2), 167-174.
- 42. Linder, M.B.; Qiao, M.; Laumen, F.; Selber, K.; Hyytiae, T.; Nakari-Setaelae, T.;

- Penttilae, M.E. (2004). Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems. *Biochemistry*. 43 (37), 11873–11882.
- 43. Liu, C.L.; Kamei, D.T.; King, J.A.; Wang, D.I.C.; Blankschtein, D. (1998). Separation of proteins and viruses using two-aqueous micellar systems. *J. Chromatogr. B.* 711 (1/2), 127-138.
- 44. Liu, C.L.; Nikas, Y.J.; Blankschtein, D. (1996). Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnol. Bioeng*, 52, 185-192.
- 45. Liu, S.; Tobias, R.; Mcclure, S.; Styba, G.; Shi, Q.; Jackowski, G. (1997). Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin. Biochem.* 30, 455–463.
- 46. Lopes, A.M.; Magalhães, P.O.; Mazzola, P.G.; Rangel-Yagui, C.O.; Carvalho, J.C.M.; Penna, T.C.V.; Pessoa-Jr A. (2010). LPS removal from an *E. coli* fermentation broth using aqueous two-phase micellar system. *Biotechnol. Progr.* 26, 1644-1653.
- 47. Lopes, A.M.; Magalhaes, P.O.; Mazzola, P.G.; Rangel-Yagui, C.O.; Carvalho, J.C.M.; Penna, T.C.V.; Pessoa-JR, A. (2011). Green fluorescent protein extraction and LPS removal from *E. coli* fermentation medium using aqueous two-phase micellar system. *Sep. Purif. Technol.* 81, 339-346.
- 48. Lopes, A.M.; Rangel-Yagui, C.O.; Pessoa-JR, A. (2008). Can affinity interactions Influence the partitioning of glucose-6-phosphate dehydrogenase in two-phase aqueous micellar systems? *Quim. Nova.* 31 (5), 998-1003.
- 49. Magalhães, P.O.; Lopes, A.M.; Mazzola, P.G.; Rangel-Yagui, C.O.; Penna, T.C.V.; Pessoa Jr., A. (2007). Methods of Endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10 (3), 271-287.
- 50. Matsumae, H.; Minobe, S.; Kindan, K.; Watanabe, T.; Sato, T.; Tosa, T. (1990). Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilized histidine. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 12 (2), 129-140.
- 51. Mayer, H.; Weckesser, J. (1984). 'Unusual' lipid A's: structures, taxonomical relevance and potential value for endotoxin research. In: RIETSCHEL, E.T., ed. Chemistry of endotoxin. Amsterdam: Elsevier Science, 221-247. (Handbook of endotoxin, v.1).
- 52. Mazzola, P.G.; Lam, H.; Kavoosi, 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 (5), 998–1004.
- 53. Mazzola, P.G.; Lopes, A.M.; Hasmann, F.A.; Jozala, A.F.; Penna, T.C.V.; Magalhaes, P.O.; Rangel-Yagui, C.O.; Pessoa-JR, A. (2008). Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *J. Chem. Technol. Biot.* 83, 143–157.
- 54. Mcneff, C.; Zhao, Q.; Almlof, E.; Flickinger, M.; Peter, W.C. (1999). The efficient removal of endotoxins from insulin using quaternized polyethyleneimine-coated porous zirconia. *Anal. Biochem.* 274, 181-187.
- 55. Mercaldi, M.P.; Dams-Kozlowska, H.; Panilaitis, B.; Joyce, A.P.; Kaplan, D.L. (2008). Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. *Biomacromolecules*, 9 (7), 1988-1996.
- 56. Michie, H.R.; Manogue, K.R.; Spriggs, D.R.; Revhaug, A.; O'Dwyer, S.; Dinarello, C.A.; Cerami, A.; Wolff, S.M.; Wilmore, D.W. (1988). Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *New Engl. J. Med.* 318, 1481-1486.
- 57. Minobe, S.; Sato, T.; Tosa, T.; Chibata, I. (1983). Characteristics of immobilized histamine for pyrogen adsorption. *J. Chromatogr.* 262, 193-198.
- 58. Minobe, S.; Watanabe, T.; Sato, T.; Tosa, T.; Chibata, I. (1982). Preparation of adsorbents for pyrogen adsorption. *J. Chromatogr. A.* 248, 401-408.
- 59. Minuth, T.; Thommes, 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 Bioc.* 23, 107.
- 60. Mitzner, S.; Schneidewind, J.; Falkenhagen, D.; Loth, F.; Klinkmann, H. (1993). Extracorporeal endotoxin removal by immobilized polyethylenimine. *Artif. Organs.* 17, 775–781.
- 61. Nagaki, M.; Hughis, R.D.; Kean, H.N.; Lau, J.Y.N.; Williams, R. (1992). *In vitro* plasma perfusion through adsorbents and plasma



- ultrafiltration to remove endotoxin and cytokines. Circ Shock. 38, 182-188.
- 62. Nikas, Y.J.; Liu, C.L.; Srivastava, T.; Abbott, N.L.; Blankschtein, D. (1992). Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. *Macromolecules*. 25, 4794-4806.
- 63. Ogikubo, Y.; Norimatsu, M.; Noda, K.; Takahashi, J.; Inotsume, M.; Tsuchiya, M.; Tamura, Y. (2004). Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines. *Biologicals*, 32, 88-93.
- 64. Ohno, N.; Morrison, D.C. (1989). Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J Biol. Chem.* 264, 4434–4441.
- 65. Park, J.H.; Szponar, B.; Larsson, L.; Gold, D.R.; Milton, D.K. (2004). Characterization of lipopolysaccharides present in settled house dust. *Appl. Environ. Microb.* 70, 262-267.
- 66. Petsch, D.; Anspach, F.B. (2000). Endotoxin removal from protein solutions. *J. Biotechnol.* 76, 97-119.
- 67. Piluso, L.G.; Martinez, M.Y. (1999). Resolving liposomal inhibition of quantitative LAL methods. *J. Pharm. Sci. Technol.* 53 (5), 260-263.
- 68. Pinto, T.J.A.; Kaneko, T.M.; Ohara, M.T. (2000). Pirogênio. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu, chapter 6, 167-200.
- Prista, L.N.; Alves, A.C.; Morgado, R. (1996). Tecnologia farmacêutica. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3, 2257p.
- 70. Puvvada, S.; Blankschtein, D. (1990). Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior, and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants approach. *J Chem Sci.* 92 (6), 3710-3724.
- 71. Pyo, S.H.; Lee, J.H.; Park, H.B.; Hong, S.S.; Kim, J.H. (2001). A large-scale purification of recombinant histone H1.5 from Escherichia coli. *Protein Expres Purif.* 23, 38–44.
- 72. Raetz, C.R.; Ulevitch, R.J.; Wright, S.D.; Sibley, C.H.; Ding, A.; Nathan, C.F. (1991). Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal

- transduction. FASEB J. 5 (12), 2652-2660.
- 73. Raetz, C.R.H. (1990). Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 59, 129–170.
- 74. 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 Bioen.* 82, 445-456.
- 75. Reichelt, P.; Schwarz, C.; Donzeau, M. (2006). Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. *Protein Expres Purif.* 46, 483-488.
- 76. Rietschel, E.T.; Kirikae, T.; Schade, F.U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H.; Ulmer, A.J.; Zahringer, U.; Seydel, U.; Di Padova, F. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8, 217-225.
- 77. Rodrigues, E.M.G.; Milagres, A.M.F.; Pessoa Jr., A. (1999a). Xylanase recovery: effect of extraction conditions on the AOT-reversed micellar systems using experimental design. *Process Biochem.* 34 (2), 121–125.
- 78. Rodrigues, E.M.G.; Pessoa-JR, A.; Milagres, A.M.F. (1999b). Screening of variables in xylanase recovery using BDBAC reversed micelles. *Appl Biochem Biotech.* 77, 779-788.
- 79. Rozkov, A.; Larsson, B.; Gillström, S.; Björnestedt, R.; Schmidt, S.R. (2008). Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture. Biotechnol Bioeng. 99 (3), 557-566.
- 80. Ryan, J. Endotoxins and cell culture. (2004). *In: CORNING LIFE SCIENCES*. 1-8. [*Technical Bulletin*].
- 81. Sakada, M.; Kawai, T.; Ohkuma, K.; Ihara, H.; Hirayama, C. (1993). Reduction of endotoxin contamination of various crude vaccine materials by Gram-negative bacteria using aminated poly(gamma-methyl L-glutamate) spherical particles. *Biol. Pharm. Bull.* 16, 1065-1068.
- 82. Santos, F.; Santos, A.G.; Biernat, J.C.; Souza, M.E.L.; Raubach, A.; Aguirre, A.; Antoniazzi, V.R.; Scorsatto, K.; Seibel, I.; Demin, S.S.; Hickmann, A.C.; Oliveira, F.P.; Borba, E.V.; Simon, S.; Santos, S.S. (2000). Detecção de endotoxina pelo teste do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) em unidades de hemodiálise. *Rev. Virt. Med.* 1.
- 83. Santos, V.C.; Hasmann, F.A.; Converti, A.;

- Pessoa JR., A. (2011). Liquid–liquid extraction by mixed micellar systems: A new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. *Biochem. Eng. J.* 56, 75-83.
- 84. Schädlich, L.; Senger, T.; Kirschning, C.J.; Müller, M.; Gissmann, L. (2009). Refining HPV 16 L1 purification from *E. coli*: reducing endotoxin contaminations and their impact on immunogenicity. *Vaccine*. 27, 1511-1522.
- 85. Schindler, R.; Dinarello, C.A. (1989). A method for removing interleukin-1 and tumor necrosis factor-inducing substances from bacterial cultures by ultrafiltration with polysulfone. *J. Immunol. Methods.* 116, 159-165.
- 86. Selber, K.; Tjerneld, F.; Collén, A.; Hyytiä, T.; Nakari-Setälä, T.; Bailey, M.; Fagerstrom, R.; Kan, J.; Van Der Laan, J.; Penttila, M.; Kula, M.-R. (2004). Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. *Process Biochem.* 39 (7), 889–896.
- 87. Sharma, S.K. (1986). Endotoxin detection and elimination in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 1, 5-22.
- 88. Shibatani, T.; Kakimoto, T.; Chibata, I. (1983). Purification of high molecular weight urokinase from human urine and comparative study of two active forms of urokinase. *Thromb. Haemostasis*. 49, (2), 91-95.
- 89. Sivars, U.; Abramson, J.; Iwata, S.; Tjerneld, F. (2000). Affinity partitioning of a poly(histidine)-tagged integral membrane protein, cytochrome  $bo_3$  ubiquinol oxidase, in a detergent-polymer aqueous two-phase system containing metal-chelating polymer. *J. Chromatogr. B.* 743 (1/2), 307-316.
- 90. Sivars, U.; Tjerneld, F. (2000). Mechanisms of phase behavior and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys Acta.* 1474, 133-146
- 91. Su, W.; Lin, L.; Lee, H.; Cho, M.; Choe, W.S.; Lee, Y. (2012). Determination of endotoxin through an aptamer-based impedance biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 32, 32-36.
- 92. Sweadner, K.J.; Forte, M.; Nelsen, L.L. (1977). Filtration removal of endotoxin (pyrogens) in solution in different states of aggregation. *Appl. Environ. Microb.* 34 (4), 382-385.
- 93. Takeda Chemicals 1988 European patent, EP211968.

- 94. Tanford, C. (1980). The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. 2.ed. New York: Wiley, 1980. 233p.
- 95. Teng, N.N.H.; Kaplan, H.S.; Hebert, J.M.; Moore, C.; Douglas, H.; Wunderlich, A.; Braude, A.I. (1985). Protection against Gramnegative bacteremia and endotoxemia with human monoclonal IgM antibodies. *P. Natl Acad. Sci. USA.* 82 (6), 1790–1794.
- 96. Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. (2000). *Microbiologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, cap.5, p.113-119.
- 97. Vaara, M.; Nurminen, M. (1999). Outer membrane permeability barrier in Escherichia coli mutants that are defective in the late acyltransferases of lipid A biosynthesis. *Antimicrob. Agents Ch.* 43, 1459-1462.

- 98. Van Roosmalen, D.; Dohmen-Speelmans, M.P.J.; Dietz, C.H.J.T.; Van Den Broeke, L.J.P.; Van Der Wielen, L.A.M.; Kuerentjes, J.T.F. (2006). Bioseparations in aqueous micellar systems based on excluded-volume interactions. *Food Bioprod. Process.* 86, 51–58.
- 99. Weary, M.; Pearson, F. (1988). A manufacturer's guide to depyrogenation. BioPharm, v.1, p.22-29.
- 100. Weber, C.; Henne, B.; Loth, F.; Schoenhofen, M.; Falkenhagen, D. (1995). Development of cationically modified cellulose adsorbents for the removal of endotoxins. *ASAIO J.* 41 (3), 430-434.
- 101. Xu, Y.; Souza, M.A.; Pontes, M.Z.R.; Vitolo, M.; Pessoa Jr., A. (2003). Liquid-liquid extraction of enzyme by affinity aqueous two-phase systems. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 46 (4), 741-750.

- 102. Zhang, M.; Zhang, L.; Cheng, L.H.; Xu, K.; Xu, Q.P.; Chen, H.L.; Lai, J.Y.; Tung, K.L. (2012). Extracorporeal endotoxin removal by novel I-serine grafted PVDF membrane Modules. *J. Membrane Sci.* 406, 104–112.
- 103. Ziegler, E.J.; Fisher Jr., C.J.; Sprung, C.L.; Straube, R.C.; Sadoff, J.C.; Foulke, G.E.; Wortel, C.H.; Fink, M.P.; Dellinger, R.P.; Teng, N.N. et al. (1991). Treatment of Gramnegative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. New Engl. J. Med. 324 (7), 429–436.
- 104. Zoeller, N.; Lue, L.; Blankschtein, D. (1997). Statistical-thermodynamic framework to model nonionic micellar solutions. *Langmuir*, v.13, n.20, p.5258-5275.

# Selo de Qualidade SBM Confiança na qualidade do produto

Em 2009 a Sociedade Brasileira de Microbiologia implantou o Selo de Qualidade SBM, com o objetivo de promover a certificação de produtos sanitariamente adequados quanto à presença de microrganismos. Em paralelo ao Selo, foi criado o Departamento de Avaliação de Produtos pela SBM, responsável pelas análises e pesquisas dos produtos, incluindo as embalagens e informações ao consumidor.

A certificação do produto começou a ser uma exigência do mercado e os fabricantes passaram a se preocupar mais em adequar sua produção e seus produtos dentro de parâmetros qualitativos e com preços competitivos. O programa de certificação da SBM visa certificar produtos quanto a sua qualidade microbiológica e/ou sua capacidade germicida.

O processo de certificação pela SBM segue um programa internacional, cujas diretrizes emanam da Organização Mundial de Saúde.

O primeiro produto a receber o Selo de Qualidade da SBM foi o Dettol® produzido pela empresa Reckitt-Benckiser nas formas de sabonete em barra, sabonete líquido e gel anti-séptico. Este selo foi concedido após avaliação de parecer técnico-específico emitido por especialistas indicados pela SBM.



### Como solicitar o Selo SBM

As empresas interessadas em encaminhar seus produtos para avaliação do programa de certificação da SBM devem:

- Enviar carta à Sociedade Brasileira de Microbiologia e solicitar que o produto, fabricado ou comercializado no Brasil seja analisado para receber o Selo de Qualidade SBM;
- Também é preciso enviar estudos já realizados sobre o produto, como análises, pesquisas e formulação, além de informações adicionais que houver;
  - Caso a comissão de avaliação achar necessário, novos testes em laboratórios credenciados poderão ser solicitados.

### Vigência é de 24 meses

Depois do envio deste material, o SBM firma com a empresa solicitante um protocolo de pesquisa, informando os objetivos, procedimentos e tempo de estudo. A realização dos ensaios dura entre 30 a 90 dias e todas as análises realizadas, materiais e equipamentos utilizados obedecem a normas específicas para cada produto. Sendo o produto aprovado, deverá a Empresa assinar um Contrato que rege todos os pontos do relacionamento com a SBM, passando a efetuar um pagamento mensal pela utilização da marca. Este valor mensal também é definido conforme o resultado da análise do Questionário de Perfil da Empresa.

Para tornar possível mais essa atividade da SBM, foi realizado um convênio de parceria com empresa tradicional em proficiência, a Controllab.

Para obtenção de maiores esclarecimentos entre em contato com: sbm@sbmicrobiologia.org.br

# MICROBIOLOGIA In foco

# SBM IN FOCO - A forma direta de falar com os microbiologistas.





Apresentamos o plano de comercialização para 1 ou 4 edição (ões) da Revista Microbiologia in Foco.

Periódico da Sociedade Brasileira de Microbiologia, com tiragem de 2000 exemplares e distribuição gratuita. Revista de informação e divulgação sobre temas em bacteriologia, micologia e virologia nas várias áreas de abrangência da Microbiologia: ambiental, agrícola, básica, de alimentos, industrial, médica humana e veterinária e oral.

A revista ainda conta com espaços para divulgação de consensos, agenda científica, atualidades e oportunidades de trabalho.

Venha fazer parte deste veículo de informação atualizada!

Atenciosamente.

Marina Baquerizo Martinez e Carlos P. Taborda - Editores Sociedade Brasileira de Microbiologia

### VALORES:

Capa Final Interna	1 edição R\$ 2.000,00	4 edições - R\$ 4.000,00 cada
Capa Final Externa	1 edição R\$ 2.500,00	4 edições – R\$ 5.200,00 cada
½ página (par)	1 edição R\$ 1.000,00	4 edições – R\$ 1.600,00 cada
Página Inteira (par)	1 edição R\$ 1.850,00	4 edições – R\$ 3.600,00 cada
½ página (impar)	1 edição R\$ 1.350,00	4 edições – R\$ 2.400,00 cada
Página Inteira (impar)	1 edição R\$ 2.150,00	4 edições – R\$ 4.400,00 cada

FORMA DE PAGAMENTO: 15 dias após a edição da Revista, através de boleto bancário com recibo oficial.

> página inteira 21 x 28 cm



Para anunciar entre em contato com Jair Cagnotto: E-mail: financeiro@sbmicrobiologia.org.br

Telefone: (11) 3813-9647 ou 3037-7095



## Agenda in Foco



Início das inscrições e submissão dos resumos 04 de fevereiro de 2013

www.sbmicrobiologia.org.br/27cbm

### **Prezados Colegas Microbiologistas**

É com enorme satisfação que informamos que o 27° Congresso Brasileiro de Microbiologia, organizado pela Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM) será realizado no período de 29 de setembro a 03 de Outubro de 2013, no Centro de Convenções de Nata, na cidade de Natal, Rio Grande do Norte. Estamos trabalhando para elaborar um evento de alto nível científico e planejamos oferecer uma programação científica atrativa que abordará temas relevantes e atuais para que você se sinta estimulado a participar. Comece a se preparar para participar deste congresso que está sendo formatado pensando em oferecer, com conforto e qualidade, ciência de alto nível e a oportunidade de aproveitar tudo de bom o que a cidade de Natal e região têm a oferecer. Estamos certos de que o 27° CBM será um sucesso.

Esperamos encontrá-los para compartilhar novos conhecimentos.

Um abraço, Adalberto Pessoa Junior Presidente - SBM



# **ESPECIALIZAÇÃO**

Realização Inscrição Carga horária Fevereiro/2013 a Dezembro/2014 Novembro/2012 a Janeiro/2013

904h compostas por 504 h presenciais, 200h de monografia e 200h de estudo dirigido.

# Especialização em Microbiologia Clínica

Propósito principal

diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas.

Publico alvo

graduados da área de saúde, biologia e profissionais atuantes em microbiologia médica.

# Especialização em Microbiologia Ambiental / Industrial

Propósito principal

utilização de microrganismos para geração de produtos de interesse comercial.

**Publico alvo** 

microbiologistas atuantes na área ambiental/industrial

# Especialização em Microbiologia de Alimentos

Propósito principal

origem e estabelecimento da microbiota de alimentos cárneos. Jácteos e vegetais.

Publico alvo

graduados da área da saúde, em biologia, veterinária, engenheiros de alimentos e microbiologistas atuantes na área de alimentos.

**Local e Data** 

Quinzenalmente às sextas-feiras (19-23h) e aos sábados (9-18h) Universidade São Paulo – Campus Butantã Informações

Coordenação Pedagógica da SBM cursos@sbmicrobiologia.org.br +55 11 3037-7095

www.sbmicrobiologia.org.br - link "cursos"

# SBI SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

# **APERFEIÇOAMENTO**

Realização Inscrição Carga horária Fevereiro/2013 a Dezembro/2013 Novembro/2012 a Janeiro/2013 252h presenciais + 200h de estudo dirigido

# Aperfeiçoamento em Microbiologia Clínica

Propósito principal

diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas.

**Publico alvo** 

graduados da área de saúde, biologia e profissionais

# Aperfeiçoamento em Microbiologia Ambiental / Industrial

Propósito principal

utilização de microrganismos para geração de produtos de interesse comercial.

Publico alvo

microbiologistas atuantes na área ambiental/industrial

# Aperfeiçoamento em Microbiologia de Alimentos

Propósito principal

origem e estabelecimento da microbiota de alimentos cárneos, lácteos e vegetais.

Publico alvo

graduados da área da saúde, em biologia, veterinária, engenheiros de alimentos e microbiologistas atuantes na área de alimentos.

Local e Data

Quinzenalmente às sextas-feiras (19-23h) e aos sábados (9-18h) Universidade São Paulo – Campus Butantã Informações

Coordenação Pedagógica da SBM cursos@sbmicrobiologia.org.br +55 11 3037-7095 www.sbmicrobiologia.org.br – link"cursos"



# FIQUE SÓCIO

Os sócios da SBM têm direito a descontos especiais nos eventos promovidos ou patrocinados pela SBM. Para usufruir do desconto de associado em nossas atividades é imprescindivel estar anuente a dois anos consecutivos com a sociedade. Além disso, têm acesso livre à revista científica *Brazilian Journal of Microbiology* (BJM) e que se destina à publicação de trabalhos de pesquisa originais, notas breves e revisões, envolvendo todos os aspectos da Microbiologia. É considerada uma das revistas científicas mais importantes do nosso país. O BJM tem uma política muito severa de avaliação dos trabalhos submetidos à publicação, sendo cada manuscrito avaliado por pelo menos dois revisores criteriosamente selecionados.

A revista *Microbiologia in Foco* tem o objetivo de promover o intercâmbio de informações científicas entre os associados, publicando os autores nacionais de expressão. Adota o mesmo critério de avaliação e excelência que a SBM sempre adotou. Enviaremos o último número da Microbiologia in Foco a todos os novos associados, após sua efetiva associação.

### Figue sócio da SBM.

Veja informações no site: www.sbmicrobiologia.org.br

Lembre-se: um sócio da SBM integra a maior e mais representativa associação da comunidade científica que atua na microbiologia nacional.

### Valores para associação

Categoria de Sócio	. Anuida	ide 2012
Aluno de Graduação	R\$	85,00
Aluno de Pós-Graduação (Mestrado e Doutorado)	)R\$	135,00
Aluno de Pós-Doutorado	R\$	165,00
Profissional	R\$	195,00
Assinatura Jurídica	R\$	355,00

# **Diretoria**

Biênio 2012-2013 SBM 2012-2013

### **Presidente**

Adalberto Pessoa Junior, USP-SP

### Vice Presidente

Alexandre Soares Rosado, UFRJ-RJ

### 1º Secretário

Carla Taddei de Castro Neves, USP-SP

### 2º Secretário

Lauro Santos Filho, UFPB-PB

### 1º Tesoureiro

Carlos Pelleschi Taborda, USP-SP

### 2º Tesoureiro

Maria Cristina Dantas Vanetti, UFV-MG

### Conselho Fiscal

Bernadette D.G.M. Franco, USP-SP Sergio E. L. Fracalanza, UFRJ-RJ Agnes Marie Sá Figueiredo, UFRJ-RJ

# Representantes de Área

SBM 2012-2013

### Coleções de Cultura

Manuela da Silva, Fiocruz/RJ Carlos Augusto Rosa – UFMG/MG

### **Ensino**

Karla Tereza Silva Ribeiro – UFPA/PA Marcela Pelegrine Peçanha – PUC/SP; UNISO

### Infecção Hospitalar

Ana Lúcia Darini – USP/RP Afonso Luis Barth – UFRGS/RS

### Microbiologia de Alimentos

Bernadete G. Franco – USP/SP Ricardo Souza Dias – FUNED/MG/Metodista de Minas

### Microbiologia Ambiental

Vivian Pelizari – USP/SP Raquel Peixoto – UFRJ/RJ

### Microbiologia Clínica

Elizabeth de Andrade Marques – UERJ/RJ Marina Baguerizo Martinez – FCF/USP

### Microbiologia Industrial

Luiz Henrique Guimarães – USP/Ribeirão Preto Eleni Gomes – UNESP/Rio Preto

### Microbiologia Médica

Leila Carvalho Campos – Fiocruz/BA Tânia Aparecida T. Gomes do Amaral – UNIFESP/SP

### Micologia

Célia Maria de Almeida Soares – UFG/GO Marcio Rodrigues – UFRJ/RJ

### **Micotoxinas**

Marta Taniwaki – ITAL/SP Adriana de Almeida Palma – ITAL/SP

### Parasito-Hospedeiro

Sandro R. de Almeida – USP/SP Dario Simões Zamboni – USP/RP

### Microbiologia do Solo

Itamar Soares de Melo – Embrapa/SP Vânia Maria Maciel Melo – UFC/CE

### Microbiologia Veterinária

Rinaldo Aparecido Mota – UFRPE/PE Odir Antônio Dellagostin – UFPel/RS

### Virologia

Flávio Guimarães da Fonseca – UFMG/MG Luciana Barros de Arruda – UFRJ/RJ

### Genética de Microrganismos e Bioinformática

Artur Silva – UFPA/PA Gustavo Goldman – USP/SP