

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

ISABELE DE PAULA ASSIS

***DOWNSTREAM* DE BIOMOLÉCULAS DE ALTO VALOR AGREGADO:
ENZIMAS AMIOLÍTICAS E ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS**

**LORENA
2014**

ISABELE DE PAULA ASSIS

***DOWNSTREAM* DE BIOMOLÉCULAS DE ALTO VALOR AGREGADO:
ENZIMAS AMIOLÍTICAS E ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Bruno Soares Forte

**LORENA
2014**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Assis, Isabele de Paula
Downstream de biomoléculas de alto valor
agregado: Enzimas amilolíticas e antibióticos beta
lactâmicos / Isabele de Paula Assis; orientador
Marcus Bruno Soares Forte. - Lorena, 2014.
45 p.

Monografia apresentada como requisito parcial
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia
Bioquímica - Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo. 2014
Orientador: Marcus Bruno Soares Forte

1. Biotecnologia e bioprocessos. 2. Purificação de
biomoléculas. 3. Enzimas amilolíticas. 4. Antibióticos
beta-lactâmicos. 5. Downstream. I. Título. II. Forte,
Marcus Bruno Soares, orient.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO
DE CONCLUSÃO DE CURSO DA ALUNA ISABELE DE PAULA ASSIS
ORIENTADO PELO PROF. DR. MARCUS BRUNO SOARES FORTE.



ASSINATURA DO ORIENTADOR

LORENA
2014

Dedicatória

Aos meus pais Odair e Marisa e à minha avó Yolanda.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço imensamente aos meus pais Odair e Marisa, por todo apoio desde a infância até os dias de hoje, e ao incentivo incansável ao meu estudo e conseqüente desenvolvimento escolar.

Também quero agradecer ao carinho, apoio e cuidado de minha avó Yolanda, que como uma segunda mãe para mim sempre esteve ao meu lado e me apoiou durante toda a minha vida.

Aos meus tios Alaíde e Antônio pelo enorme suporte e cuidado desde o início da faculdade, pois graças a esse apoio que pude me estabelecer e iniciar minha vida em Lorena e na Universidade.

A meu irmão, avós, tias, primos e primas pelo apoio e carinho em todos os momentos da minha vida.

As minhas amigas e amigos pelo enorme apoio e amizade que me ajudaram com os estudos, com as emoções e que estiveram comigo em inúmeros momentos durante a faculdade, momentos parte da minha história de vida.

Às colegas de república, que se tornaram ao longo dos anos amigas e uma família em Lorena, me deram apoio, suporte e que estiveram comigo em momentos de felicidade, tristeza, estress e comemorações. Momentos estes que levarei sempre comigo.

Ao meu professor orientador pelo suporte e paciência durante todo esse trabalho, que não foi fácil nem curto, mas que sua presença nele foi essencial.

E por fim a Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo e todos seus funcionários. Aos professores pelo aprendizado, ao DTA, Biblioteca, CG e secretarias pelo apoio, aos funcionários que mantêm a escola limpa e segura. E a todos aqueles que nos conscientizaram de diferentes realidades, com contatos de projetos voluntários e o contato com os trabalhos feito aos animais que precisam da nossa ajuda dentro e fora do campus.

RESUMO

ASSIS, I.P. **Downstream de biomoléculas de alto valor agregado: enzimas amilolíticas e antibióticos β -lactâmicos**. 2014. 45 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

Este trabalho teve como enfoque o estudo de métodos de purificação de enzimas amilolíticas e de antibióticos β -lactâmicos. Primeiramente introduz-se o conceito de biotecnologia e a sua abrangência dentro e fora da indústria, de bioprocessos envolvendo fermentação e suas etapas (*upstream*, fermentação e *downstream*) e de bioprodutos, sua classificação, a importância da sua localização ao final da fermentação (intra ou extracelular) e suas propriedades. *Downstream* é a etapa em que os principais métodos são aplicados para as fases de separação e purificação da molécula-alvo, contemplando processos de clarificação, rompimento celular (quando aplicado), purificação de baixa resolução e de alta resolução, e tratamentos finais. Essas informações foram destacadas para mostrar que o método, ou combinação de métodos, de purificação adequado a ser escolhido deve visar à obtenção do produto da maneira mais pura possível, e ao mesmo tempo garantir que a sua atividade biológica não seja alterada neste processo. A etapa final desse estudo dirigiu-se para a aplicação dos métodos apresentados em experimentos, estes baseados em trabalhos publicados por pesquisadores em artigos, *reviews*, teses e livros. O estudo baseou-se em experimentos antigos e recentes, mostrando a evolução desses estudos aplicada no processamento de bioprodutos de interesse.

Palavras-chave: Bioprodutos, *Downstream*, enzimas amilolíticas, antibióticos β -lactâmicos, purificação.

ABSTRACT

ASSIS, I.P. **Downstream of biomolecules of high added value: amylolytic enzymes and β -lactam antibiotics.** 2014. 45 p. Conclusion of course work Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

The focus of this work is the study of the purification methods for amylolytic enzymes and β -lactam antibiotics. First introduces the concept of biotechnology and its range inside and outside the industry, of bioprocess involving fermentation process and its steps (upstream, fermentation and downstream) and of bioproducts and its classifications, including the importance of its location at the end of the fermentation (intra or extracellular) and its properties. These informations are very important for the selection of the most appropriate purification methods and its combination. Downstream is the step in which the main methods or purification will be applied for the separation and purification of the molecule of interest, contemplating process of clarification, cell disruption (when applied), low resolution purification and high resolution purification, and final treatments. The appropriate methods are chosen aiming the most pure product obtained, and at the same time guaranteeing its biological activity isn't affected. The last step of this work headed for experimental methods applied by researchers that published articles, reviews, thesis and books. This study was based on old and recent experiments showing the evolution of these studies applied on bioproducts of interest processes.

Key words: Bioproducts, *Downstream*, *amylolytic enzymes*, *beta lactam antibiotics*, *purification*.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
SUMÁRIO	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 METODOLOGIA	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 DOWNSTREAM.....	15
3.1.1 CLARIFICAÇÃO	17
3.1.2 ROMPIMENTO DE CÉLULAS	20
3.1.3 PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO	21
3.1.4 PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO: CROMATOGRAFIA	23
3.1.5 TRATAMENTOS FINAIS.....	26
3.2 ANTIBIÓTICOS.....	28
3.2.1 ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS	29
3.2.2 PURIFICAÇÃO DOS β -LACTÂMICOS	31
3.3 ENZIMAS	32
3.3.1 INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA: ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	35
3.3.2 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS	37
4 CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS	41
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

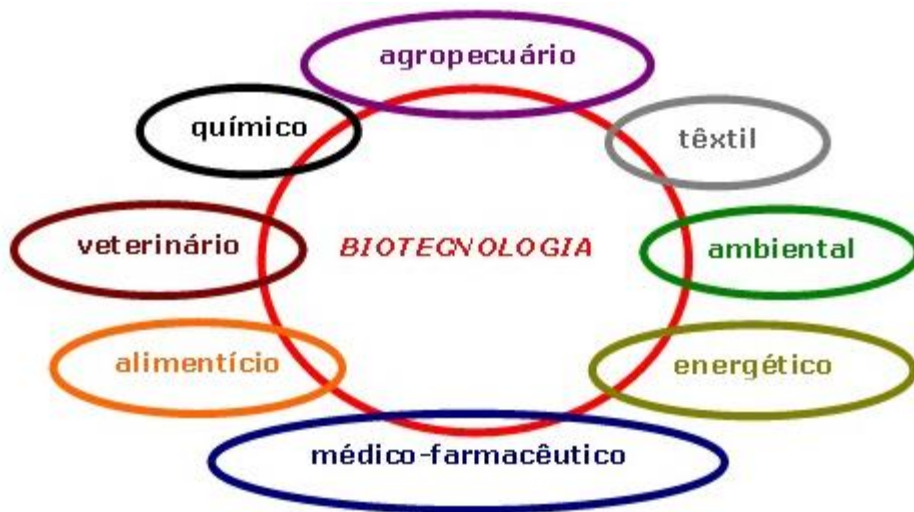
Ao falar de Biotecnologia podemos abranger o uso de células ou sistemas bioquímicos em processos, com a finalidade de se obter um produto de interesse. Conforme ilustrado na Figura 1, trata-se de uma área extensa, presente tanto em pesquisas quanto em indústrias dentro de variados processos. Nestes processos, diferentes micro-organismos podem ser utilizados, para produção de bens de interesse comercial, entre eles podemos citar: antibióticos, ácidos orgânicos, solventes, enzimas, biocombustíveis e biopesticidas.

Processos que envolvem o uso de micro-organismos, também chamados agentes biológicos, para a síntese de um produto de interesse via fermentação podem ser denominados Bioprocessos. Sendo assim, seus produtos são denominados bioprodutos, podendo eles ser metabólitos primários dessa via fermentativa ou secundários. Os metabólitos primários são resultados diretos do metabolismo do organismo, e os secundários podem ser resultado do mecanismo de defesa do organismo ou até mesmo produtos secundários da biotransformação.

Os micro-organismos empregados em bioprocessos podem ser naturalmente ocorrentes ou recombinantes, envolvendo no processo células animais e/ou vegetais e, por serem conduzidos por agentes biológicos, as transformações são catalisadas por enzimas (PEREIRA *et al.*, 2008). Sendo assim, os bioprodutos podem ser encontrados nas diversas áreas industriais, por exemplo: indústria farmacêutica (antibióticos, vacinas, vitaminas, entre outros), alimentícia (aminoácidos, flavorizantes, entre outros), química (etanol, ácido lático, biopesticidas, entre outros) e inclusive na produção enzimas que podem ser aplicadas em diversos segmentos industriais.

Basicamente um bioprocessos pode ser dividido em três etapas: a que antecede a fermentação (*upstream*) e conta com o preparo do meio para que esta ocorra, seguida da etapa de fermentação e com o fim desta, segue-se para a etapa de purificação (*downstream*) do produto final formado (PEREIRA *et al.*, 2008).

Figura 1: Biotecnologia abrangendo diversas áreas industriais (PEREIRA *et al.*, 2008).



Na etapa de *downstream* o objetivo é conferir ao produto final maior pureza possível, para isso precisa levar em conta as propriedades do produto formado, tais como seu tamanho molecular, sua concentração, solubilidade, polaridade, volatilidade dentre outras, e também a sua localização final (no interior do micro-organismo ou no meio fermentado). Outros aspectos relevantes são as propriedades físico-químicas do meio de fermentação, tais como viscosidade, densidade, impurezas, subprodutos, dentre outros. Finalmente, a escolha das operações de purificação dependerá do tamanho do bioprocessamento em estudo e do seu valor agregado, visando que ocorram em sequência e atinjam o grau de pureza e forma final requeridos.

A diversidade e crescente importância apresentada pelos produtos tecnológicos incentivaram o desenvolvimento de vários processos de *downstream* (KILIKAN E PESSOA JR., 2001). Dentre os diversos bioprodutos, destacam-se: i) os antibióticos, que apresentam aplicação tanto para a área de contato direto com os seres vivos (humanos, animais e plantas) podendo ser aplicados como medicamentos, controle de contaminação em processos fermentativos, como defensivos agroquímicos entre outros, com a intensão de conter a disseminação de outros micro-organismos; ii) enzimas, que são consideradas biocatalisadores que, devido sua estrutura química, apresentam maior especificidade em uma reação química e por isso tem sido exploradas

em diversos ramos da indústria, como uma otimização de processo (WAGNER E MENEZES, 2013; AGEITEC, 2007; SATO, 2001).

Por esse motivo, este trabalho apresenta, através de uma pesquisa bibliográfica, um estudo sobre os métodos de *downstream* mais aplicados para purificação de importantes biomoléculas da indústria biotecnológica. Como estudo de caso escolheu-se duas moléculas de alto valor agregado: antibióticos β -lactâmicos e enzimas amilolíticas, que constituem duas classes de biomoléculas de grande importância para a indústria farmacêutica e alimentícia, respectivamente.

2 METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho compõe-se de pesquisas de artigos, *reviews*, teses, livros e materiais didáticos que abordam os temas aqui estudados.

Diversas ferramentas de busca com o uso de filtros de pesquisa, segundo metodologias transmitidas ao longo da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), direcionando a publicações e livros ligados ao assunto de pesquisa de cada trabalho. Instrução também foi dada dos diversos sites de pesquisas, os quais o acesso é concedido pela Universidade de São Paulo através dos computadores da instituição ou pelo acesso no próprio computador fazendo uso do sistema VPN.

A pesquisa bibliográfica foi feita através de livros e teses (impressos e digitais) assim como de artigos (de pesquisa e de revisão) por meio de buscas em sites de pesquisa, tais como Web of Knowledge, Scopus, Scielo, Google Scholar, fazendo-se uso de filtros de pesquisa, através das palavras chave: *Purification, bioprocess, enzymes, amylolytics enzymes, antibiotics, beta lactamics antibiotics, downstrem processing, downstream methods, purification methods.*

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um bioprocesso pode ser entendido como um processo com reações sendo controladas por agentes biológicos, como por exemplo micro-organismos e enzimas, podendo ser dividido basicamente em três etapas: *upstream*, fermentação e *downstream* conforme descrito a seguir (SCHMIDELL *et.al*, 2001; PEREIRA JR. *et al.*, 2008):

- *Upstream* – prepara-se o substrato, se necessário são feitas hidrólises ou outros tratamentos químicos para liberação do substrato a ser fermentado. Em seguida ele deve ser solubilizado em meio adequado, geralmente em água, adequando ele a etapa seguinte. É feito ajuste de parâmetros como pH, temperatura, pressão, necessidade de aeração e agitação, entre outros. O reator adequado a ser utilizado e seu tamanho. Ao final desta etapa acontece a inoculação do micro-organismo.

- Fermentação: biotransformação propriamente dita, inicialmente ocorre crescimento celular e na sequência também são necessários controles dos parâmetros estabelecidos no *upstream*, bem como controle de substrato fornecido e quantidade de produto que está sendo produzido. Precisa-se verificar se a biomolécula que está sendo produzida precisa ser retirada, para que em excesso não intoxique o micro-organismo, ou se as células estão viáveis ao processo. Fatores como esses influenciam na escolha do processo fermentativo mais adequado para a produção da biomolécula de interesse, eles podem ser em estado líquido (fermentação submersa) ou em estado sólido (fermentação semi-sólida). Enquanto o sistema operante pode ocorrer por batelada, simples ou alimentada (para fermentação submersa), ou por sistema contínuo.

- *Downstream*: Com o final da fermentação e tendo-se atingido a quantidade de produto de interesse, segue-se para esta parte que consiste na recuperação, caracterização e purificação do mesmo. É composto por diversas etapas, cada uma com sua finalidade e com suas operações unitárias.

É importante o conhecimento dos mecanismos de controle de cada etapa de separação, pois uma vez conhecidos os métodos mais adequados

podem ser escolhidos. E assim, é possível combinar os passos para que a purificação tenha a melhor combinação de preço em um razoável período de tempo (KEIM E LADISCH, 2000).

3.1 DOWNSTREAM

Finalizada a fermentação, o meio ainda não está pronto para ser comercializado, o produto precisa ser separado e purificado. Nele podem conter além do produto de interesse e dos micro-organismos fermentadores, subprodutos da fermentação, fragmentos celulares, células mortas, sais, carboidratos, lipídeos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos entre outros, provenientes da fermentação ou de nutrientes adicionados na etapa de *upstream*. Conta-se ainda com a capacidade dos subprodutos de deteriorarem o meio fermentado e o produto de interesse (KILIKAN E PESSOA JR., 2001).

Diversas operações unitárias podem ser empregadas, com a finalidade de remover os compostos interferentes do fermentado isolando a molécula de interesse. A escolha adequada depende primeiramente de suas propriedades físico-químicas, sendo mais comumente envolvidas em processos de separação por tamanho, forma, densidades, solubilidade, carga eletrostática, entre outras (KILIKAN E PESSOA JR., 2001).

É também importante conhecer os aspectos citológicos e fisiológicos do micro-organismo, pois tendo esse conhecimento é possível saber a localização final do produto, que pode ser extracelular ou intracelular. Se estiver no meio intracelular, será necessário adicionar uma etapa extra ao *downstream* na qual será feito o rompimento celular. É importante saber a composição da biomolécula formada para que a escolha das técnicas de rompimento seja adequada para liberá-la sem danificá-la. Já se a mesma estiver no meio extracelular, as etapas de recuperação incluirão apenas as etapas tradicionais. (PEREIRA *et al.*, 2008)

Vale ressaltar que como o processo de purificação está diretamente ligado com o valor agregado do produto final, alguns processos precisam ser de baixo custo bem como outros são de alto custo e por isso exigem processos

mais sofisticados. Com a grande diversidade de produtos da indústria biotecnológica, não há processos de purificação de aplicação geral.

Como o meio fermentativo é complexo, o critério de qualidade dessa etapa precisa ser específico, técnicas primárias de recuperação são aplicadas tipicamente em um esquema de purificação antes das técnicas de alta resolução. Além dos esquemas combinarem diferentes operações baseando-se nas diferenças físicas e químicas que os componentes desse meio podem apresentar (HAMEL *et al.*, 1988).

Esse conjunto de processos pode ser dividido em etapas principais gerais descritas a seguir (KILIKAN E PESSOA JR., 2001), enquanto as operações unitárias que podem ser aplicadas em cada, respectivamente, estão descritas na Tabela 1:

- a. Clarificação: Processo de separação das células suspensas e fragmentos celulares do meio de cultivo fermentado. O meio isento de células é denominado então clarificado ou filtrado. Nessa etapa, os processos de separação por filtração e por centrifugação são os mais utilizados em escala industrial.
- b. Rompimento de células: Para processos em que a molécula de interesse é um produto intracelular, essa etapa é adicionada logo após à clarificação e tem como finalidade romper as células envolvidas.
- c. Purificação de baixa resolução: Na sequência da clarificação, é uma etapa na qual é feita concentração/purificação da molécula de interesse do meio clarificado, separando-as das moléculas com características físico-químicas significativamente diferentes.
- d. Purificação de alta resolução: Fase em que ocorre efetivamente a separação da molécula de interesse das demais que apresentam algumas características físico-químicas semelhantes;
- e. Tratamentos finais: Fase em que faz-se uso de processos para estabilizar e adequar o volume, com a finalidade de adequar o acondicionamento do produto final.

A escolha das operações unitárias a serem utilizadas para determinado processo de purificação depende da finalidade da molécula de interesse, de suas características próprias, da sua aplicação e do seu valor agregado.

Tabela 1: Operações unitárias em escala de produção industrial (KILIKAN E PESSOA JR., 2001).

Etapa do processo	Operações Unitárias
Clarificação	Filtração convencional; centrifugação; filtração tangencial; floculação
Rompimento de células	Homogeneização; moagem em moinho de bolas; rompimento químico ou enzimático
Purificação de baixa resolução	Precipitação; ultrafiltração; extração em sistemas de duas fases líquidas
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica, de afinidade (biológica ou química), de fase reversa e de exclusão molecular
Tratamentos finais	Cristalização; liofilização; secagem

3.1.1 CLARIFICAÇÃO

Tem-se como objetivo separar as células suspensas de um meio de cultivo, onde houve a fermentação. A finalidade é separar o sobrenadante composto da molécula de interesse e subprodutos da fermentação, que após essa fase passa se chamar clarificado ou filtrado (WAGNER E MENEZES, 2013).

I. FILTRAÇÃO

Este processo tem como finalidade separar sólidos dispersos ou suspensos do meio líquido. Geralmente aplicado em processos que é necessário clarificar grandes volumes de meio fermentado, em que o produto de interesse está no meio extracelular e certa assepsia não é necessária (KILIKAN E PESSOA JR., 2001).

O meio líquido é, sob pressão, direcionado perpendicularmente a um meio filtrante. O volume capaz de atravessá-lo é denominado filtrado e o material residual sobre o filtro é denominado “torta de filtração” (WAGNER E MENEZES, 2013; KILIKAN E PESSOA JR., 2001).

É comum utilizar agentes para facilitar a filtração, sendo eles adicionados à suspensão inicial ou depositados em uma camada fina sobre o meio filtrante reduzindo a compressibilidade da torta e evitando entupimento do filtro. Uma limitação aparece quando o agente adicionado não pode ser recuperado no final do processo, e outra quando a molécula de interesse está no meio intracelular. Para uma seleção dos agentes adequados são realizados ensaios simples, nos quais concentrações conhecidas são colocadas em frascos contendo igual volume da suspensão a ser filtrada (WAGNER E MENEZES, 2013).

O filtro mais utilizado para essa etapa é o FRV – Filtro rotativo a vácuo (KILIKAN E PESSOA JR., 2001). Os filtros podem ser classificados em abertos ou fechados. Sendo os abertos os de placa e quadro, mais comumente aplicados, são de fácil construção, resistentes e economicamente viáveis. Possuem uma área filtrante grande e permitem trabalhar em altas pressões e são de fácil manutenção. Contudo é um trabalho vagaroso e demanda uso de grande mão de obra e quando precisa-se extrair o produto de interesse da torta de filtração ele demanda excessiva desidratação. Já os fechados possuem placas tanto horizontais como verticais, são de difícil manuseio sendo aplicados em separação de células patogênicas e em volumes pequenos de suspensão (Wagner e Menezes, 2013).

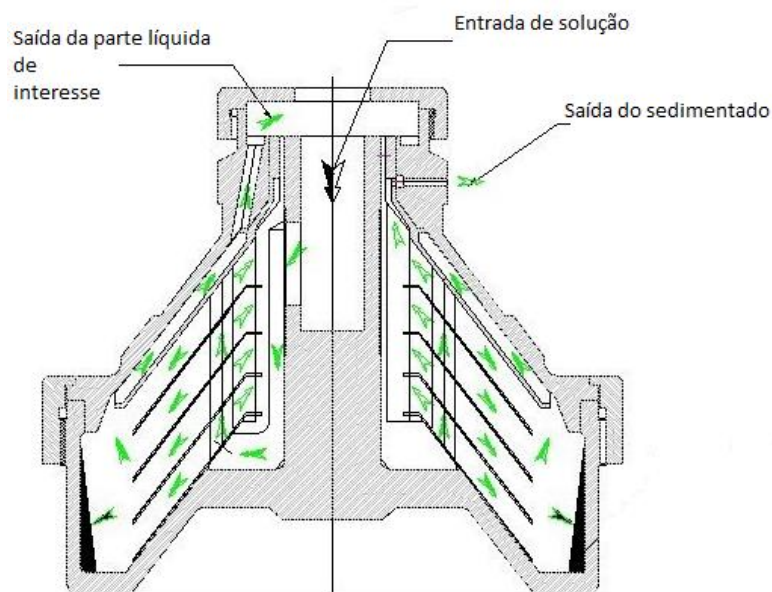
II. **CENTRIFUGAÇÃO**

Esse método de separação consiste em acelerar o processo tradicional de sedimentação (KILIKAN E PESSOA JR., 2001), com o auxílio da ação de um campo gravitacional centrífugo (WAGNER E MENEZES, 2013). Suspensões celulares que são intolerantes à adição de auxiliares de filtração ou também os que exigem alta assepsia devem ser clarificados por centrifugação (KILIKAN E PESSOA JR., 2001).

A velocidade de sedimentação das células microbianas sob ação da gravidade depende da diferença entre a densidade das células em questão e o meio líquido, da força motriz caracterizada pela ação da gravidade ($9,8 \text{ m/s}^2$) e do diâmetro da célula microbiana (WAGNER E MENEZES, 2013). Quando as densidades apresentarem valores próximos, esse processo pode-se tornar lento. A centrifugação tornou-se uma técnica amplamente aplicável na separação de células e partículas, por atuar no centro de gravidade das moléculas, facilitando a separação e diminuindo o tempo deste processo (WAGNER E MENEZES, 2013).

É comum o uso de centrífugas de disco (Figura 2) e de centrífugas tubulares (Figura 3). As tubulares podem trabalhar a rotações bem elevadas e ainda com refrigeração, contudo trabalham com quantidades limitadas (no máximo 30g/L) e no modo descontínuo.

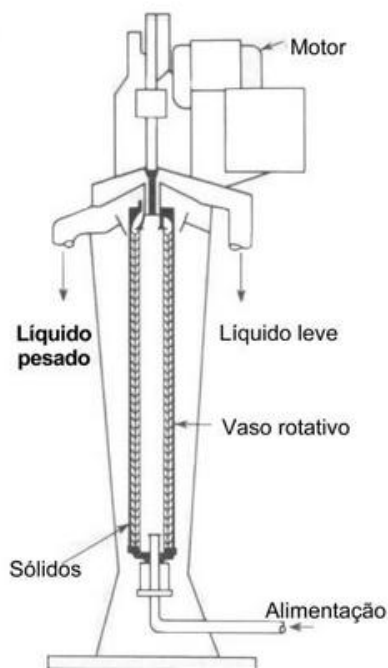
Figura 2: Esquema de funcionamento de uma centrífuga de discos (ALIBABA, 2014).



Enquanto as centrífugas de disco são mais aplicadas em separações do tipo líquido – líquido, podendo separar partículas finas de sólidos. Apesar de trabalhar em rotações menores permite um processo contínuo com velocidades altas e tratamento de suspensões de até 250 g/L . Uma estratégia seria a

inclusão de mais discos, aumentando a área de sedimentação e reduzindo o tempo do processo (KILIKAN E PESSOA JR., 2001; WAGNER E MENEZES, 2013).

Figura 3: Sistemática de uma centrífuga tubular (UFRNET, 2014).



3.1.2 ROMPIMENTO DE CÉLULAS

Etapa adicionada quando a molécula de interesse encontra-se no meio intracelular. São técnicas eficazes para uma extração efetiva, mantendo a atividade biológica da molécula de interesse (WAGNER E MENEZES, 2013), resumidamente estão descritas na Tabela 2:

Tabela 2 Métodos de rompimento celular (WAGNER E MENEZES, 2013).

Mecânico	Não mecânicos	Químicos	Enzimáticos
Homogeneizador de alta pressão	Choque osmótico	Aplicação de álcalis	Glicosidades
Moinho de bolas	Congelamento/ descongelamento	Utilização de solventes e detergentes	Proteases
Ultrassom	Termólise	-----	Amidases

3.1.3 PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO

I. PRECIPITAÇÃO

A precipitação é um dos métodos de concentração e purificação mais tradicionais, não apresenta alta capacidade de separação, por isso é um moderado processo de purificação (KILIKAN E PESSOA JR., 2001). Baseia-se na solubilidade da biomolécula, nas interações que ela tiver com o solvente. No caso de proteínas, as propriedades podem ser modificadas com a alteração do pH e da força iônica. A mudança das propriedades da água, adição de solventes orgânicos miscíveis ou adição de outros solutos juntamente com a alteração da temperatura contribuem para precipitar a proteína (WAGNER E MENEZES, 2013).

Opta-se pela precipitação fracionada quando se exige maior grau de pureza da proteína. Já a precipitação isoelétrica pode ser feita quando a carga líquida estiver próxima de zero, pois assim a repulsão eletrostática é minimizada resultando na atração entre as moléculas. Pode-se classificar pela solução a ser utilizada (WAGNER E MENEZES, 2013):

- Precipitação por adição de sal: também conhecida por *salting out*, pode ser utilizada em diferentes opções: i) quando as proteínas interferentes são precipitadas e as de interesse permanecem no sobrenadante; ii) quando as proteínas de interesse precipitam com outras de solubilidades próximas e na sequência são ressolubilizadas em solução tampão, para serem fracionadas

por outra técnica; iii) quando ambas são aplicadas em sequência, para casos em que se exige maior seletividade por conta da precipitação fracionada. Independente do método escolhido, no final de todos esses processos, a parte de interesse precisa passar por dessalinização (WAGNER E MENEZES, 2013).

- Precipitação por solventes orgânicos: podem ser adicionados solventes orgânicos miscíveis em água. A sua adição proporciona a precipitação das proteínas devido sua capacidade de reduzir a atividade da água. Essa precipitação pode ser acelerada quando o pH da solução estiver mais próximo do ponto isoelétrico (pI) da proteína. Outro fator influente é o tamanho da molécula de proteína, quanto maior for menos solvente é necessário para que a sua precipitação ocorra. Geralmente ocorre em torno de 0°C, podendo ser empregada em baixas temperaturas desde que não haja o risco de congelamento. A mistura do solvente orgânico com a água é exotérmico, por isso essa adição deve ser realizada lentamente e com refrigeração eficiente para não desnaturar as proteínas do meio. Associada à concentração do solvente outros fatores podem ser explorados para aumentar a seletividade do fracionamento, como pH, temperatura, força iônica e concentração das proteínas (WAGNER E MENEZES, 2013).

II. EXTRAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Considerado método seguro de purificação, é geralmente formado por duas soluções aquosas de um ou dois polímeros hidrofílicos, ou a solução de um polímero em sais. Envolve o princípio de partição de uma mistura entre dois solutos imiscíveis, mas em equilíbrio termodinâmico. Basicamente a molécula de interesse migra para uma fase da mistura enquanto os interferentes migram para a outra. É preciso apresentar baixa tensão superficial, o que favorece a transferência das biomoléculas pela interface aquosa. Também favorece a integridade estrutural da biomolécula, evitando a perda de atividade biológica. São economicamente viáveis quanto a mão de obra, equipamentos e energia necessários, contudo alto custo pode ser agregado aos reagentes se os mesmos não forem recicláveis. Esse sistema tem sido utilizado na purificação e concentração de enzimas produzidas por fermentação. Pelo grande número de variáveis que podem ser trabalhadas é uma técnica versátil, contudo

dependendo da complexidade do meio fermentado, pode apresenta-se insuficiente para processos de alta purificação (WAGNER E MENEZES, 2013).

III. **ULTRAFILTRAÇÃO**

Sistema semelhante a filtração convencional, contudo são aplicados filtros de diâmetros de 0,001 a 0,1 μm sob uma pressão de transmembrana. São usados para concentrar moléculas como proteínas ou polissacarídeos. Todas as moléculas (água e outras moléculas pequenas) passam pelo filtro enquanto as com tamanho superior ao diâmetro nominal de corte ficam retidas. O conceito “diâmetro nominal de corte” é uma denominação para o tamanho do poro para uma membrana de ultrafiltração, sendo referente a massa molecular mínima para ficar retida. Os tamanhos não necessariamente são uniformes, a sua faixa vai variar de acordo com a fabricação e sua aplicação. É recomendado que o diâmetro nominal de corte seja 20% menor q a molécula de interesse. Na prática, sua utilização é baixa, exatamente pela distribuição de tamanho não ser uniforme (KILIKAN E PEREIRA JR., 2001).

3.1.4 PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO: CROMATOGRAFIA

A cromatografia é provavelmente a técnica mais aplicada dentre as técnicas para separação de bioprodutos dentro de processos biológicos, sendo primariamente utilizado nos passos finais para remoção de impurezas e/ou produtos fracionados (LEE E ANN, 2000). Separa biomoléculas fazendo uso de suas próprias propriedades físico-químicas como parâmetros e aplica-se para obter um produto com elevado grau de pureza.

Basicamente essa técnica emprega um sistema de duas fases: uma fase móvel (pode ser gasosa, líquida ou um fluido supercrítico) e uma fase estacionária (pode ser sólida ou líquida) (WAGNER E MENEZES, 2013). A remoção gradual do que fica retido na fase estacionária é que resulta na separação das moléculas (KILIKAN E PEREIRA JR., 2001). Os variados parâmetros envolvidos possibilitam diversas combinações das fases possibilitando ampla aplicação.

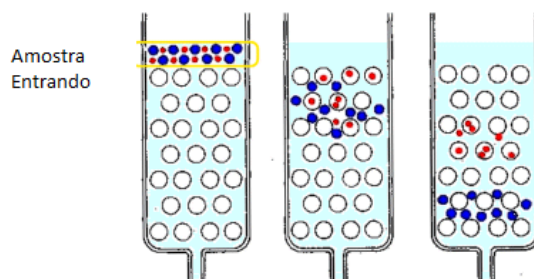
Seu maior objetivo é separar contaminantes como proteínas impuras, endotoxinas, ácidos nucleicos, resíduos celulares, aditivos do processo, entre

outros, com o intuito de removê-los. Diversos tipos podem ser utilizados entre eles: troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade, permeação em gel e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (LEE E ANN, 2000).

I. PERMEAÇÃO EM GEL

Neste sistema, a coluna (fase estacionária) é um gel. É uma cromatografia em que a matriz gel é constituída por um polímero disposto espacialmente com a finalidade de formar poros esféricos embebidos no eluente (fase móvel) (WAGNER E MENEZES, 2013). Conforme um esquema geral mostrado na Figura 4. Também denominada cromatografia de exclusão molecular, capaz de separar tamanhos diferentes, baseado nos poros de exclusão localizados na coluna. Tem sido aplicado comercialmente como etapa de purificação de muitas enzimas além de separação analítica de proteínas e polímeros de acordo com suas massas moleculares (KIM E KOO, 2000).

Figura 4: Esquema geral de uma Cromatografia por permeação em gel (BIOMODEL, 2014).



As espécies com massas moleculares maiores que o limite de exclusão dos poros eluem livremente pela fase líquida e saem primeiro. Já as moléculas que se encaixem no limite de tamanho de poros, ficam retidas nos mesmos eluindo mais rapidamente quanto maiores forem suas massas moleculares. Ao diminuir o tamanho das moléculas, mais tempo elas permanecerão retidas nos poros da coluna. Ou seja, quanto menor a massa molar da biomolécula, maior será o tempo de retenção e mais alongado será o pico apresentado no espectro cromatográfico.

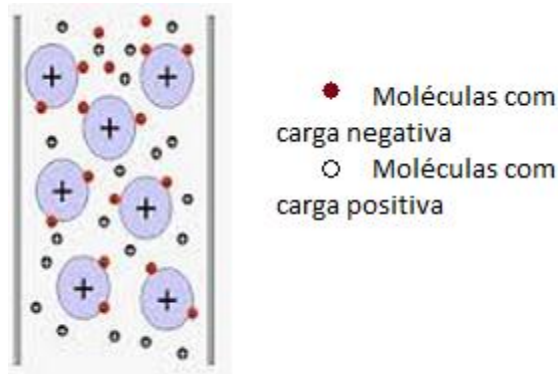
Colunas para filtração em gel, geralmente são feitas de dextrana, agarose e poliacrilamida reticuladas. Para fracionamento de moléculas pequenas indica-se usar colunas de dextrana, devido suas maiores reticulações. Já para o fracionamento de moléculas maiores indica-se o uso de géis de agarose. Quanto a fase móvel, podem ser tampões com variados pHs e variadas forças iônicas, a escolha do tampão apropriado varia de acordo com a natureza e a compatibilidade das proteínas em análise. Um cuidado a ser tomado é na preparação da coluna, a introdução de bolhas de ar é indesejável e a formação de rachaduras é indesejável, já que podem modificar o curso da eluição dos analitos, alterando o resultado final da análise (WAGNER E MENEZES, 2013).

II. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Potencialmente utilizada para separações de biomoléculas, podendo ser de íons metálicos, proteínas, aminoácidos ou açúcares (WAGNER E MENEZES, 2013). Essa é provavelmente a cromatografia mais utilizada, e sua performance é baseada pela sua alta capacidade de recuperação do produto de interesse (LEE E AHN, 2000).

A fase estacionária é constituída por sítios iônicos distribuídos na superfície de polímeros orgânicos ou inorgânicos, dispostos em colunas de dimensões variadas, de acordo com a sua aplicação (Figura 5). As matrizes podem ser de origem aniônica ou catiônica, sendo suas fases eluentes correspondentes catiônica e aniônica, respectivamente. Sendo assim, a fase móvel escolhida é constituída por soluções aquosas com pH e força iônica bem estabelecidos, determinando a interação entre os analitos com a matriz (WAGNER E MENEZES, 2013).

Figura 5: Figura esquemática da Cromatografia de Troca Iônica (PROTEINAFAMETRO, 2014).



3.1.5 TRATAMENTOS FINAIS

O grau de pureza a se atingir em um processo de purificação depende da sua aplicação final. Essa etapa é necessária para grande parte dos bioprodutos. Eles devem estar puros, secos, cristalinos ou amorfos (KILIKAN E PEREIRA JR., 2001). Para isso precisam ser submetidos a alguns tratamentos finais.

I. LIOFILIZAÇÃO

Processo de remoção de um solvente, usualmente água, por sublimação. O resultante do processo anterior é congelado e em seguida submetido a baixa pressão para que a água livre sublime. O produto final se apresentará na forma de pó e assim sua atividade biológica se manterá estável por mais tempo, do que se estivesse em solução aquosa. Deve-se tomar certo cuidado, pois se não for adequada pode acarretar a desnaturação das proteínas (KILIKAN E PEREIRA JR., 2001).

II. CRISTALIZAÇÃO

É um processo de agregação de cristais das moléculas presentes nas soluções supersaturadas homogêneas. Comumente empregada na etapa final da purificação de proteínas, em particular das enzimas. Permite a estocagem estável da biomolécula, agregada devido sua cristalinidade. Deve-se atentar ao grau de pureza da molécula final pois os interferentes são capazes de se cristalizar juntamente. Após essa etapa, o produto pode ser recuperado se for submetido a filtração ou centrifugação, atentando sempre para a desnaturação das proteínas (KILIKAN E PEREIRA JR., 2001).

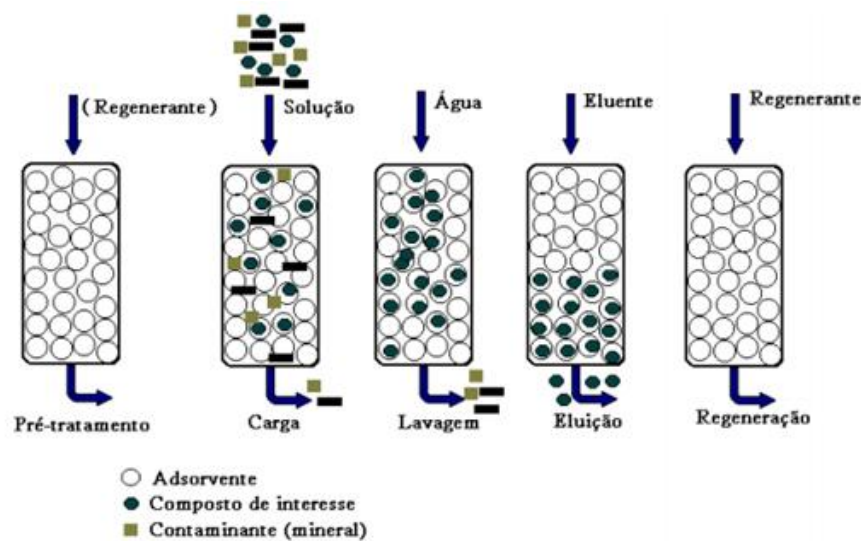
III. PRECIPITAÇÃO EM SULFATO DE AMÔNIO

Alternativa ao processo de cristalização, pois não há a possibilidade de desnaturar a proteína de interesse. Proporciona grande parte das vantagens do processo de cristalização, contudo será necessário remover o sal ao final desta etapa (KILIKAN E PEREIRA JR., 2001).

IV. ADSORÇÃO

Diferente de processos como destilação, absorção e extração, constitui-se de uma mistura de gás que flui no sentido ascendente passando por uma coluna empacotada enquanto desce uma corrente líquida absorvente. É um processo descontínuo que envolve um fluido e um sólido, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6: Representação esquemática de um sistema de adsorção (VIEIRA, 2006).



O uso do sólido é que o destaca porque sólidos são capazes de adsorver até traços pequenos de soluto, tornando esse método aplicável para soluções diluídas. É importante estudar a maneira como o adsorvente entrará em contato com a solução, que contém o soluto a ser adsorvido (VIEIRA, 2006). Pode ser aplicado em sistemas em mistura (reatores batelada e descontínuo) e em sistemas em leito fixo.

3.2 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário dos micro-organismos, e por isso podem ser denominados metabólitos secundários. Como o próprio nome diz, são capazes de inibir o crescimento de outros micro-organismos, mesmo se utilizados em baixas concentrações.

Os antibióticos estão presentes há anos, sendo que a primeira exibição do crescimento foi observada por Alexander Fleming em 1929, em seu laboratório no Hospital Saint Mary's em Londres. Esse pesquisador observou um agente antibacteriano sendo produzido pelo micro-organismo *Penicillium*, ocorrido em placas de ágar, onde cresceu estafilococos contaminados com fungos do ar, observou-se então que as colônias em torno dos fungos se mostravam translúcidas, elas estavam sofrendo lise – rompimento da membrana celular. Fleming cultivou o *Penicillium* sobre a superfície e observou a produção de uma substância antimicrobiana e deu o nome de Penicilina. Durante a Segunda Guerra Mundial a demanda de quimioterápicos para tratar as infecções exigiu que se desenvolvesse uma produção alta de penicilina, esse foi o início da Era dos antibióticos (SATO, 2001).

Na atualidade, a área de pesquisa e desenvolvimento continua sendo a mais importante na investigação da microbiologia industrial. Do grande número de antibióticos conhecidos de origem microbiana, somente 123 são produzidos atualmente por fermentação. Além disso, mais de 50 antibióticos são produzidos como compostos semi-sintéticos, e três antibióticos são produzidos sinteticamente por completo: cloranfenicol, fosfomicina e a pirrolnitrina (SATO, 2001).

Os antibióticos podem ser produzidos por três grupos taxonômicos: bactérias (exceto actinomicetos), actinomicetos e fungos. Dentre os antibióticos produzidos por fungos, apenas os produzidos por *Aspergillus moniliales* são de importância prática, somente a penicilina, cefalosporina C, griseofulvina e ácido fusídico apresentam importância clínica. Já entre bactérias, diversos grupos taxonômicos produzem antibióticos, a maior variedade de antibióticos é produzida pelos actinomicetos, em especial pelo grupo *Streptomyces* e pelos *Bacillus* que produzem antibióticos peptídicos (SATO, 2001).

A classificação dos antibióticos pode ser dada de acordo com seu espectro microbiano, mecanismo de ação, cepa produtora, forma de biossíntese ou estrutura química (SATO, 2001).

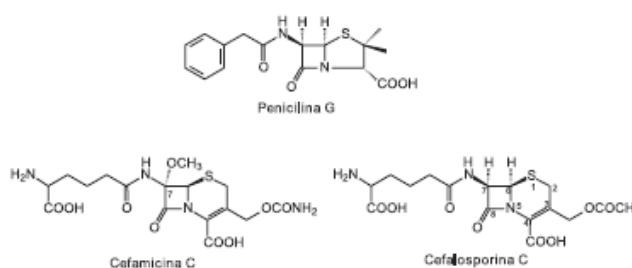
De acordo com sua estrutura química, os antibióticos podem ser divididos em: antibióticos que contêm carboidratos, lactonas macrocíclicas, quinonas e antibióticos relacionados, aminoácidos e antibióticos peptídicos; Antibióticos heterocíclicos que contêm nitrogênio, antibióticos heterocíclicos que contêm oxigênio, derivados acíclicos, antibióticos aromáticos e antibióticos alifáticos. Dentro dos antibióticos e aminoácidos peptídicos pode-se subclassificar em: derivados de aminoácidos, antibióticos β -lactâmicos, antibióticos peptídicos, cromopeptídeos, depsipeptídeos e peptídeos quelantes (SATO, 2001).

Neste trabalho abordaremos de forma mais aprofundada a respeito dos antibióticos β -lactâmicos, que nos últimos 60 anos têm sido destaque no tratamento com quimioterápicos além de serem antibióticos semi-sintéticos relativamente baratos e de alta eficiência (BUYNAC, 2006).

3.2.1 ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Os antibióticos β -lactâmicos são classificados de acordo com sua estrutura química, por possuírem em seu núcleo estrutural o anel β -lactâmico (Figura 7), que na verdade é um condensado do ácido 6-aminopenicilânico que apresenta na sua estrutura um anel tiazolidínico condensado com um β -lactâmico (SATO, 2001), responsável por sua atividade bactericida. O seu mecanismo de ação basicamente consiste na sua habilidade de interferir na síntese de peptidoglicano (molécula responsável pela integridade da parede bacteriana) (ANVISA, 2007).

Figura 7 Estrutura e exemplos de antibióticos β -lactâmicos (QUÍMICA NOVA, 2009).



Devido ao grande espectro de atividades, sua formulação inicial foi modificada ao longo dos anos, dando a um grupo de variadas moléculas o nome de Penicilinas – Antibióticos β -lactâmicos. Com o aumento da variedade de bactérias que se apresentaram resistentes a eles, esses antibióticos passaram a ser utilizados para bactérias gram-positivas, gram-negativas aeróbias e anaeróbias. Em consequência disso, eles são amplamente aplicados para tratamentos médico de seres humanos e de uso veterinário (SAMANIDOU, 2006).

Eles penetram na parede microbiana através das porinas presentes na sua membrana externa, não sendo destruídos pela membrana externa da parede celular bacteriana, ligando-se às proteínas ligadoras de penicilina (PLP) que são responsáveis pela síntese da parede bacteriana, caracterizando assim a sua atividade bactericida (ANVISA, 2007).

De acordo com SATO (2001), os antibióticos β -lactâmicos podem ser classificados em:

- i. Naturais: na sua síntese não são adicionados precursores na cadeia lateral, contudo aqui são sintetizados junto com a molécula alguns subprodutos que precisam ser removidos na etapa de purificação.
- ii. Semi-sintéticos: adiciona-se precursores na cadeia lateral, sintetizando assim apenas a molécula de interesse. Por suas melhores características, tem sido extensamente utilizada em tratamentos quimioterápicos.

Produz-se anel β -lactâmico-tiazolidínico das penicilinas a partir de dois aminoácidos L-cisteína e L-valina, sua síntese se dá por um processo não ribossomal. Vários mecanismos regulatórios da biossíntese da penicilina são conhecidos, isso devido ao fato de algumas biomoléculas serem capazes de inibir a sua síntese, como por exemplo a lisina que ao interferir em etapas do metabolismo é capaz de regular a síntese por impedi-la, da mesma maneira a concentração de fosfato resulta numa repressão catabólica causada pela glicose. Sendo por isso, as fermentações para síntese de penicilina são conduzidas apenas com lactose (SATO, 2001).

3.2.2 PURIFICAÇÃO DOS β -LACTÂMICOS

Esses antibióticos, produzidos por via fermentativa são geralmente recuperados com uma sequência de operações que podem variar de acordo com as propriedades dos antibióticos assim como dos processos requeridos. Tradicionalmente, as operações incluem separação sólido/líquido, extração de caldo filtrado e cristalização de antibióticos em pontos isoelétricos (VIEIRA, 2006). Por essa razão, os diversos métodos se baseiam na exploração das características físico-químicas da molécula sintetizada, como hidrofobicidade, carga superficial, peso molecular, bioespecificidade quanto a ligantes (íons metálicos), pI (ponto isoelétrico) e sua estabilidade (BARROS, 2008).

A precipitação usando solventes orgânicos é o processo que tem sido utilizado na indústria para a separação da penicilina G do meio fermentado. E os principais solventes aplicados são acetona, acetato de amila, acetato de butila, o hexano, entre outros (TREYBAL, 1980). Uma vantagem dessa técnica é que pode ser operada continuamente (BARROS, 2008).

Em experimento, BARROS (2008) primeiramente ajustou pH da solução que continha solvente orgânico, água e a molécula de interesse. O pH da fase aquosa ajustado foi 2 – 2,5, com a finalidade de extrair a penicilina do solvente (fase orgânica). O extrato segue para ser tratado com uma solução padrão de pH 6, com a finalidade de obter uma solução aquosa rica em penicilina. Antes do próximo passo, ajustar o pH novamente com um ácido, para atingir pH baixo, e a penicilina é novamente extraída pelo solvente, obtendo-se ao final uma solução concentrada de alta pureza. Essa metodologia é complexa, pois a penicilina degrada rapidamente com a redução do pH, para a extração em temperatura ambiente é necessário realizar rapidamente a transferência para o pH baixo.

OLIVEIRA *et al.* (2009) estudou um processo de reciclagem que gera Cefamicina C pura e com alto rendimento, patenteado por SCHUBERT (1980), que ajustou o pH do caldo fermentado para valor entre 1,8 – 2,5 e em seguida submete a filtração. O filtrado é passado em cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna catiônica e lavando a coluna com água. A fase estacionária é eluída com solução de NaCl 10%. Ajusta-se o pH do eluído para 7, abaixa-se a temperatura. Este procedimento pode ser repetido de 10 a 15

vezes. Esses estudos comprovam que esse processo é mais eficiente quando comparado ao processo de adsorção ou de troca iônica sequencial

Um estudo patenteado descreve um procedimento para purificação de cefamicina C, iniciando com centrifugação ou filtração do caldo fermentado, ajusta-se o pH para 7 – 8 e em seguida o submete a cromatografia de troca catiônica com resina Diaion PA 406, e na sequência elui-se com NaCl 0,5 M (KAMOSHIGARA *et al.*, 1981).

De acordo com OLIVEIRA *et al.* (2009) após a etapa de filtração, técnicas como extração líquido-líquido e/ou cromatografia, como a permeação em gel, podem ser aplicadas. BARBOZA *et al.* (2002) estudou que para cefalosporinas, por serem antibióticos hidrofílicos, essa extração não é muito eficiente devido sua solubilidade alta em água e sugere o uso de adsorção em resinas não funcionais para a extração do antibiótico do meio fermentado.

CHARCOSSET (2006) relata em seus trabalhos a utilização de ultrafiltração com filtros de 0,45 – 0,22 μm , e como vantagem dessa utilização são os satisfatórios valores de recuperação com altos rendimentos, decorrente de uma diálise. OLIVEIRA *et al.* (2009) completa ainda que o processo de ultrafiltração é bastante utilizado para a retirada de macromoléculas interferentes a etapas seguintes do processo. E sugere que também pode ser aplicado para remoção de emulsificação formada em caldos de antibióticos.

3.3 ENZIMAS

As enzimas são denominadas biocatalisadores, por serem catalisadores de composição orgânica e responsáveis por intermediar reações bioquímicas nos sistemas vivos. Apresentam estrutura proteica, podendo ser constituídas unicamente de unidades específicas de aminoácidos (holoproteínas), ou possuírem parte não protéica (heteroproteínas) denominada cofator, que é essencial à atividade catalítica a ser exercida (MOLINA *et al.*, 2013).

Quando comparadas com catalisadores químicos, as enzimas apresentam maior viabilidade devido a sua especificidade expressa para cada substrato ou para cada tipo de reação (SANT'ANNA JR., 2001). Apresentando,

portanto ampla aplicação e garantindo altas taxas de conversão, sem a formação de subprodutos muitas vezes indesejados.

A nomenclatura das enzimas apresenta nomes característicos capazes de fornecer informações sobre as reações que elas catalisam. Sua classificação é importante para que possam ser divididas e caracterizadas de acordo com suas atividades.

As enzimas podem ser obtidas de diversas fontes vegetais, animais e microbianas. Essas enzimas provenientes de fontes animais e vegetais podem apresentar inconvenientes devido ao fato das matérias primas serem limitadas, e essa baixa disponibilidade impede a expansão de sua utilização. Limitações como essa fizeram necessários processos alternativos de produção enzimática, assim a obtenção por fermentação microbiana começou a ganhar destaque até atingir nível de produção industrial (MOLINA *et. al*, 2013).

Independente da sua fonte, as enzimas são produzidas no interior da célula, mas algumas são excretadas para atuarem na região extracelular. Com base no local de ação elas são classificadas em dois tipos: intracelular (endoenzima) e extracelular (exoenzima) (MOLINA *et. al*, 2013).

As enzimas extracelulares têm como principal função alterar determinados nutrientes possibilitando sua entrada pela membrana celular, basicamente essa atividade consiste em hidrolisar compostos de grande peso molecular em moléculas menores. Para atuarem no meio extracelular, elas devem estar aptas às características físicas e químicas deste meio. E em virtude de sua alta aplicação, é necessário que a célula as produza em grande quantidade, sendo as enzimas extracelulares mais viáveis à utilização industrial comparado às intracelulares (SANT'ANNA JR, 2001).

Em um amplo campo de aplicações, as enzimas podem ser úteis melhorando a qualidade e facilitando a obtenção de um produto, ou produzindo um intermediário dentro de um processo no qual este é difícil de obter quimicamente (NETO, 2001).

As enzimas têm sido utilizadas em diversos segmentos industriais, entre eles pode-se citar: indústria alimentícia, de bebidas, detergentes, têxtil, couro,

medicamentos, cosméticos, entre outros. As maiores consumidoras estão mostradas na Tabela 3. Além de também serem de uso médico, analítico e científico. As principais enzimas presentes nas indústrias hoje são: α -amilase, glicoamilase, glicose isomerase e várias proteases (MOLINA *et al.*, 2013).

Tabela 3 Principais indústrias consumidoras de enzimas (NETO, 2001).

Indústria	Consumo em %
Detergentes	40 – 45
Processamento de amido	20 -25
Laticínios	12 -15
Cervejarias	2 – 4
Sucos de frutas e vinho	3 – 5
Panificação	1 – 2
Têxtil e papel	4 – 6
Couro	1 – 2
Outras	6 – 10

Abordaremos mais especificamente sobre as enzimas amilolíticas e sua aplicação na indústria alimentícia, já que aproximadamente 30% do consumo mundial de enzimas encontra-se direcionado para a produção de amido hidrolisado, que pode ser encontrado em diversos ramos dentro da indústria alimentícia, como nos adoçantes, nos alimentos para bebês, na panificação, na cerveja, no álcool e nas bebidas destiladas (MOLINA *et al.*, 2013).

3.3.1 INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA: ENZIMAS AMIOLÍTICAS

As enzimas presentes na indústria alimentícia podem ser classificadas em: Amilolíticas (produção de amido hidrolisado), Lipolíticas (reações de bioconversão), Proteases (catalisam reação de hidrólise de proteínas), Pectinases (degradação de pectinas, que são moléculas longas e complexas) e β -glactosidade (hidrolisa a lactose do leite) (MOLINA *et al.*, 2013).

As enzimas amilolíticas constituem uma classe de hidrolases, responsáveis pela degradação do amido, e podem ser encontradas em microorganismos, vegetais e animais. As amilases são empregadas em hidrólises e modificações de matérias-primas e produzem xaropes com altos teores de frutose e etanol. Basicamente, classifica-se as amilases em quatro grupos capazes de converter o amido (MOLINA *et al.*, 2013):

- a) Endoamilases: Como produtos finais da ação dessa classe de enzimas, têm-se oligossacarídeos de tamanhos variáveis podendo ser ramificados. São conhecidas como α -amilases.
- b) Exoamilases: Agem sobre a extremidade não redutora da amilose ou amilopectina, liberando apenas moléculas de glicose ou maltose e β -dextrose. Conhecidas por β -amilases
- c) Desramificadoras: Degradam exclusivamente amilopectinas, liberando polissacarídeos lineares longos.
- d) Transferases: Clivam uma ligação glicosídica α -1,4 de uma molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica.

A ação específica de uma α -amilase ou uma β -amilase em um amido e seus componentes depende da presença no mesmo de íons, do pH e da temperatura em que está. Essa diferença é também esclarecida sabendo a origem da enzima, α -amilase de vegetais superiores geralmente são estáveis em pH 5,5 – 8, portanto o pH ótimo dessa enzima é entre 4,5 e 6. A sua inativação irreversível ocorre em pHs menores que 4,5. Já o pH ótimo para a

atividade da β -amilase é geralmente na faixa de 4 a 6. Essa enzima é relativamente estável em ácido com pH acima de 3,6 (BRENA, 1996).

Uma aplicação é a conversão do xarope de glicose em frutose, catalisada pela glicose isomerase. A conversão máxima de frutose é de aproximadamente 55%, sendo assim o produto final é conhecido como xarope com alto teor de frutose, e é amplamente utilizado como adoçante (MOLINA *et al.*, 2013).

Outra aplicação é na indústria panificadora, na qual é adicionada amilase ao processo com a finalidade de produzir pequenas moléculas de dextrina, que durante o processo serão fermentadas pelas leveduras neste adicionadas. Essa adição resulta no aumento de volume da massa preparada e melhora na textura do produto, resultando no aumento do miolo do pão e diminuição da sua umidade. E ainda, amilases maltogênicas produzem maltose, maltotriose e maltotetralose, capazes de aumentar a vida de prateleira dos produtos e diminuir a retrodegradação do amido (MOLINA *et al.*, 2013).

Por outro lado, a amilase também pode causar efeito indesejado em alimentos *in natura*. Por exemplo, nas batatas ela catalisa o equilíbrio entre o amido e o açúcar presentes naturalmente causando escurecimento durante seu preparo. Uma solução é manter a baixas temperaturas, prevenindo que essa conversão (amido em açúcar) ocorra. Esse fenômeno também pode ocorrer em outros alimentos ricos em carboidratos (MOLINA *et al.*, 2013).

As enzimas amilolíticas são enzimas de fontes vegetais, por isso apresenta a limitação de matérias primas, essa baixa disponibilidade impedia a expansão de sua utilização. Fizeram-se necessários processos alternativos de produção enzimática, como obtenção por fermentação microbiana. O processo industrial de produção de enzimas microbianas, em geral, pode ser mais controlado e padronizado quando comparado aos processos que fazem uso de matérias primas *in natura*, principalmente os que são sazonais. Além de permitir a utilização de matérias primas mais baratas e mais acessíveis (MOLINA *et al.*, 2013).

Em síntese, esse processo fermentativo é um bioprocesso, consistindo em etapas: tratamento da matéria-prima, escolha do micro-organismo adequado e fermentação, e recuperação e purificação da enzima, finalizando com os tratamentos finais (SANT'ANNA JR., 2001).

A fermentação no estado sólido utilizando substrato de baixo custo e alta disponibilidade tem sido bastante empregada, principalmente para a obtenção de produtos de importância comercial (SPIER, 2005).

3.3.2 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS

Muitas técnicas podem ser empregadas para a recuperação das enzimas na forma de um produto final. Se a enzima encontrar-se no meio extracelular podem ser recuperadas por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, cromatografia, liofilização ou a combinação de outros métodos. Já as enzimas intracelulares, terão que ser extraídas por rompimento celular, mas essa técnica de recuperação diminui o rendimento, pois parte da enzima pode ficar retida na massa celular. Quando isso ocorre, a extração dessa parte pode ser por precipitação com solventes orgânicos (acetona, alcoóis) ou por precipitação com sulfato de amônio, ou por ultrafiltração (SPIER, 2005). A escolha dessas operações é específica e será feita pela natureza do meio fermentativo e pelas propriedades físicas e químicas da enzima.

Deve-se levar em conta o grau de necessidade de refinamento do produto em questão, as condições práticas, a disponibilidade de algumas operações e equipamentos da planta industrial. Vale-se certificar das possibilidades de reciclagem do material e da opção de eliminação dos produtos indesejados (MOLINA *et al.*, 2013).

Pelo fato das amilases geralmente ocorrerem em formas hidrossolúveis, sua extração é simples, usa-se em geral fazer através de soluções tampão, tais como fosfato de sódio ou acetato de sódio ou utilizando-se cloreto de cálcio e água. Deve-se manter o pH em torno de 4,5 para prevenir sua inativação. Na sequência, um tratamento térmico pode ser considerado mais uma etapa de purificação, na qual as enzimas termolábeis serão removidas por inativação térmica do extrato bruto, o que geralmente a 70°C (MOLINA *et al.*, 2013) .

SANABRIA (2005) fez uso da inativação seletiva para a purificação de α -amilases e separação de β -amilases termoestáveis, que pode ser feito com a diminuição do pH para valores menores que 4 para inativação α -amilases, ou tratamento térmico a 70°C e pH neutro para inativação β -amilases.

Precipitação fracionada é utilizada para separar soluções concentradas de grandes volumes. Faz-se uso de sais, como sulfato de amônia, ou fazendo-se uso de solventes orgânicos, como etanol e acetona. Deve ser realizado em baixas temperaturas para minimizar a inativação das enzimas, supersaturação do sol ou até mesmo concentração elevada do solvente orgânico (ZIEGLER, 1999).

Diversos métodos tradicionais podem ser aplicados para purificação de amilases, contudo por ocorrer como isoenzima é que limita essa utilização. A cromatografia de troca iônica é o método mais utilizado para separação, usando a coluna de Resina DEAE-celulose (dietilaminoetil celulose) – uma coluna carregada positivamente, em que os grânulos presentes nessa coluna bloqueiam a passagem de proteínas com cargas negativas - foram amplamente utilizadas para a separação das amilases provenientes de cereais. A coluna DEAE-Sephadex foi empregada como boa resina de troca iônica, com a finalidade de purificar enzimas de malte (SANABRIA, 2005).

O método de precipitação por *salting out* é um método de fácil preparo e baixo custo. Nesse processo, os sais terão efeito pronunciado na precipitação das enzimas, pois em concentrações reduzidas eles são capazes aumentar a solubilidade de muitas enzimas. Por outro lado, se a força iônica for aumentada, essa solubilidade se reduz gradativamente. Portanto, em forças iônicas elevadas, em medidas adequadas, uma proteína pode ser quase que precipitada por completo, caracterizando o método de *salting out*. Contudo, esse processo é complexo, devida as complexas interações físico-químicas envolvidas. Um dos fatores que caracteriza esse fato é que a concentração elevada de sais pode acabar removendo as moléculas de água presentes nas moléculas de proteínas que compõem as enzimas, o que reduz a sua solubilidade (LEHNINGER, 1993; SPIER, 2005). Esse efeito é o resultado da competição entre o sal e a enzima pelas moléculas de água necessárias para

suas respectivas solubilizações. Nessas condições as interações entre moléculas protéicas acabam sendo mais importantes que as interações água – proteína, resultando na agregação das moléculas protéicas (CHEFTEL, 1989).

SPIER (2005) fez a precipitação conforme descrita acima utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e a precipitação foi efetiva para a enzima, mas produziu perda elevada da atividade aplicada. O experimento foi realizado em triplicata, mas detectou-se mesmo baixa recuperação da enzima. Ela baseou-se em SOUZA (1996) que conseguiu uma recuperação de aproximadamente 70%, fazendo o uso do mesmo sal para a enzima α -amilase. SPIER (2005) então verificou que era necessário fazer uma otimização desse processo, variando a concentração do sal, a temperatura, o tempo do processo e a velocidade de centrifugação.

Precipitação utilizando glicogênio é um método padrão aplicável para amilases de diferentes fontes (BRENA, 1998). KRUGER E TKACHUK (1969) isolaram quatro α -amilases do trigo fracionando com solvente orgânico – acetona, precipitando com glicogênio e cromatografia de troca iônica. Enquanto amilases do suco digestivo de larvas que se alimentaram de algodão foram purificadas e 30% foi recuperado usando precipitação fracionada com sulfato de amônio, precipitação por etanol, precipitação por complexo de glicogênio e cromatografia em gel. Concluiu-se que o uso precipitação da amilase por glicogênio atingiu os maiores graus de purificação (BRENA, 1998).

A pureza e o rendimento alcançado dependem do número de passos e técnicas empregadas. Cromatografia por afinidade é o método chave para preparação de amilases homogêneas, tanto isoladamente quanto quando combinado a outras técnicas. Contudo essa técnica tem alto custo, sendo mais frequentemente aplicada em nível de laboratório. A técnica de separação por tamanho de partícula (permeação em gel) é utilizada para amilases de tamanho ligeiramente diferentes, o que não é possível separar usando uma cromatografia por afinidade. Enzimas extraídas de brotos de diversas plantas e as de origem microbiana pode ser com baixas pressões purificadas com HPLC, que produz um resultado rápido e quantitativo para análise de diversas formas de α -amilase. Colunas porosas apresentam diversas vantagens, com fluxos altos de eluição eles apresentam boas resoluções e o equilíbrio da coluna com o solvente é rápido, possibilitando reciclo do mesmo (BRENA, 1998).

O uso de diversas técnicas formando uma estratégia sequencial para o processo pode efetivamente economizar tempo, minimizar o trabalho de cada operação unitária e aproveitar de forma otimizada os recursos disponíveis.

4 CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS

Junto ao avanço gradativo da biotecnologia, a área de pesquisa e desenvolvimento da microbiologia industrial vem crescendo, alinhando processos fermentativos com bioprocessos. Este trabalho estudou a aplicação e a importância desse avanço através das variadas técnicas de purificação de biomoléculas, resultantes da fermentação, e suas aplicações.

A etapa de *downstream* se mostrou importante, pois nela diversas técnicas de purificação são aplicadas, com o intuito de se obter o produto mais puro possível e com uma viabilidade econômica de acordo com as exigências de mercado. Isso porque, alguns processos exigem extrema pureza de seus produtos finais como, por exemplo, enzimas e antibióticos, que são aplicados nos mais diversos ramos industriais: alimentício, farmacêutico, cosméticos, detergentes entre outros, e exigem sua forma mais pura evitando reações indesejadas com possíveis resíduos da etapa de fermentação.

A combinação das técnicas a serem aplicadas é baseada fundamentalmente nas características físico químicas das biomoléculas, de maneira a atingir a maior pureza e ao mesmo tempo evitar ao máximo alterar a sua estrutura química e/ou sua atividade biológica. Essa combinação pode ser de diversas técnicas (centrifugação e na sequência cromatografia, por exemplo) ou também da repetição de uma sequência de técnicas, como na purificação de antibióticos β -lactâmicos que mantêm sua atividade biológica após 15 repetições seriadas de um processo compreendendo filtração e cromatografia.

Na purificação das enzimas amilolíticas, as etapas sequenciais para enzimas extracelulares apresentadas podem ser centrifugação, filtração, precipitação fracionada, cromatografia, liofilização ou a combinação de outros métodos. Já para enzimas do meio intracelular, técnicas de por rompimento celular precisarão ser aplicadas. Apesar da necessidade de realizar esta etapa, deve-se levar em conta que essa técnica diminui o rendimento, pois parte da enzima pode ficar retida na massa celular. A técnica de precipitação fracionada

é utilizada para separar soluções concentradas de grandes volumes. O método de precipitação por *salting out*, é aplicável, de fácil preparo e baixo custo, mas a concentração de sais deve ser controlada evitando removendo as moléculas de água presentes na sua estrutura, evitando reduzir sua solubilidade o que acarretaria na perda elevada da sua atividade. A cromatografia por afinidade é o método chave para preparação de amilases homogêneas, comumente feita associada a outras técnicas. Contudo seu alto custo limita sua aplicação a nível de laboratório. Já a técnica de separação por tamanho de partícula (permeação em gel) é utilizada para amilases de tamanho ligeiramente diferentes, aplicada ao que não é possível separar usando uma cromatografia por afinidade.

Enquanto para antibióticos β -lactâmicos, basicamente os métodos de purificação de antibióticos são baseados em variação de pH seguido de cromatografias de troca catiônica, podendo ser aplicadas diversas resinas nas colunas e a fase móvel eluída com soluções salinas. Essas técnicas não alteram a atividade biológica da mesma. Outros estudos mostraram a utilização de filtração, ultrafiltração e centrifugação em etapas que procedem a etapa de purificação de alta resolução.

Pode-se concluir com este trabalho a extrema importância das características físico-químicas das biomoléculas para a escolha das técnicas e sequencia de técnicas para a etapa de purificação assim como sua viabilidade econômica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIBABA. Web site disponível em: <http://portuguese.alibaba.com/products/nrsdr-5-small-milk-dairy-cream-disc-centrifuge-separator-with-solid-holding-bowl-356122246.html>. Acesso em: 18 OUT. 2014.

AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica; COURI, S.; DAMASO, M.C.T. **Enzimáticos**. Brasília, 2014. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html. Acesso em 10 SET. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Antibióticos – Bases teóricas e uso clínico**. Brasília: 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/lactamicos3.htm. Acesso em 10 OUT. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Coletânea de normas técnicas**: elaboração de TCC, dissertação e teses. Rio de Janeiro: ABNT, 2011.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R.M.R.G.; HOKKA, C.O. Kinect studies of clavulanic acid recovery by ion exchange chromatography. **Bioseparation**, vol 10, p. 221 – 227, 2002.

BARROS, A.N.C. **Purificação de penicilina G por adsorção em resinas hidrofóbicas**. 2008. 80p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

BIOMODEL. Web site disponível em: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/crom/inicio.htm>. Acesso em: 18 OUT. 2014.

BRENA, B.M.; PAZOS, C.; FRAGUAS, L.F.; VIEIRA, F.B. Chromatography methods for amylases. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications**, v. 684, p. 217-237, 1998.

BUYNAC, J.D. Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.930-940, 2006.

CHARCOSSET, C. Membrane process in biotechnology: an overview, **Biotechnol. Adv.**, vol. 482, p. 92, 2006.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas Alimentárias**. Acribia, 1989, 346p.

HAMEL, J.F.P.; HUNTER J.B.; SIKDAR, S.K. **Downstream Processing and Bioseparation, Recovery and Purification of Biological Products**. Toronto: ACS Symposium Series, 1988.

KAMOGASHIRA, T.; NISHIDA, T.; SUGAWARA, M.; NIHNO, T.; TAKEGATA, S. **UK pat. 2**, 052 – 502, 1981.

KEIM, C.; LADISCH, M.R. Bioseparation of Natural Products. Em: ENDO, T.N.; KATOH, S.; YONEMOTO, T. **Bioseparation Engineering**. West Lafayette: Elsevier, 2000.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR., A. Purificação de produtos biotecnológicos. Em: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Bücher LTDA, 2001.

KIM, Y.M.; CHANG, W.J.; KOO, W.M. Online recover of large molecules from mixture solution using semi-continuous size exclusion chromatography. Em: ENDO, T.N.; KATOH, S.; YONEMOTO, T. **Bioseparation Engineering**. Incheon: Elsevier, 2000.

KRUGER, J.E.; TKACHUK, R. **Wheat Alpha Amylase I. Isolation**. Cereal Chem 46, 219-226, 1969.

LEE, K.E.; AHN, S.J. Validation of Bioprocess Chromatography Principles and Practises. Em: ENDO, T.N.; KATOH, S.; YONEMOTO, T. **Bioseparation Engineering**. Seoul: Elsevier, 2000.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica** v. 1, 2ªed. São Paulo: Edgard Blüncher Ltda, 1993, 262p.

MOLINA, G.; PRAZERES, J.N.; BALLUS, C.A. Aplicação de Enzimas na Indústria de Alimentos. Em: PASTORE, G.M.; BICAS, J.L.; JUNIOR, M.R.M. **Biotecnologia de Alimentos**. São Paulo: Athenu, 2013. 511p.

OLIVEIRA, J.H.H.L; GRANATO, A.C.; HIRATA, D.B.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M.; TRISC, M. **Ácido Clavulânico e cefaminicia C: uma perspectiva da biosíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação**. Quím Nova, vol. 32, São Paulo, 2009.

PEREIRA JR., N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Tecnologia de Bioprocessos**, vol.I, Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.

PROTEINAFAMETRO. Web site disponível em: <http://proteinafometro2013.blogspot.com.br/2013/05/tecnicas-de-analise-de-proteinas.html>. Acesso em 18 OUT. 2014.

QUÍMICA NOVA, Web site disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-00422009000800028&script=sci_arttext. Acesso em: 27 OUT. 2014.

SAMANIDOU V.F., EVAGGELOPOULOU, E.N.; PAPADOYANNIS, I.N. Chromatographic analysis of penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1897-1908. 2006.

SANABRIA, G.G.R. **Caracterização parcial de carboidrases, morfologia do grão de amido e composição centesimal de raízes de maca (*Lepidium meyenii Walpers*)**. 2005. 104p. Tese (Mestrado em Ciência dos alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

SANT'ANNA JR, G.L. Produção de Enzimas Microbianas. Em: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Bücher LTDA, 2001.

SATO, S. Produção de antibióticos. Em: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Bücher LTDA, 2001.

SCHUBERT, P.F. **US pat. 4:** GB2052502A, 196 – 285, 1980.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. Em: **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Bücher LTDA, 2001.

SOUZA, E.L.; HOFFMANN, E.H.E.; CASTILHO, V.M.; LIMA, V.A.; BELLINI, M.Z.; CRUZ, V.D.; CRUZ, R. Produção e caracterização de α -Amylase produzida por *Rhizopus sp.* Em: **Arquivos Biol. Tecnol.**, vol.39, p.831-839, 1996.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

UFNET. Web site disponível em: <http://www.ufrnet.br/~lair/Pagina-OPUNIT/equipamento.htm>. Acesso em: 18 OUT. 2014.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP:** documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT). Web site disponível em:
http://www.teses.usp.br/index.php?option=com_content&view=article&id=52&Itemid=
emi. Acesso em 20 OUT. 2014.

VIEIRA, M.F. **Separação de ampicilina produzida enzimaticamente por reação entre éster metílico de fenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico**. 2003. 167p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003.

WAGNER, R.; MENEZES, C.R. Processos de Separação e Purificação de Produtos Fermentados. Em: PASTORE, G.M.; BICAS, J.L.; JUNIOR, M.R.M. **Biotecnologia de Alimentos**. São Paulo: Editora Athenu, 2013. 511p.

ZIEGLER, P. Cereal β -amylases, **Journal of Cereal Science**, v.39, p. 195-204, 1999.