

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**purificação de quitosanases produzidas por *bacillus cereus* utilizando
cromatografia líquida rápida de proteínas**

Julia Maria de Medeiros Dantas

Orientador: Everaldo Silvino dos Santos

Coorientadora: Nathália Kelly de Araújo

Natal, RN

2017

Julia Maria de Medeiros Dantas

PURIFICAÇÃO DE QUITOSANASES PRODUZIDAS POR *BACILLUS CEREUS* UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para a obtenção do título de Engenheira Química.

Orientador: Everaldo Silvino dos Santos
Coorientadora: Nathália Kelly de Araújo

Natal, RN

2017

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Patricia Maria de Medeiros Dantas, e à minha avó, Maria Zilar Santana de Medeiros, que me criaram e me ensinaram todos os meus valores e princípios. Todas as conquistas que eu conseguir na vida vão ser culpa das duas.

AGRADECIMENTOS

Pela conclusão deste trabalho, em primeiro lugar eu agradeço a Deus e a Maria, pois sem eles, nada seria possível. Em seguida agradeço a minha mãe, Patricia, e ao meu pai de coração, Alexandre, por terem sido minha base e incentivadores durante os 5 anos de curso. Agradeço aos meus irmãos João Daniel, Luis Felipe e Rodolfo José por toda união e força, e às minha cunhadas Úrsula, Libênia e Maria Helena e sobrinhos e sobrinhas por todo o carinho. Agradeço à minha avó Zilar por me ensinar o que é o amor. A Henrique Borges de Moraes Juviano, por todo amor, carinho, paciência, incentivo e me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus colegas de curso, em especial André, Carolina, Fábio, Igor, Isabela, Isadora, João Gabriel, Larissa, Lucas, Maria Helena, Natália, Nicolý, Pedro Victor e todos os outros que estão no meu coração, por terem feito desses 5 anos menos sofridos e por me incentivarem a uma aluna melhor a cada dia. Aos meus colegas do laboratório de Engenharia Bioquímica por terem me acolhido tão bem em 2013 e me ensinado muito mais do que o curso. Um agradecimento especial a Pedro Henrique e Paula Luciana por terem tanta paciência comigo no começo dos meus anos de iniciação científica, a Paulo, Ruthinéia, Carlos, Sérgio, Francinaldo, Victor, Alan, Francisco e todos os outros por todos os conhecimentos, risadas e pastéis compartilhados. E agradeço também a todo o grupo veneno, do Tecbiofar da faculdade de Farmácia da UFRN, coordenado pelo professor Matheus Pedrosa, por todo acolhimento e por terem feito me apaixonar pelo mundo da farmácia, em especial a Allany, Manuela, Nayara e Rafael por tudo que me ensinaram.

Este trabalho também não poderia ser realizado sem toda a minha bagagem de conhecimento adquirida durante todo o curso. Por isso agradeço a todos os professores do Departamento de Engenharia Química, em especial aos professores André, Carlson, Eduardo, Humberto, Magna, Camila, Jackson e Gilson por serem exemplo de docentes e cientistas.

À professora Gorete Ribeiro de Macedo, por ser meu maior exemplo de profissional, por ter me ensinado a me apaixonar pela ciência e ser essa mulher magnânima.

Ao meu orientador, Everaldo Silvino dos Santos, por todos os ensinamentos passados nas disciplinas e no cotidiano no laboratório e principalmente, pela confiança no meu potencial.

E finalmente, mas não menos importante, à Nathália Kelly de Araújo por absolutamente tudo nesses dois anos. Por ser uma professora de vida e profissão, pelo

perfeccionismo, pela paciência, por me fazer sempre uma pessoa melhor, pela amizade. O meu muito obrigada, pois sem você, nada desse trabalho teria se realizado.

DANTAS, Julia Maria de Medeiros. Purificação de quitosanas produzidas por *Bacillus cereus* utilizando cromatografia líquida rápida de proteínas. 2017. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

Orientador: Everaldo Silvino dos Santos. Coorientadora: Nathália Kelly de Araújo

RESUMO:

O Rio Grande do Norte é historicamente um grande produtor e consumidor de camarão, sendo, portanto, um grande gerador dos resíduos provenientes do beneficiamento deste produto. O rejeito do camarão, seu exoesqueleto, é rico em quitina. Esta é matéria prima para obtenção da quitosana, a qual é gerada com a desacetilação da quitina. A quitosana é rica em propriedades biológicas, porém existe dificuldade de manipulação devido a sua baixa solubilidade em água. A hidrólise da quitosana gera quitooligossacarídeos (QOS), que possuem diversas propriedades biológicas, como antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatória e anti-citotóxica, apresenta maior solubilidade em água. A obtenção dos QOS por hidrólise enzimática possui diversas vantagens industriais quando comparada, por exemplo, com a hidrólise ácida. Porém, para a utilização de enzimas em produtos para fins medicinais e farmacêuticos, é necessário que elas possuam um alto fator de purificação. Por isso é importante o desenvolvimento de metodologias de purificação de baixo custo e eficientes para tal produto. Dessa forma, este trabalho foi realizado para avaliar o desempenho do sistema de cromatografia *AKTA Plus* para a purificação de quitosanas produzidas a partir do *Bacillus cereus*. Nosso grupo de pesquisa já realizou trabalho de purificação dessa enzima, porém em cromatografia de bancada. Foi utilizada uma coluna de leito fixo, com resina de troca iônica aniônica (Streamline DEAE), e aplicado um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl na etapa eluição das proteínas da matriz adsorvente. De modo geral o sistema *AKTA Plus* apresentou uma boa performance na purificação da enzima, obtendo o melhor resultado na eluição com uma concentração de 0,25 M de NaCl, com um fator de purificação de 9,54. Na avaliação geral do processo de eluição, a primeira fração integrada (0,05-0,25 M de NaCl) da eluição obteve como resultado um fator de purificação de 2,7. O ponto individual de melhor fator de purificação obteve um rendimento de 7,27% (0,20 M de NaCl) e a fração integrada da eluição com o melhor rendimento (18,96%) foi na faixa de 0,30-0,55 M de NaCl. A purificação dessa enzima utilizando este sistema trouxe um considerável incremento do fator de purificação comparando com a metodologia inicialmente empregada pelo nosso grupo.

DANTAS, Julia Maria de Medeiros Dantas – Purification of chitosanases produced by *Bacillus cereus* using FPLC. Undergraduation final report, UFRN, Bachelor's degree in Chemical Engineering, Natal/RN, Brazil.

Advisor: Santos, Everaldo Silvino dos

ABSTRACT:

Rio Grande do Norte is a historical major producer and consumer of shrimp, thus being a major generator of the residues coming from this product processing. The shrimp residue, its exoskeleton, is rich in chitin. This is raw material for obtaining chitosan, which is generated by chitin deacetylation. Chitosan is rich in biological properties, but it is difficult to manipulate due to its low solubility in water. The chitosan hydrolysis generates chitooligosaccharides (QOS), which have several biological properties as antimicrobial, antitumor, anti-inflammatory and anti-cytotoxic. Obtaining QOS by enzymatic hydrolysis has several industrial advantages when compared, for example, to acid hydrolysis. However, for the use of enzymes in products for medicinal and pharmaceutical purposes, it is necessary that they possess a high purification factor. So, the development of low cost and efficient purification methodologies for these enzymes is important. Purification is a complex step and involves high industrial cost, so it is important that it is going to have few steps and high yield. Thus, this work was carried out to evaluate the performance of the AKTA Plus chromatography system to purify chitosanases produced from *Bacillus cereus*. Our research group has already carried out work of purification of this enzyme, but in bench chromatography. A fixed bed column with anionic ion exchange resin (Streamline DEAE) was used, and a linear gradient of 0 to 1 M NaCl was applied in the elution step of proteins from the adsorbent matrix. In general, the AKTA Plus system showed a good performance in the enzyme purification, obtaining the best elution result with 0.25 M NaCl buffer solution, reaching a purification factor of 9.54. In the overall evaluation of the elution process, the first integrated fraction of the elution resulted in a purification factor of 2.7. The individual point of best purification factor had a yield of 7.27% and the integrated fraction of improved elution performance had a yield of 18.96%. The purification of this enzyme using this system brought a considerable purification factor increase comparing with the methodology initially employed by our group.

SUMÁRIO

Lista de Figuras _____	x
Lista de Tabelas _____	xi
1 INTRODUÇÃO _____	1
2 OBJETIVOS _____	3
2.1 Objetivo Geral _____	3
2.2 Objetivos Específicos _____	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	4
3.1 Quitosana e quitooligossacarídeos _____	4
3.2 Hidrólise da quitosana _____	6
3.3 Bactéria <i>Bacillus cereus</i> e produção enzimática _____	7
3.4 Purificação de proteínas _____	8
3.5 Cromatografia líquida rápida para proteínas e adsorção por troca iônica _____	11
4 METODOLOGIA _____	12
4.1 Cultivo do <i>Bacillus cereus</i> e produção de quitosanases _____	13
4.2 Purificação enzimática _____	13
4.3 Análise da atividade enzimática _____	15
4.4 Análise total de proteínas _____	15
4.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de sódio (SDS- PAGE) _____	16
4.6 Cálculo do fator de purificação e rendimento _____	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES _____	18
5.1 Purificação em sistema FPLC AKTA Start _____	18
5.2 Eletroforese _____	22
5.3 Rendimento das etapas da cromatografia _____	24
6 CONCLUSÕES _____	27
7 REFERÊNCIAS _____	28

Lista de Figuras

Figura 3.1 - Estrutura química da quitosana e dos quitoligossacarídeos. Fonte: Lodhi <i>et al</i> , 2014.	5
Figura 3.2 - Representação do <i>Bacillus cereus</i> . (Fonte: Soares H., 2016)	7
Figura 3.3 - Diagrama de um processo genérico de purificação de produtos biotecnológicos. (Fonte: PESSOA JR; KILIKIAN, 2008)	9
Figura 4.1 - Esquema do Akta start tm com o fracionador de amostras (Fonte: Akta start operating instructions).	13
Figura 4.2 - Fluxograma do funcionamento do Akta start, composto pela válvula de tampão (1), misturador (2), válvula de injeção automática (3), bomba peristáltica (4), sensor de pressão (5), válvula de descarte (6), válvula de injeção manual (7), coluna (8), célula UV (9), célula de condutividade (10), válvula de saída (11) e fracionador (12). (Fonte: Akta start operating instructions)	15
Figura 5.1 - Cromatograma da purificação por leito fixo das quitosanases produzidas pelo <i>B.cereus</i> , submetidas a um gradiente de NaCl durante a eluição. Fonte (Autora, 2017)	19
Figura 5.2 - Cromatograma da purificação de quitosanases produzidas por <i>B.cereus</i> por leito expandido em uma coluna manual, submetidas a uma eluição por stepwise. (Fonte: Araújo <i>et al.</i> , 2016b)	20
Figura 5.3 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida 12%. Linha 1 – marcador de massa molecular (MM), linha 2 – extrato bruto (EB), linhas 3 a 8 – amostras da eluição 20, 22, 23,24,25,26. (Fonte: Autoria própria, 2017)	22
Figura 5.4 - Eletroforese onde M é o marcador molecular, 1 é o extrato bruto, 2 é a carga, 3 é a lavagem, 4 é a eluição com 0,3 M de NaCl, 5 é a eluição com 0,7 M de NaCl. (Fonte: ARAÚJO <i>et al.</i> , 2016b).	23

Lista de Tabelas

Tabela 5.1 – Frações (Tubos) de eluição com melhor fator de purificação e rendimento (Fonte: Autoria própria, 2017).	20
Tabela 5.2 - Performance de cada etapa da purificação (Fonte: Autoria própria, 2017)	25
Tabela 8.1 - Dados obtidos a partir da purificação de quitosanases realizada no sistema AKTA	33

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura é uma atividade econômica muito importante para o estado do Rio Grande do Norte. O estado é berço da atividade e ainda hoje é um dos líderes em exportação do produto (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO, 2011). Além de exportador e responsável pelo abastecimento do mercado interno do país, o RN é um grande consumidor da carne de camarão. Em 2015 o estado foi responsável por 25,5% da produção nacional, com 17.830 mil toneladas (HOJE, 2015).

Devido a essa grande produção, o exoesqueleto do camarão se torna um problema ecológico, tendo em vista que vira resíduo devido a sua extração para a venda do filé do crustáceo. Esta casca é rica em quitina, o segundo biopolímero mais abundante na natureza. Este polissacarídeo e seus derivados possuem ampla aplicação nas áreas de meio ambiente, alimentícia, cosméticos, farmacêutica, médica e odontológica (DIAS *et al.*, 2013).

A quitosana é um derivado da quitina obtida a partir da sua desacetilação. À medida que o grau de desacetilação vai aumentando, a sua solubilidade em água cresce devido às cargas positiva atribuída a mesma (TORRES, 2009). Por ser biocompatível e biodegradável, esta molécula possui diversas propriedades biológicas, como antimicrobiana, antioxidante e analgésica (MARICATO, 2010). Além disso, a despolimerização da quitosana leva a formação de outro produto, cujas propriedades também possuem intensidades diferentes em relação aos dois últimos biomateriais, os Quitoooligossacarídeos (QOS).

A produção dos QOS é feita a partir da hidrólise da quitosana, cuja via pode ser ácida ou enzimática. A hidrólise ácida possui diversas desvantagens tais como a complexidade de controle da reação, o alto gasto de energia e a formação de produtos secundários (LODHI *et al.*, 2014). Por outro lado, o uso de enzimas para a clivagem das ligações glicosídicas apresenta alta especificidade, não necessita de grandes quantidades de energia quando comparada com a ácida, e a formação do produto é de fácil manipulação ao se alterar as condições de reação como o tempo e a temperatura (VASCONCELOS, 2014).

Devido as diversas propriedades medicinais dos QOS como antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatória, ação contra diabetes mellitus (AZUMA *et al.*, 2015; KERCH, 2015; LUO *et al.*, 2014; VELA GUROVIC *et al.*, 2015), e ao seu potencial para uso na área farmacêutica e de alimentos, a enzima utilizada para produção dessa molécula deve apresentar alto fator de purificação. Este processo de purificação pode ser feito de diversas

formas. Cada método tem sua função, vantagens e desvantagens que devem ser consideradas de acordo com o bioproduto em questão. O aumento no número de etapas vai aumentar a purificação do material, porém também vai diminuir o rendimento e, conseqüentemente, elevar o custo de produção (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2008).

Para que ocorra a hidrólise enzimática, se faz necessário a produção da enzima em questão. Esta pode ser produzida por via bacteriana ou fúngica. A enzima é extracelular, o que é útil do ponto de vista econômico já que dispensa a etapa de rompimento celular. Porém, devido aos contaminantes do meio de cultura, células e outras proteínas produzidas pelo microrganismo, se faz necessário a purificação (ARAÚJO *et al.*, 2016a)

A combinação de etapas de purificação em uma única é uma estratégia para a diminuição do número de etapas, como no caso da cromatografia de leito expandido na qual realiza simultaneamente a clarificação e a separação das proteínas (ARAÚJO *et al.*, 2016b). Entretanto, a utilização de sistemas manuais como o utilizado por Araújo *et al.*, (2016b) necessitam de muito tempo e não possuem uma boa reprodutibilidade.

Portanto a utilização de um sistema automatizado de cromatografia pode promover um melhor fator de purificação e uma operação mais rápida. A utilização de sistemas de cromatografia líquida rápida para purificação de enzimas vem se mostrando eficiente (CAMPER; VIOLA, 2009; KARLSSON; NYBERG, 2000; STROMBERG *et al.*, 2005). Assim, este trabalho utilizou um sistema automatizado para avaliar o desempenho da purificação de quitosanase produzida pelo *B. cereus* e comparou os dados gerados como técnica manual já estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral recuperar e purificar quitosanase produzida por *Bacillus cereus* através de cromatografia de troca iônica em sistema *AKTA Plus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da força iônica na eluição da enzima usando uma eluição em gradiente;
- Estimar o rendimento e do fator de purificação das frações individuais coletadas e das etapas integralizadas do processo;
- Comparar os resultados com o perfil de dessorção após aplicação de uma perturbação em forma de degrau na força iônica da fase móvel em um sistema manual;
- Analisar as vantagens de se utilizar um processo automatizado em comparação com um processo manual.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quitosana e quitooligossacarídeos

A quitina é o segundo biopolímero mais presente na natureza, sendo o primeiro a celulose, e está presente na parede celular de fungos e leveduras e, principalmente, no exoesqueleto de artrópodes (DIAS *et al.*, 2013). Ela é constituída de unidades de *N*-acetil-D-glicosamina unidas por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ e é um polímero linear de alta massa molecular (AAM *et al.*, 2010). O que diferencia a quitina da celulose é a substituição do grupo hidroxila no carbono 2 por um grupo amino acetilado, por isso ela apresenta características similares: ser altamente insolúvel em água, pouco reativa quimicamente e ser inelástica (LODHI *et al.*, 2014).

Para transpor essas limitações decorrentes da sua estrutura química, a quitina passa por um processo de desacetilação química, gerando a quitosana, cujas aplicações são bem mais vastas. Esta, por sua vez, é um composto de amino polissacarídeo constituído de unidades de glicosamina, (2-amino-2-deoxi-D-glicose) conectadas linearmente por ligações glicosídicas β -1,4, e que possui diferentes graus de acetilação (KHOR, 2014).

A quitosana é um biomaterial natural com diversas propriedades interessantes. Devido a diminuição da cadeia carbônica após a desacetilação, ela continua a ser insolúvel em pH neutros e básicos, porém passa a ser solúvel em ácidos diluídos (pH < 6,0) devido a protonação dos grupos amino (LODHI *et al.*, 2014). Ao ser solubilizada, ela se torna elástica, formando um gel, de aplicações nas mais diversas áreas como na produção de filmes finos para a indústria de alimentos (MACIEL; FRANCO; YOSHIDA, 2012), na tecnologia de tingimentos de tecidos na indústria têxtil (BILAL *et al.*, 2016; SUBRAMANI; THINAKARAN, 2016) e na indústria farmacêutica na forma de hidrogel (LIU *et al.*, 2016).

Entretanto a quitosana tem a capacidade de se decompor em moléculas menores, devido a instabilidade das ligações glicosídicas frente a agentes hidrolisantes como soluções aquosas de ácidos e enzimas. Quando alcançam um grau de polimerização (GP) inferior a 20 e uma massa molecular média menor que 3900 Da, as moléculas passam a ser chamadas de Quitooligossacarídeos (QOS) (MOURYA; INAMDAR; CHOUDHARI, 2011)(Figura 3.1). A hidrólise, independente da via, vai ocorrer de forma não uniforme ao longo das moléculas, o que vai gerar uma mistura de oligômeros de tamanhos diferentes durante um mesmo tempo de

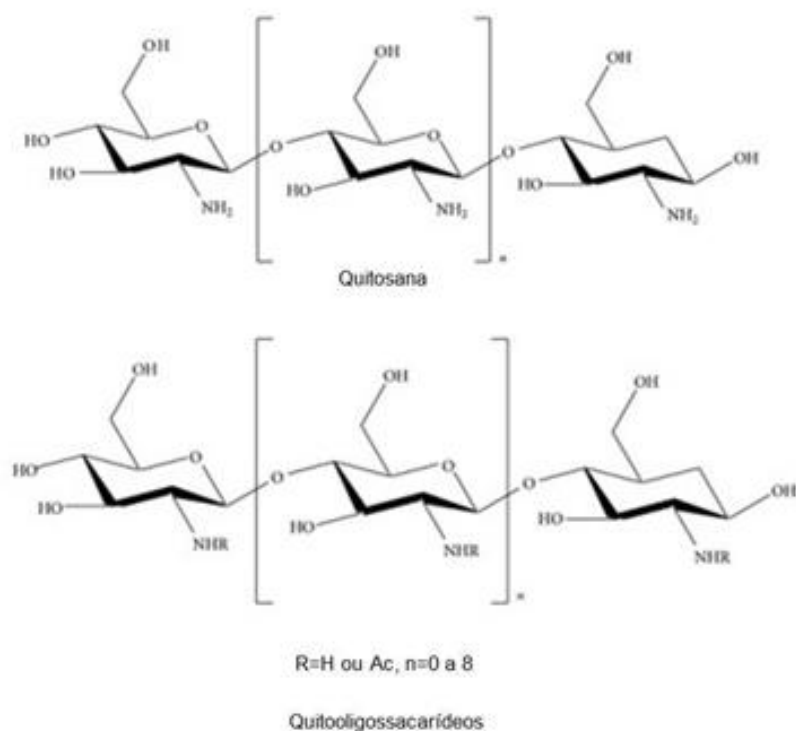


Figura 3.1 - Estrutura química da quitosana e dos quitooligosacarídeos.

Fonte: Lodhi et al, 2014.

reação, salvo os tempos longos o suficiente para que todas as moléculas tenham se transformado em monômeros (glicosamina).

Portanto os QOS podem apresentar diferentes massas moleculares e cargas de diferentes intensidades, cujas peculiaridades irão conferir atividades biológicas diferentes, como anti-inflamatória (AZUMA *et al.*, 2015), antimicrobiana (VELA GUROVIC *et al.*, 2015), antitumoral (MA; QIAN; ZHOU, 2015; XU *et al.*, 2010) e antioxidante (YANG *et al.*, 2017).

Devido a sua biocompatibilidade, os QOS e a quitosana vem sendo estudados como alimentos funcionais e aditivo alimentar para o tratamento de doenças crônicas relacionadas com a idade, como diabetes *mellitus*, colesterol LDL alto e doenças degenerativas como o Alzheimer (KERCH, 2015). A mistura de QOS também apresenta ação antiproliferativa em células tumorais como HepG2 e HeLa *in vitro* (DE ASSIS *et al.*, 2012). E de forma geral, modelos *in vivo* também mostram resultados significativos, por exemplo, nos ensaios antiinflamatório (AZUMA *et al.*, 2015), antitumoral (MASUDA *et al.*, 2014) e imunoestimulante (ZHANG *et al.*, 2014).

3.2 Hidrólise da quitosana

A hidrólise é uma reação química na qual a água rompe ligação de um composto e pode ser catalisada por via ácida ou enzimática. Normalmente, no processo da quebra da ligação glicosídica, a água faz um ataque nucleófilo no carbono polarizado, porém como a quitosana é um polímero, ela vai ter vários carbonos polarizados ao longo da cadeia. Por tanto ao longo da reação de hidrólise, a água vai atacar indefinidamente as ligações, gerando QOS de diferentes GP e sequências das unidades de glicosamina (GlcN) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) (KIM; RAJAPAKSE, 2005).

Atualmente, os QOS são produzidos em larga escala via hidrólise ácida, devido a facilidade de manuseio e obtenção dos reagentes. Porém, o uso de ácido tem como desvantagens o baixo rendimento na produção de QOS, grande produção de D-glicosamina, elevado gasto energético para controlar o caráter exotérmico da reação, formação de compostos secundários e dificuldade do tratamento dos efluentes resultantes (LODHI *et al.*, 2014; MOURYA; INAMDAR; CHOUDHARI, 2011). Podem ser usados ácidos fortes ou moderados como catalisadores, como o clorídrico, nitroso, fosfórico ou hidrofluorídrico. Com isso, este método passa a ser difícil de ser aplicado para a produção de QOS que vão ser usados como biomateriais devido a possibilidade de contaminação.

Dessa forma, a hidrólise enzimática vem se mostrando o método preferível para a produção de QOS bioativos (KIM; RAJAPAKSE, 2005). As ligações glicosídicas são afetadas pela ação de enzimas específicas (quitosanases) e não-específicas (carbohidrolases, proteases, lipases, celulasas, entre outras) (SINHA; CHAND; TRIPATHI, 2016). Essas enzimas podem ser produzidas por bactérias e fungos, sendo uma enzima de ação extracelular. Industrialmente, a utilização do método enzimático tem como vantagens a utilização de temperaturas brandas; alta especificidade da enzima, fazendo com que não haja a formação de subprodutos; e o maior controle da formação do produto por meio do pH, concentração da enzima, temperatura e do tempo de hidrólise (MOURYA; INAMDAR; CHOUDHARI, 2011).

E apesar da quitosana ser um biopolímero composto de apenas um monômero, as ligações glicosídicas podem ser de 4 tipos diferentes devido aos diferentes graus de acetilação da molécula. São elas do tipo A-A (com duas unidades de acetiladas), A-D (uma unidade acetilada e uma desacetilada), D-A (uma desacetilada e outraacetilada) e D-D (com duas desacetiladas). Devido a essa diversidade, mesmo enzimas que são classificadas quitosanases

podem agir de forma diferente no substrato, dependendo da identidade das extremidades reductoras ou não reductoras (MOURYA; INAMDAR; CHOUDHARI, 2011).

3.3 Bactéria *Bacillus cereus* e produção enzimática

O grupo *Bacillus cereus* possui sete espécies segundo a taxonomia atual: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus weihenstephanensis* (GILLIS & MAHILLON, 2014). O grupo consiste em espécies relacionadas pela importância na indústria, pesquisa e medicina, porém ainda há dificuldade para distingui-las em nível intra e inter-espécie (PUNINA *et al.*, 2013). Entretanto, as espécies apresentam funcionalidades distintas, como no caso do *Bacillus cereus* que é um contaminante de alimentos e o *Bacillus thuringiensis*, que produz um bioinseticida para larvas de insetos.

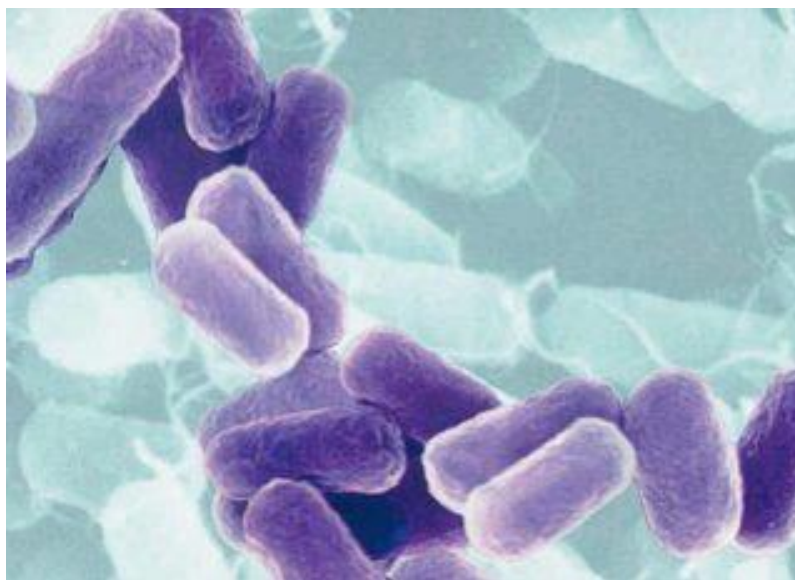


Figura 3.2 - Representação do *Bacillus cereus*. (Fonte: Soares H., 2016)

O *B. cereus* é uma bactéria que pode utilizar diversos biopolímeros como fonte de carbono, por isso ela é bastante encontrada como contaminante de alimentos. Um exemplo foi o *B. cereus* C-01 que mostrou ter a maior atividade quitosanases frente a outras 15 cepas isoladas na mesma localidade (Natal/Brasil, S 05°52'11'', Wo 35°13'08.4''), ao serem dispostas em um meio cuja única fonte de carbono era quitosana (ARAÚJO *et al.*, 2016b). No estudo cinético da reação enzimática, Araújo *et al.* (2016) também confirmou a presença de

duas enzimas diferentes com capacidade de hidrolisar quitosana durante os estudos de purificação. As cepas de *B. cereus* TKU018 (WANG *et al.*, 2009), NTU-FC-4 (CHEN; SU; CHIANG, 2006) e MP-310 (SEO *et al.*, 2014) também se mostraram aptas para a produção de quitosanases.

Em 2004, o Comitê de Nomenclatura de Enzimas definiu quitosanase como enzima capaz de realizar a endohidrólise de ligações β -1,4 entre resíduos de glicosamina (GlcN) em uma molécula de quitosana parcialmente acetilada, a partir da extremidade redutora. Porém, em 2008, o comitê criou uma segunda classe de enzima, a exo- β -D-glicosaminidase que ataca a quitosana a partir de sua terminação não redutora (THADATHIL & VELAPPAN, 2014). ARAÚJO *et al.* (2016) não concluiu quais eram os tipos de enzimas produzidas pela bactéria, mas ficou claro que um mesmo microrganismo pode produzir enzimas diferentes para o mesmo substrato, o que vai gerar uma mistura de produtos diferentes.

Pode-se encontrar outros gêneros bacterianos que produzem quitosanase como o *Serratia sp.* (WANG *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014b), *Janthinobacterium sp.* (JOHNSEN *et al.*, 2010), *Paenibacillus sp.* (DE ARAUJO *et al.*, 2013; ZITOUNI *et al.*, 2013), em fungos como *Metarhizium sp.* (SANTANA *et al.*, 2015) e plantas como o broto de bambu (CHANG *et al.*, 2014).

3.4 Purificação de proteínas

A produção de biomoléculas geralmente envolve um meio de cultivo, no qual o produto alvo está diluído. Para a aplicação medicinal e farmacêutica, é necessário que o grau de pureza da molécula de interesse seja elevado. Por isso, durante a etapa *downstream* da produção, diversas operações unitárias são aplicadas para promover a purificação do produto, como está demonstrado no esquema da Figura 3.3.

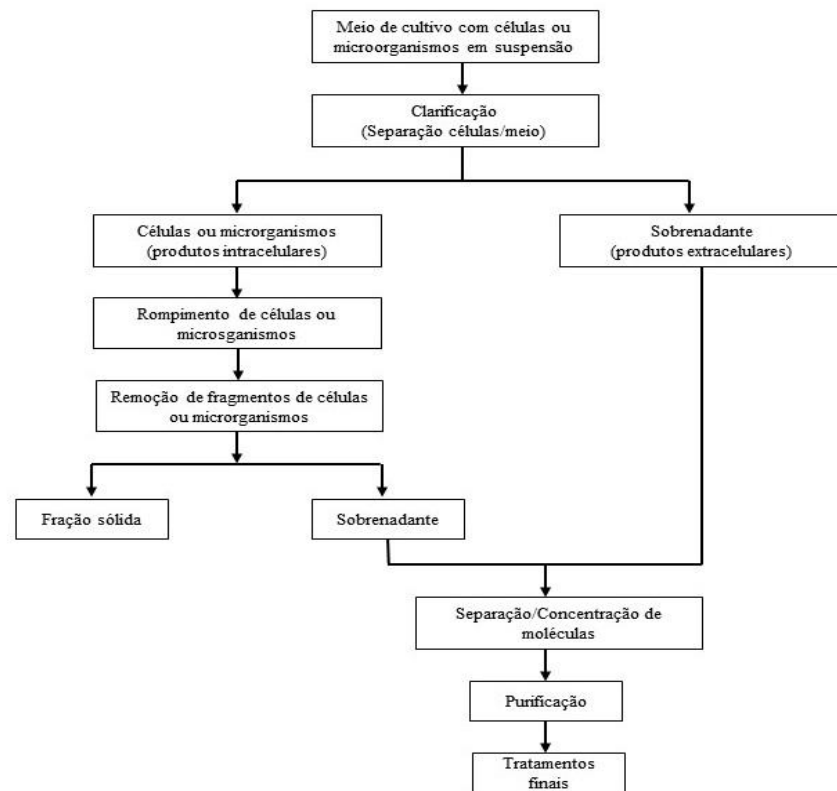


Figura 3.3 - Diagrama de um processo genérico de purificação de produtos biotecnológicos. (Fonte: PESSOA JR; KILIKIAN, 2008)

Operações como centrifugação e filtração são usadas para a clarificação do caldo, ao separar as células e outros sólidos não solubilizados. O rompimento das células pode ser feito por moagem em moinho de bolas, ultra-som, homogeneização e por meio de reações. E finalmente, cada técnica de purificação, seja ela de alta ou baixa resolução, vai envolver operações complexas, e algumas vezes, combinadas entre si, como ultrafiltração, extração líquido-líquido e todos os diferentes princípios que envolvem a cromatografia (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2008)

Todos esses processos de separação são baseados na diferença das características dos componentes da mistura. Para proteínas, a purificação da sua forma ativa pode ser baseada na sua solubilidade, tamanho da molécula e carga. No geral, elas sofrem um processo de concentração (por exemplo, por precipitação), seguida de uma remoção de impurezas (THADATHIL & VELAPPAN, 2014). Na maioria dos casos, o número de etapas no processo inteiro de purificação vai aumentando tal como o grau de pureza necessário (WILKEN & NIKOLOV, 2012).

Para a purificação de quitosanases, vem se empregando o uso de cromatografia por filtração em gel (OH *et al.*, 2011), afinidade (YANG *et al.*, 2007) e troca iônica (NGUYEN *et al.*, 2014). E quando, especificamente, produzidas por *Bacillus cereus*, tem se empregado troca iônica (LIANG *et al.*, 2014), gel filtração (GOO & PARK, 2014).

O princípio da gel filtração é por meio da purificação baseada no tamanho das moléculas. O gel, que é uma matriz de porosidade definida e altamente hidratada, é empacotado em uma coluna. Ao ser injetada uma amostra com uma variedade de moléculas de tamanhos variados, as menores irão penetrar nos poros do gel, enquanto as maiores irão ficar no meio livre. Com a eluição, as de tamanho maior serão carregadas mais facilmente pela fase móvel, criando um gradiente no tamanho médio das partículas que estão saindo na fase móvel no final (LIMA *et al.*, 2007). Quanto mais longa a coluna utilizada para a cromatografia, maior vai ser a resolução, porém o tempo de diluição e separação também vai aumentar (LIMA *et al.*, 2007).

A utilização do sistema de Adsorção em Leito Expandido (ALE) é de grande interesse industrial. É uma técnica que agrega a clarificação e a purificação, diminuindo o número de etapas e, conseqüentemente, o rendimento da purificação. Um dos mecanismos utilizados é a adsorção das moléculas por forças eletrostáticas na matriz adsorvente, cuja característica irão definir se vai ser por afinidade ou troca iônica. A etapa de eluição pode ser, por exemplo, realizada através da mudança da força iônica. Além disso, há a combinação das propriedades hidrodinâmicas do leito fluidizado com as propriedades cromatográficas do leito empacotado (PADILHA, 2013), devido a segregação das partículas da matriz ao longo da coluna, de acordo com o seu tamanho, e do agrupamento dessas camadas, fazendo com que não haja caminhos preferenciais (KILIKIAN; SANTOS, 2008).

Contudo, independente da técnica utilizada para a purificação, o volume eluído deve ser analisado para verificar se o bioproduto apresentou alguma degradação e a sua distribuição durante todo o processo. Para enzimas, a concentração total de proteínas e a atividade enzimática são normalmente analisadas. A partir da atividade enzimática do material bruto e do purificado, se obtém o rendimento da purificação (PADILHA, 2013):

$$\mathbf{Rendimento} (\%) = \frac{\mathbf{Atividade\ enzimática\ do\ material\ purificado}}{\mathbf{Atividade\ enzimática\ do\ material\ bruto}} \times 100$$

Eq.1

Já o fator de purificação identifica o quão eficiente a purificação foi, sendo proporcional à quantidade de enzima e inversamente proporcional à quantidade de proteínas totais (contaminantes) na amostra (PADILHA, 2013):

$$\mathbf{Fator\ de\ purificação} = \frac{\mathbf{Atividade\ específica\ do\ material\ purificado}}{\mathbf{Atividade\ específica\ do\ material\ bruto}}$$

Eq. 2

3.5 Cromatografia líquida rápida para proteínas e adsorção por troca iônica

A quitosanase é uma proteína a qual se vislumbra sua produção industrial por conta das inúmeras aplicações dos QOS, como mencionado acima. Por isso, é importante que a sua purificação seja realizada de forma rápida e eficiente, a fim de diminuir os custos de produção. A utilização de um sistema de cromatografia líquida rápida para proteínas (*Fast Protein Liquid Chromatography* - FPLC) se mostra promissor devido a sua versatilidade ao operar diferentes tipos de técnicas de purificação (CAMPER; VIOLA, 2009).

Por ser um sistema totalmente automatizado, os sistemas de FPLC oferecem uma cromatografia com uma ótima reprodutibilidade (principalmente por poderem ser operados em câmaras frias, retardando o efeito das proteases na proteína de interesse), sendo aplicado para diferentes proteínas que serão utilizadas para fins farmacêuticos e medicinais (KARLSSON; NYBERG, 2000; STROMBERG *et al.*, 2005).

Apesar de em termos de rendimento, a cromatografia automática ter um desempenho similar as cromatografias realizadas manualmente, o fato de a primeira estar sendo monitorada em tempo real pelo sistema de controle, permite que a eluição ocorra até o ponto do gradiente no qual o produto foi eluído. Caso a proteína de interesse saia no começo da eluição, isto representa uma grande economia de tempo e material utilizado (CAMPER; VIOLA, 2009).

Para a adsorção das proteínas, tanto no processo manual (ARAÚJO *et al.*, 2016a) quanto no automatizado, pode ser utilizado como matriz adsorvente uma resina de troca iônica. O conceito dessa técnica consiste na atração entre as proteínas, que são moléculas eletrostaticamente carregadas, e a resina que está carregada com cargas opostas. Após isso, ocorre a competição entre os íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da matriz ou da fase estacionária (PESSOA JR., 2005). O uso de resinas de forma geral é favorável por serem estáveis em situações de estresse físico, ter grande área superficial, rápida sedimentação e permite altas taxas de vazão dos líquidos (WISEMAN, 1985).

A fase estacionária da cromatografia é chamada de matriz ou resina. Cada processo necessita de resinas com características específicas. Elas são normalmente polímeros de alta estabilidade química, mecânica e biológica como: celulose, agarose, dextrana, poliácridamida e poliestireno. Além do tipo de polímero, para a cromatografia de troca-iônica, outro fator

importante são os grupos ionizados na superfície das enzimas. Eles são gerados a partir de resíduos de aminoácidos e o seu balanço de carga (entre grupos negativos e positivos) irá resultar na carga da enzima. A presença destes grupos varia com o pH do meio e quando estão presentes em igual número, temos o ponto isoelétrico (PI). Portanto, existem matrizes carregadas com grupo positivos, como por exemplo as do tipo DEAE (dietilaminoetil) chamadas de ânionicas, e as com grupos negativos, como as do tipo CM (carboxi-metil), chamadas de catiônicas (LIMA *et al.*, 2007).

A cromatografia de troca iônica é comumente empregada na purificação de proteínas por ser uma técnica simples, fácil ampliação de escala, versátil e de alta capacidade de adsorção. A mudança das condições, como a fase estacionária, fase móvel, grupos funcionais e condições de adsorção/dessorção são fundamentais para mudar a finalidade do sistema (PESSOA JR., 2005).

4 METODOLOGIA

Durante todo o trabalho foi utilizada quitosana de baixo massa molecular (90 a 100 kDa e 85% de desacetilação) adquirida da Sigma-Aldrich Co. (Saint-Louis, USA). Para a sua utilização, foi preparada uma solução de 1% m/v, utilizando 0,1 M HCl como solvente (DE ARAUJO *et al.*, 2013). A resina utilizada para a adsorção foi a Streamline DEAE (GE Healthcare Bio-science, Nova Jersey, EUA). Para dosagem de proteínas foi utilizado o kit

BCA Protein Assay Kit da Pierce (Rockford, USA). Demais reagentes e soluções também possuíam alto grau de pureza e foram utilizados conforme recomendações do fabricante.

4.1 Cultivo do *Bacillus cereus* e produção de quitosanases

A cepa de *Bacillus cereus* utilizada foi isolada anteriormente por ARAÚJO *et al.* (2016b) e cultivada de acordo com metodologia descrita pelo mesmo estudo. Em resumo, a



bactéria foi cultivada em alíquotas de 50 mL de meio contendo peptona ($6,0 \text{ g.L}^{-1}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), fosfato dibásico de potássio ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) e quitosana ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$) em Erlenmeyers de 250 mL. Os frascos foram incubados a 120 rpm por 72 h a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (ARAÚJO *et al.*, 2016b). Como a fonte de carbono do meio era a quitosana, as células produziam quitosanase extracelular para a obtenção de energia.

4.2 Purificação enzimática

O processo de purificação das quitosanas se iniciou com a centrifugação do cultivado (caldo bruto) por 20 minutos, 4.000 rpm a $10 \text{ }^\circ\text{C}$, afim de retirar as células. Depois, o sobrenadante foi submetido ao processo de cromatografia de troca iônica para a separação de frações de proteínas.

Para os ensaios de purificação foi utilizado o cromatógrafo AKTA Start (GE Healthcare Bio-science, Nova Jersey, EUA) representado pela Figura 4.1. e a coluna de leito fixo HR 16/5 com um volume de leito de 6 mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia), preenchida com a resina aniônica de troca aniônica contendo o ligante Dietilaminoetil (*streamline* DEAE). Como tampões foram utilizados o tampão A (Tris-HCl 50 mM

Figura 4.1 - Esquema do Akta starttm com o fracionador de amostras (Fonte: *Akta start operating instructions*).

com pH de 8,5) e o tampão B (Tris-HCl 50 mM com pH de 8,5 e NaCl 1 M). Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente.

Toda a corrida cromatográfica ocorreu com uma velocidade superficial da fase móvel de 100 cm.h^{-1} , seguindo o fluxo indicado na Figura 4.2. A coluna foi equilibrada durante 30 minutos com o tampão A, em seguida foi injetado 10 mL do caldo bruto no sistema, afim de saturar a capacidade adsorviva da coluna. Depois, as moléculas não-ligadas foram retiradas do sistema na etapa de lavagem, no qual se utilizou um volume de 30 mL do tampão A. E finalmente, durante a etapa de eluição, foi aplicado um aumento de força iônica na fase móvel em forma de gradiente linear de 0 a 100% do tampão B, visando separar as proteínas de acordo com a força com a qual elas estavam adsorvidas na resina. As amostras foram coletadas a cada 1,8 mL em microtubos de 2 mL pelo fracionador do equipamento. Foram realizadas duas corridas com os mesmos parâmetros para atestar a reprodutibilidade do sistema.

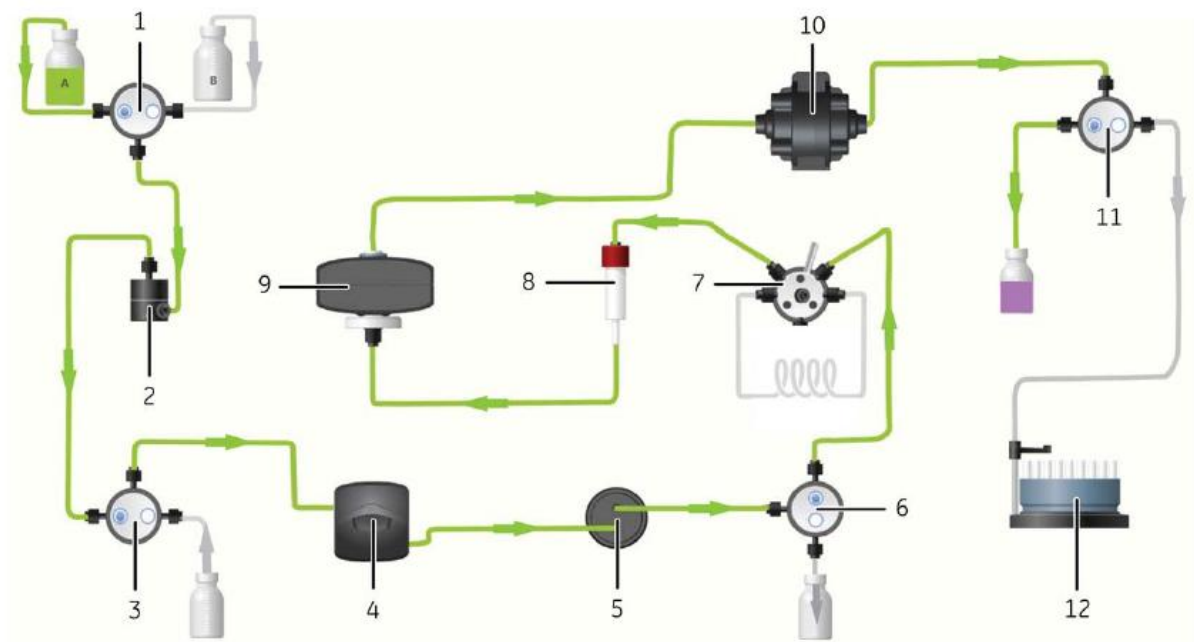


Figura 4.2 - Fluxograma do funcionamento do Akta start, composto pela válvula de tampão (1), misturador (2), válvula de injeção automática (3), bomba peristáltica (4), sensor de pressão (5), válvula de descarte (6), válvula de injeção manual (7), coluna (8), célula UV (9), célula de condutividade (10), válvula de saída (11) e fracionador (12). (Fonte: Akta start operating instructions)

4.3 Análise da atividade enzimática

A atividade enzimática foi analisada através do método colorimétrico do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), usando D-glicosamina como padrão (MILLER, 1959). Amostra de 250 μL do extrato bruto e das alíquotas da purificação foram incubadas com 250 μL da solução de quitosana a 1% (pH 6,0) por 30 minutos a 55 $^{\circ}\text{C}$, em triplicata. Em seguida, foi adicionado 1,3 mL da solução de DNS e incubados em água fervente por 10 minutos. Por fim, foi acrescentado 1,2 mL de água destilada. A absorbância das amostra foi verificada em espectrofotômetro (Thermo Spectronic), a 590 nm. A atividade enzimática foi definida pela unidade U/mL, cuja definição é a quantidade de enzimas necessárias para gerar 1,0 μmol de D-glicosamina por minuto nas condições definidas no ensaio.

4.4 Análise total de proteínas

A concentração de proteínas totais em cada alíquota da purificação e no extrato bruto foi determinada pelo método do ácido bicinonínico, utilizando o kit BCA Protein Assay e Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão. Os ensaios foram realizados segundo instruções

do fabricante e as amostra foram lidas em microplacas de 96 poços. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

As amostras da eluição com melhor fator de purificação foram escolhidas para serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de sulfato dodecil de sódio (SDS) para estimar qualitativamente a pureza das proteínas.

Primeiro, as amostras foram submetidas a uma dessalinização ao ficarem submersas em água destilada, enquanto envoltas em uma membrana de diálise, por 24 h, afim de retirar os sais e evitar interferência dos mesmos durante a realização do ensaio. Em seguida, as amostras foram concentradas no concentrador CentriVap (Labconco, Kansas City, EUA), e depois solubilizadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 0,01% de azul de bromofenol) de forma a estarem todas com a mesma concentração.

Então, elas foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos, segundo a metodologia de Laemmli (1970). Vinte microlitros de cada amostra e do padrão de proteínas foram aplicados no gel. O marcador utilizado foi o *ColorBurst Electrophoresis Marker* (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, EUA) e possuía as seguintes proteínas padrões: miosína (210 kDa), albumina de soro bovino (90 kDa), glutamato desidrogenase (65 kDa), álcool desidrogenase (40 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), lisozima (13 kDa) e aprotinina (8 kDa). Depois de performar a eletroforese, o gel foi corado por nitrato de prata, para a visualização das bandas de proteínas.

4.6 Cálculo do fator de purificação e rendimento

Os resultados de atividade enzimática e concentração de proteína sozinhos não são bons para analisar a eficiência do processo de purificação. A partir desses resultados, podemos calcular a atividade específica, o fator de purificação (FP) e o rendimento, como segue as equações abaixo:

$$\text{Atividade específica (U/mg de proteína)} = \frac{\text{Atividade enzimática (U/ml)}}{\text{Proteínas totais (mg/ml)}} \quad \text{Eq.3}$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade enzimática do material purificado}}{\text{Atividade enzimática do extrato bruto}} \times 100$$

Eq.4

$$FP = \frac{\textit{Atividade específica do material purificado}}{\textit{Atividade específica do extrato bruto}} \quad \text{Eq.5}$$

Todos os parâmetros mencionados acima foram calculados utilizando a ferramenta Excel para todas etapas da cromatografia.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A corrida cromatográfica automatizada para a purificação de quitosanases extracelulares produzidas por *B. cereus* foi realizada para comparação da sua performance com uma purificação da mesma enzima, produzida sob as mesmas condições, porém realizada em um sistema manual de cromatografia de leito expandido (ARAÚJO *et al.*, 2016b). Inicialmente, o sistema automatizado teve a vantagem de possuir um sistema de controle mais preciso, possuindo uma boa reprodutibilidade, e utilizar um volume menor de eluentes e caldo bruto (72 mL no total de cada corrida) e, conseqüentemente, menos tempo, tornando corridas analíticas mais viáveis monetariamente.

Apesar de ARAÚJO *et al.*, (2016b) ter realizado a eluição pelo modo *step wise* (concentração de NaCl de 0,3, 0,7 e 1,0M), o presente estudo avaliou a variação da dessorção das moléculas sob a implementação de um gradiente na concentração de sal, de 0 a 1M (cada tubo com amostra com uma diferença de 0,05M). Tal mudança na metodologia foi realizada para identificar possíveis outros pontos de dessorção em força iônica diferentes, os quais não foram estudados por ARAÚJO *et al.*, (2016b). Além da mudança de *stepwise* para gradiente, o sistema de cromatografia também foi mudado de leito expandido fluidizado para leito fixo, por motivos técnicos.

5.1 Purificação em sistema FPLC AKTA Start

As amostras resultantes da purificação foram analisadas individualmente em relação à sua concentração de proteína e a atividade enzimática para que fosse obtido o fator de purificação e rendimento do processo. A Figura 5.1. representa o comportamento da variação da concentração de proteínas e da atividade enzimática ao longo das etapas da cromatografia: carga, lavagem e eluição.

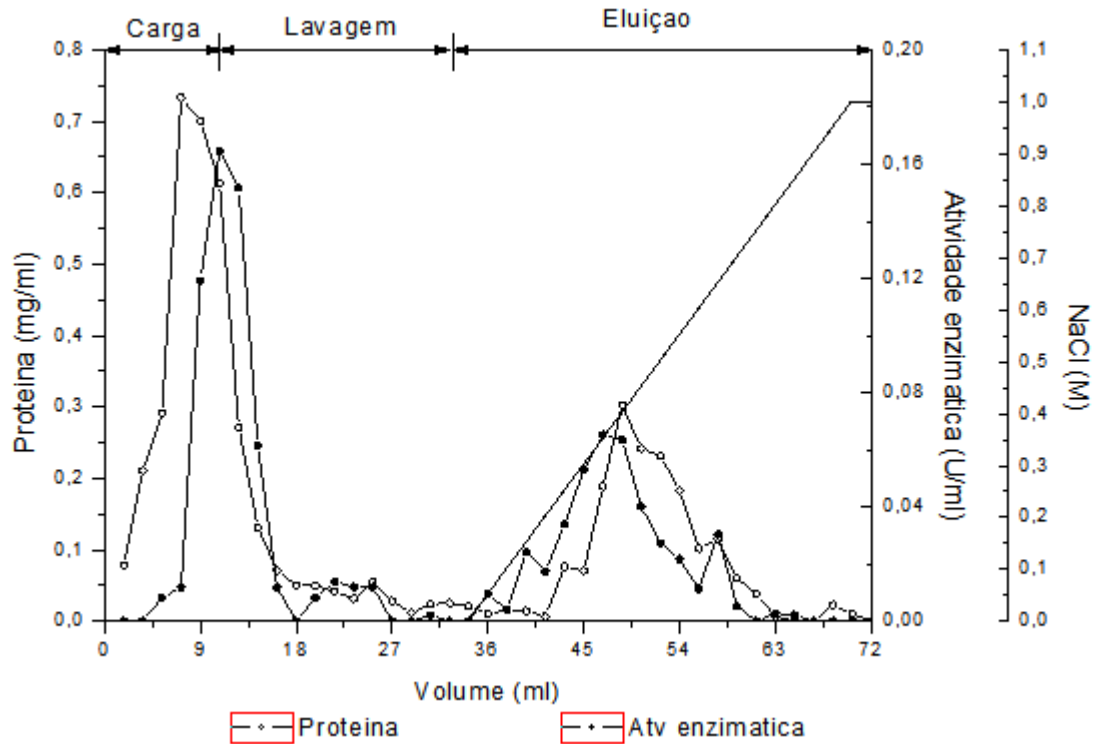


Figura 5.1 - Cromatograma da purificação por leito fixo das quitosanases produzidas pelo *B.cereus*, submetidas a um gradiente de NaCl durante a eluição. Fonte (Autora, 2017)

Pelo gráfico, pode-se observar a variação das duas respostas analisadas durante toda a corrida. No primeiro momento da carga, ocorre o maior pico de atividade enzimática e da concentração de proteína, devido a saturação da resina, uma vez que a quantidade de caldo bruto foi injetado em um volume superior à capacidade de adsorção da coluna. Ao decorrer da lavagem, pode-se identificar a queda progressiva da quantidade de enzima presente na fase móvel, tendo em vista que a função dessa etapa é carrear as moléculas não adsorvidas à matriz da coluna.

Durante a fase de eluição, a carga de proteína e atividade enzimática aumentaram proporcionalmente ao aumento da força iônica da fase móvel, até aproximadamente 0,4 M, decrescendo em seguida. Porém, apesar das duas curvas possuírem um comportamento parecido, há três picos de atividade enzimática (0,15, 0,35 e 0,7 M de NaCl), apresentando comportamento similar aos degraus estudados por ARAÚJO *et al.*, (2016b), na Figura 5.2.

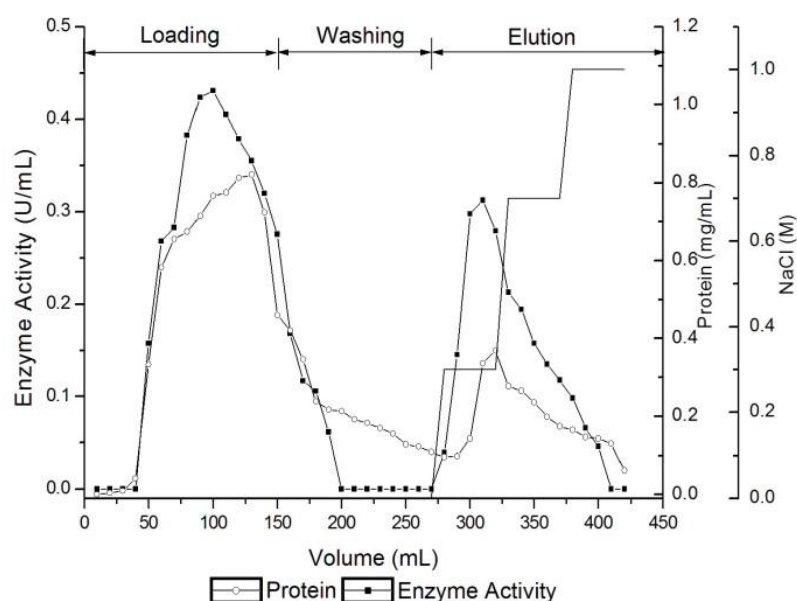


Figura 5.2 - Cromatograma da purificação de quitosanases produzidas por *B.cereus* por leite expandido em uma coluna manual, submetidas a uma eluição por *stepwise*. (Fonte: Araújo et al., 2016b)

A Tabela 5.1. possui os pontos nos quais se obteve melhor fator de purificação durante a eluição. Considerando que ARAÚJO *et al.*, (2016b) obteve os seus melhores resultados no degraú de 0,3 M, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com esse trabalho já que o melhor fator de purificação foi encontrado para eluição com 0,20M de NaCl, portanto, dentro da faixa englobada pelo degraú (0 – 0,3 M) implantado por ARAÚJO *et al.*, (2016). É importante ressaltar que as amostras com um maior fator de purificação não são necessariamente as que possuem uma maior concentração de atividade enzimática.

Tabela 5.1 – Frações (Tubos) de eluição com melhor fator de purificação e rendimento (Fonte: Autoria própria, 2017).

Tubos	NaCl (M)	Atv.Enzimática (U/mL)	Proteínas		FP	Rendimento (%)
			Totais (mg/mL)	Atv.Específica		
20	0,05	0,009	0,010	0,975	3,381	3,94
22	0,15	0,024	0,014	1,710	5,929	10,08
23	0,20	0,017	0,006	2,735	9,543	7,27
24	0,25	0,034	0,076	0,447	1,550	14,19
25	0,30	0,053	0,070	0,753	2,609	22,12
26	0,35	0,065	0,188	0,346	1,200	27,25

Tendo como exemplo o tubo 26, com uma atividade enzimática quase 4 vezes maior que o tubo 23 e possuindo maior rendimento dentre todas as amostras selecionadas, é também o tubo com menor fator de purificação, devido a grande quantidade de contaminantes. Comparando os tubos 24 com o 25, ambos com uma concentração de proteínas totais similares (0,076 e 0,070 mg/mL), percebe-se que o fator de purificação quase dobra, devido a diferença da atividade enzimática entre as duas. Portanto, de fato, percebe-se que, apesar das duas possuírem quantidades de proteínas similares, a amostra 25 possui menos proteínas contaminantes do que a amostra 24. O tubo 23, eluído com tampão 0,2 M de NaCl, é o que possui um dos rendimentos mais baixo e uma das menores atividade enzimática, porém também possui a menor concentração de proteínas totais, lhe conferindo o maior fator de purificação.

Ao calcular a área abaixo das curvas de concentração de proteínas e atividade enzimática da Figura 5.1., obtém-se o resultado integrado das etapas da purificação. E ao comparar os dados calculados com a Figura 5.1., percebe-se que as amostras correspondentes aos maiores picos (volume de 48,6 mL) não correspondem aos melhores resultados em termo de purificação.

Ambas as curvas (atividade enzimática e concentração proteica) possuem um comportamento parecido, afinal as enzimas vão entrar na soma da quantidade de proteína total. Entretanto, os melhores resultados gráficos se dão nos pontos onde há uma diferença visível entre o comportamento da atividade enzimática e da concentração de proteínas. Como por exemplo no começo da eluição, entre 36 e 43 mL, onde a linha de atividade enzimática está sempre acima da linha de proteínas totais.

A partir dos 0,35 M de NaCl, os valores de atividade enzimática iniciam declínio de forma bem mais acentuada que a concentração de proteínas totais. Isto resulta em baixo desempenho do fator de purificação nas amostras seguidas, inclusive com a linha da concentração de proteínas estando sempre acima da de atividade enzimática. Por volta de 0,65 M de NaCl, existe outro pico de atividade enzimática, porém sem magnitude capaz de exceder a concentração de proteínas totais, explicitando que, apesar da possibilidade de haver outra enzima neste pico, a amostra possui ainda muitos contaminantes.

5.2 Eletroforese

Para analisar qualitativamente a composição das amostras citadas na Tabela 5.1. foi realizada uma eletroforese de SDS-PAGE, segundo mostra a Figura 5.3 abaixo.

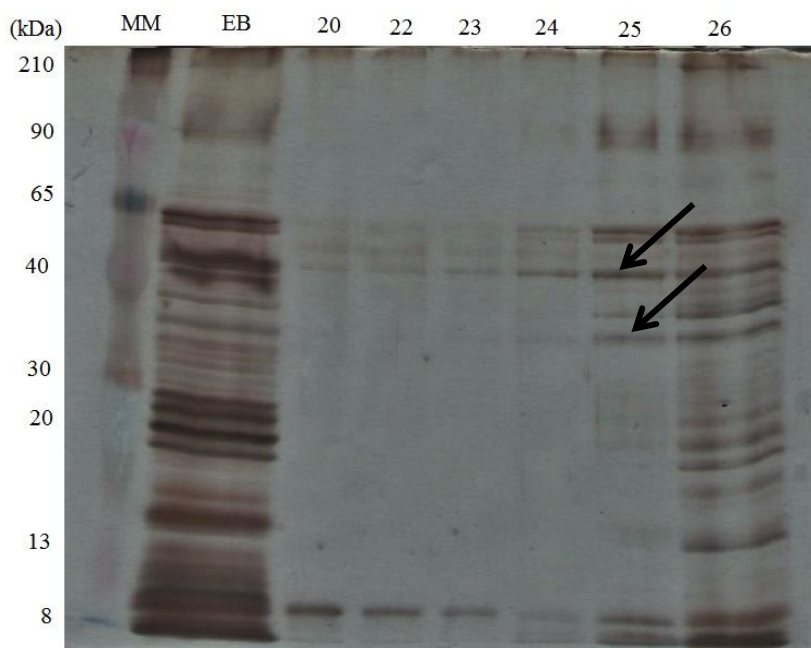


Figura 5.3 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida 12%. Linha 1 – marcador de massa molecular (MM), linha 2 – extrato bruto (EB), linhas 3 a 8 – amostras da eluição 20, 22, 23,24,25,26. (Fonte: Autoria própria, 2017)

Visualmente, as amostras 20, 22, 23 e 24 possuem uma purificação melhor do que as etapas de eluição realizada por ARAÚJO *et al.*, (2016b) representado na figura 5.4., devido a claridade das bandas de contaminantes nas colunas da Figura 5.3. Tal observação pode ser confirmada pelo fato de que nesse trabalho foi possível obter um fator de purificação máximo de 9,543 enquanto que ARAÚJO *et al.*, obteve 1,75.

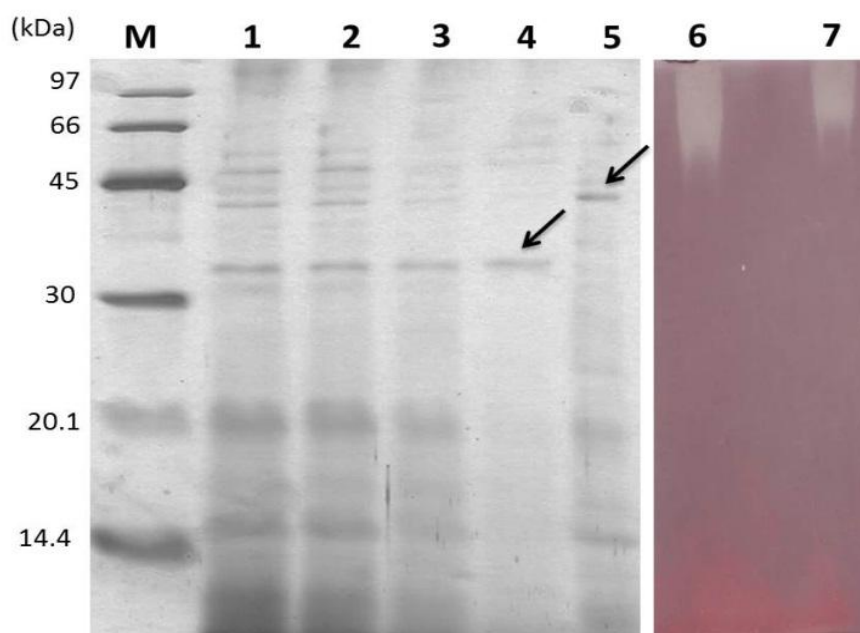


Figura 5.4 - Eletroforese onde M é o marcador molecular, 1 é o extrato bruto, 2 é a carga, 3 é a lavagem, 4 é a eluição com 0,3 M de NaCl, 5 é a eluição com 0,7 M de NaCl. (Fonte: ARAÚJO *et al.*, 2016b).

Como discutido no item 5.1., observa-se a grande quantidade de contaminantes presentes na amostra 26, na qual apesar das bandas estarem bem escuras, indicando alta concentração, a grande quantidade de bandas é resultado das diferentes proteínas que compunha a referida amostra. As amostras 23 e 24 quase não possuem bandas contaminantes, justificando o seu alto grau de purificação calculado pelas análises anteriores.

Utilizando a migração relativa das amostras em relação ao padrão, pode-se chegar às massas moleculares aproximadas das bandas indicadas pelas setas da Figura 5.3. Elas foram de aproximadamente 45,9 kDa e 29 kDa. Esses dados confirmam o resultado obtido por ARAÚJO *et al.*, (2016b), de 44 kDa e 33 kDa para as bandas apontadas na figura 5.4. A divergência de valores de massa molecular pode ter se dado devido a utilização de marcadores diferentes entre os ensaios e porque a determinação das massas moleculares foi feita por massa aparente, um método menos exato do que a densitometria.

Ao comparar as linhas 20 – 24 com o extrato bruto (EB) da Figura 5.3, nota-se que a eluição utilizando as condições adotadas nesse trabalho, favoreceram à purificação da enzima de 45,9 kDa, tendo em vista a diminuição no número de bandas visualizadas. . Na amostra

com maior fator de purificação (amostra 23), destacam-se apenas quatro bandas de proteínas, entre elas a que pela comparação da massa molecular (49,5 kDa) com a literatura é uma quitosanase. A outra quitosanase indicada por ARAÚJO *et al.*, (2016b) aparece nas amostras 25 e 26, sendo a de aproximadamente 29 kDa, entretanto tais amostras não possuem um alto grau de pureza, sendo necessário implementar outras etapas de purificação.

Outros estudos obtiveram quitosanasas purificadas de massas moleculares similares. KURAKAKE *et al.* (2000) purificaram uma quitosanase de 45 kDa a partir do cultivo de uma cepa de *B. cereus* S1. Outra quitosanase de 43 kDa foi produzida por uma cepa de *B. cereus* TKU030 e também foi purificada utilizando cromatografia de troca-iônica com uma matriz DEAE (LIANG *et al.*, 2014).

Quitosanasas produzidas por outras cepas do gênero *Bacillus* de massa molecular semelhantes também foram encontradas na literatura. Um exemplo foi a purificação de quitosanasas produzidas por *B. licheniformis* e submetidas a três etapas de purificação (precipitação, cromatografia de troca iônica e filtração em gel), obteve uma enzima 45 kDa (MUSLIM *et al.*, 2016). Outros microrganismos também produzem quitosanasas de massa molecular similar, segundo a literatura. Como exemplos temos a enzima de 49 kDa produzida pelo *Penicillium janthinellum* D4 (NGUYEN *et al.*, 2014) e a enzima de 45 kDa produzida por *Metarhizium anisopliae* (SANTANA *et al.*, 2015),

5.3 Rendimento das etapas da cromatografia

Para uma visualização geral do desempenho da purificação, os valores de atividade enzimática, concentração de proteínas, atividade específica, fator de purificação e rendimento foram calculadas de forma integrativa pelo gráfico gerado pelos pontos individuais (Tabela 5.2). Os resultados obtidos representam os desempenhos gerais de cada etapa. Como foi realizado um gradiente na força molar da fase móvel da eluição, os resultados foram divididos em partes iguais para a integração dos valores, sendo a primeira parte correspondente as amostras obtidas com tampões com concentrações entre 0,05 M e 0,25 M, o segundo entre 0,30 M e 0,50 M, o terceiro entre 0,55 M e 0,75 M e o quarto entre 0,80 M e 1 M.

Tabela 5.2 - Performance de cada etapa da purificação (Fonte: Autoria própria, 2017)

Etapas	Atv. Enzimática (U)	Proteínas (mg)	Atv. Específica	FP	Rendimento (%)
EB	2,394	8,30	0,288	1,00	100
Carga	0,680	4,90	0,139	0,48	28,40
Lavagem	0,350	1,19	0,294	1,02	14,61
Eluição 1	0,132	0,17	0,776	2,70	5,51
Eluição 2	0,454	1,72	0,264	0,92	18,96
Eluição 3	0,150	1,07	0,140	0,49	6,26
Eluição 4	0,017	0,10	0,170	0,59	0,71

Durante a eluição, a fração eluída com um gradiente entre 0,05 M e 0,25 M de NaCl foi a que obteve melhor fator de purificação (2,70), sendo superior ao obtido por ARAÚJO *et al.* (2016b), porém confirmando os seus resultados, tendo em vista que o seu melhor resultado de fator de purificação (1,75) foi obtido na eluição realizada com o tampão de menor força iônica (0,3 M de NaCl).

É importante frisar que o fator mais importante em relação a indicação de uma purificação efetiva é o fator de purificação e não o rendimento. O rendimento só diz respeito a quantidade de atividade enzimática recuperada em relação ao extrato bruto, portanto, não relata sobre possíveis proteínas contaminantes que possam estar presentes.

Observando a atividade específica das 4 fases da eluição, pode-se perceber que várias proteínas contaminantes que foram eluídas com o tampão com 0,30 M de NaCl (eluição 2) não foram eluídas com tampão com concentrações de sal menores ou igual a 0,25 M de NaCl (eluição 1). O crescimento da concentração de proteínas totais na fração 2 da eluição expõe a quantidade de proteínas contaminantes que são eluídas em concentrações maiores de sal. Nos pontos individuais, as maiores concentrações de proteína se dão nos pontos com concentração de 0,35 M e 0,40 M de NaCl. Portanto, as proteínas de interesse tendem a sofrer a dessorção da matriz com fase móvel com força iônica próximas a de outras proteínas contaminantes, tornando a faixa concentração de sal mais específica para a eluição de tais moléculas.

Ao realizar o balanço de massa da atividade enzimática e da concentração de proteínas, nota-se que ambos os balanços não correspondem ao esperado. No caso da atividade enzimática, a soma das etapas apresenta um total de 1,783 U, indicando um valor

menor do que o do extrato bruto (2,394 U). Tal fato pode ser explicado pela desnaturação das enzimas durante o processo de purificação e de descongelamento das amostras para a realização das análises. Já com relação as proteínas, o somatório das etapas deu um total de 9,148 mg, superior à quantidade de proteínas no extrato bruto (8,30 mg). Tal desencontro de valores pode se dá pela interferência do sal no método de quantificação de proteínas, como foi mostrado por DE SOUSA JUNIOR *et al.* (2015).

6 CONCLUSÕES

Este estudo foi realizado afim de avaliar a purificação de quitosanases obtida pelo *B. cereus* utilizando o sistema FPLC AKTA Start. Além disso foi possível determinar a melhor concentração de NaCl na fase móvel de eluição para a purificação das quitosanases. A utilização do AKTA teve como benefícios o menor tempo de corrida, menor volume de fase móvel utilizada e uma melhor reprodutibilidade, melhor fator de purificação e melhor rendimento quando comparado com o sistema manual de cromatografia empregado por ARAÚJO *et al*(2016b).

O melhor resultado foi obtido com a eluição com uma concentração de 0,2 M de NaCl, com um fator de purificação de 9,54, o que é bom industrialmente, tanto pela baixa concentração de sal presente na amostra, não sendo necessário diálise para certas aplicações quanto pela diminuição do tempo de eluição.

A melhor taxa de concentração de sal na fase móvel para eluir as quitosanases foram as concentrações de 0,05 a 0,25 M de sal, onde foi possível obter um fator de purificação de 2,7. Foi possível identificar pela eletroforese as duas enzimas anteriormente identificadas por ARAÚJO *et al* (2016b), entretanto o método foi mais eficaz para purificar a enzima de 45,9 kDa. A enzima de 29 kDa foi visualizada durante a eluição, porém em amostras com baixo grau de pureza, o que indica que a sua eluição ocorre com uma força iônica similar a de outras proteínas contaminantes. Este fato, leva a hipótese de que para a purificação da enzima de menor massa molecular, talvez outros métodos sejam mais efetivos. De modo geral, o método de cromatografia implementado neste trabalho otimizou a purificação das quitosanases quando comparado com o desempenho da purificação de ARAÚJO *et al*(2016b).

7 REFERÊNCIAS

AAM, B. B. *et al.* Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. p. 1482–1517, 2010.

ARAÚJO, N. K. DE *et al.* Recovery and purification of chitosanase produced by *Bacillus cereus* using expanded bed adsorption and central composite design. **Journal of separation science**, v. 39, n. 4, p. 709–716, 2016a.

ARAÚJO, N. K. DE *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Single-step purification of chitosanases from *Bacillus cereus* using expanded bed chromatography. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 291–298, 2016b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **História da carcinicultura no Brasil**. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/historia-da-carcinicultura-no-brasil/>>. Acesso em: 10 maio. 2017.

AZUMA, K. *et al.* Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 448–456, 2015.

BILAL, M. *et al.* Chitosan beads immobilized manganese peroxidase catalytic potential for detoxification and decolorization of textile effluent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 181–189, 2016.

CAMPER, D. V; VIOLA, R. E. Fully automated protein purification. **Analytical Biochemistry**, v. 393, n. 2, p. 176–181, 2009.

CHANG, Y. M. *et al.* In vitro and in vivo safety evaluation of low molecular weight chitosans prepared by hydrolyzing crab shell chitosans with bamboo shoots chitosanase. **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, n. June, p. 10–16, 2014.

CHEN, Y. L.; SU, C. K.; CHIANG, B. H. Optimization of reversed micellar extraction of chitosanases produced by *Bacillus cereus*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 752–758, 2006.

DE ARAUJO, N. K. *et al.* Production of enzymes by *paenibacillus chitinolyticus* and *paenibacillus ehimensis* to obtain chitooligosaccharides. **Applied Biochemistry and**

Biotechnology, v. 170, n. 2, p. 292–300, 2013.

DE ASSIS, C. F. *et al.* Chitooligosaccharides antagonize the cytotoxic effect of glucosamine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1097–1105, 2012.

DE SOUSA JUNIOR, F. C. *et al.* Recovery and purification of recombinant 503 antigen of *Leishmania infantum chagasi* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 986, p. 1–7, 2015.

DIAS, K. B. *et al.* Chitin and chitosan : Characteristics , uses and production current perspectives Quitina e quitosana : Características , perspectivas atuais de produção utilizações. v. 4, p. 184–191, 2013.

HOJE, M. **RN é o segundo maior produtor de camarão de 2015**. Disponível em: <<http://mossorohoje.com.br/noticias/12099/8203rn-e-segundo-maior-produtor-de-camarao-em-2015>>. Acesso em: 8 jun. 2017.

KARLSSON, K.; NYBERG, F. Purification of Substance P endopeptidase activity in the rat ventral tegemental area with the Akta-Purifier chromatographic system q. v. 893, p. 107–113, 2000.

KERCH, G. The potential of chitosan and its derivatives in prevention and treatment of Age-related diseases. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 2158–2182, 2015.

KHOR, E. Traditional Chitin and Chitosan Biomaterials Research. In: **Chitin (Second Edition)**. 2. ed. Oxford: Elsevier Ltd, 2014. p. 29–50.

KILIKIAN, B. V.; SANTOS, E. S. DOS. Cromatografia: adsorção em leito expandido (ALE). In: **Purificação de processos biotecnológicos**. 1. ed. [s.l.] Manole, 2008. p. 268–279.

KIM, S. K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 4, p. 357–368, 2005.

LIANG, T. W. *et al.* Purification of chitinase/chitosanase from *Bacillus cereus* and discovery of an enzyme inhibitor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 8–14, 2014.

LIMA, U. DE A. *et al.* Purificação de enzimas. In: **Biotecnologia industrial: processos fermentativos enzimáticos**. 2. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2007. p. 377–389.

LIU, L. *et al.* In situ forming hydrogels based on chitosan for. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 6, p. 673–683, 2016.

LODHI, G. *et al.* Chitooligosaccharide and Its Derivatives: Preparation and Biological Applications. v. 2014, 2014.

LUO, Z. *et al.* Downregulation of CD147 by chitooligosaccharide inhibits MMP-2 expression and suppresses the metastatic potential of human gastric cancer. **Oncology Letters**, v. 8, n. 1, p. 361–366, 2014.

MA, J. X.; QIAN, L.; ZHOU, Y. Stimulation effect of chitosan on the immunity of radiotherapy patients suffered from lung cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 195–198, 2015.

MACIEL, V. B. V; FRANCO, T. T.; YOSHIDA, C. M. Sistemas Inteligentes de Embalagens Utilizando Filmes de Quitosana como Indicador Colorimétrico de Temperatura Alternative Intelligent Material for Packaging Using Chitosan Films. v. 22, p. 318–324, 2012.

MASUDA, S. *et al.* Anti-tumor properties of orally administered glucosamine and N-acetyl-d-glucosamine oligomers in a mouse model. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 783–787, 2014.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N.; CHOUDHARI, Y. M. Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications. v. 53, n. 7, p. 583–612, 2011.

MUSLIM, S. N. *et al.* Chitosanase purified from bacterial isolate *Bacillus licheniformis* of ruined vegetables displays broad spectrum biofilm inhibition. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 257–262, 2016.

NGUYEN, A. D. *et al.* Production and purification of a fungal chitosanase and chitooligomers from *Penicillium janthinellum* D4 and discovery of the enzyme activators. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, n. 1, p. 331–337, 2014.

PADILHA, C. E. A. Recuperação e purificação de quitosanas usando adsorção em leite expandido com streamline DEAE com modelagem e simulação usando redes neurais. **2013. 129f. Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro

de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal, RN, 2013

PESSOA JR., A. Cromatografia de troca-iônica. In: PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. (Eds.). . **Purificação de processos biotecnológicos**. 1. ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2005. p. 196–211.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. Introdução. In: **Purificação de processos biotecnológicos**. 1. ed. [s.l.] Editora Manole Ltda, 2008. p. 1–5.

SANTANA, S. C. DE *et al.* Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Enhancing purification of chitosanase from *Metarhizium anisopliae* by expanded bed adsorption chromatography using Doehlert design. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 727–736, 2015.

SEO, D. J. *et al.* Expression patterns of chitinase and chitosanase produced from *Bacillus cereus* in suppression of phytopathogen. **Microbial Pathogenesis**, v. 73, n. 1, p. 31–36, 2014.

SINHA, S.; CHAND, S.; TRIPATHI, P. Recent Progress in Chitosanase Production of Monomer-Free Chitooligosaccharides: Bioprocess Strategies and Future Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 5, p. 883–899, 2016.

STROMBERG, P. *et al.* Preparative parallel protein purification (P4). v. 818, p. 11–18, 2005.

SUBRAMANI, S. E.; THINAKARAN, N. Isotherm , kinetic and thermodynamic studies on the adsorption behaviour of textile dyes onto chitosan. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 106, p. 1–10, 2016.

VASCONCELOS, M. W. Chitosan and chitooligosaccharide utilization in phytoremediation and biofortification programs: current knowledge and future perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. November, p. 616, 2014.

VELA GUROVIC, M. S. . C *et al.* Chitooligosaccharides as novel ingredients of fermented foods. **Food and Function**, v. 6, n. 11, p. 3437–3443, 2015.

WANG, S. L. *et al.* Conversion and degradation of shellfish wastes by *Bacillus cereus* TKU018 fermentation for the production of chitosanases and bioactive materials. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 111–117, 2009.

WISEMAN, A. Large-scale extraction and purifications of enzymes. In: WISEMAN, A. (Ed.). . **Handbook of enzyme biotechnology**. 2. ed. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1985. p. 35–38.

XU, Q. *et al.* Chitooligosaccharides protect human embryonic hepatocytes against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. **Mar Biotechnol (NY)**, v. 12, n. 3, p. 292–298, 2010.

YANG, F. *et al.* Application of chitooligosaccharides as antioxidants in beer to improve the flavour stability by protecting against beer staling during storage. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 2, p. 305–310, 2017.

ZHANG, P. *et al.* Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 254–261, 2014.

8 ANEXO

Tabela 8.1 - Dados obtidos a partir da purificação de quitosanases realizada no sistema AKTA

Tubo	Volume (ml)	NaCl (M)	Ativ. Enzimática (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica	FP	Rendimento
E.B.	-	-	0,239	0,83	0,288	-	-
1	1,8	-	0	0,078	0,000	0,000	0,000
2	3,6	-	0	0,211	0,000	0,000	0,000
3	5,4	-	0,008	0,291	0,028	0,098	3,424
4	7,2	-	0,012	0,733	0,016	0,056	4,961
5	9	-	0,119	0,700	0,170	0,590	49,791
6	10,8	-	0,165	0,613	0,269	0,931	68,747
7	12,6	-	0,152	0,271	0,559	1,938	63,368
8	14,4	-	0,062	0,131	0,470	1,628	25,711
9	16,2	-	0,012	0,070	0,169	0,585	4,961
10	18	-	0,000	0,050	0,004	0,015	0,094
11	19,8	-	0,008	0,049	0,167	0,578	3,424
12	21,6	-	0,014	0,041	0,331	1,148	5,730
13	23,4	-	0,012	0,031	0,378	1,312	4,961
14	25,2	-	0,012	0,054	0,219	0,759	4,961
15	27	-	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000
16	28,8	-	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000
17	30,6	-	0,002	0,024	0,088	0,303	0,862
18	32,4	-	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000
19	34,2	-	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000
20	36	0,05	0,009	0,010	0,975	3,381	3,936
21	37,8	0,1	0,004	0,016	0,247	0,857	1,631
22	39,6	0,15	0,024	0,014	1,710	5,929	10,084
23	41,4	0,20	0,017	0,006	2,753	9,543	7,267
24	43,2	0,25	0,034	0,076	0,447	1,550	14,183
25	45	0,30	0,053	0,070	0,753	2,609	22,124
26	46,8	0,35	0,065	0,188	0,346	1,200	27,248
27	48,6	0,40	0,063	0,303	0,209	0,726	26,479
28	50,4	0,45	0,040	0,241	0,166	0,576	16,745

29	52,2	0,50	0,027	0,231	0,118	0,408	11,365
30	54	0,55	0,022	0,183	0,119	0,411	9,060
31	55,8	0,60	0,011	0,102	0,111	0,384	4,705
32	57,6	0,65	0,030	0,114	0,265	0,918	12,646
33	59,4	0,70	0,005	0,060	0,086	0,298	2,143
34	61,2	0,75	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000
35	63	0,80	0,003	0,006	0,465	1,611	1,119
36	64,8	0,85	0,002	0,000	0,000	0,000	0,862
37	66,6	0,90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
38	68,4	0,95	0,000	0,022	0,010	0,035	0,094
39	70,2	1	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000
40	72	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000