



# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
FCF/USP



AULA:

## PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS I

Prof. Dr. Tales Alexandre Costa e Silva  
costa.silva@usp.br



Disciplina: FBT 0535 - BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA – Novembro de 2020

BEATRIZ VAHAN KILIKIAN  
ADALBERTO PESSOA JR.  
COORDENADORES

# PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

Operações e processos com aplicação industrial

2ª edição revista e ampliada

Blucher



## Purificação de Produtos Biotecnológicos

Operações e processos com  
aplicação industrial

Coordenadores:  
Beatriz Vahan Kilikian  
Adalberto Pessoa Jr.

2020 — 2ª edição

# ESQUEMA RESUMIDO DA OBTENÇÃO DE UM ENZIMA MICROBIANA

Isolamento → Seleção → Otimização → Purificação → Aplicação

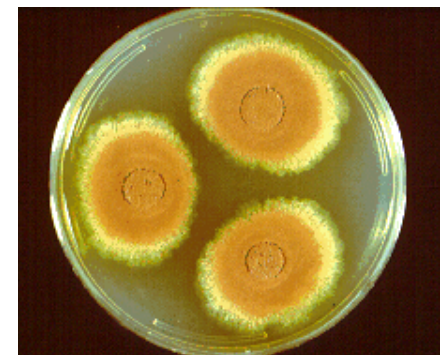
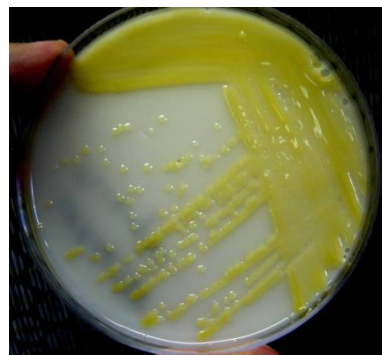
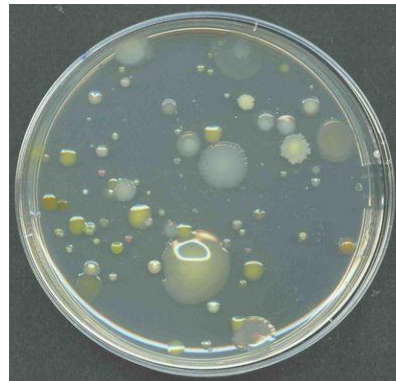
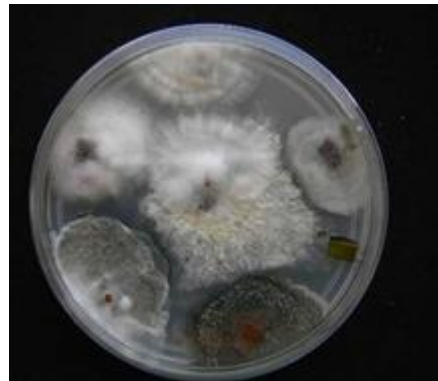
## ISOLAMENTO:

- Diferentes habitats - Condições extremas / biomas com características próprias
  - Resíduos lipídicos (Lipase) / vegetais em decomposição (celulases)



# ISOLAMENTO:

- Obtenção de linhagens puras



# SELEÇÃO:

- Diferentes técnicas / diferentes substratos = Tipo de enzimas



Sangue

Sacarose

Aminoácidos

Óleo vegetal

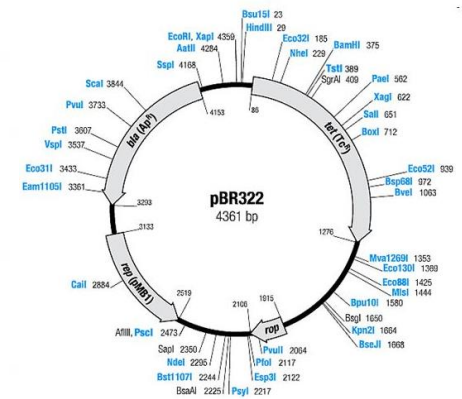


Resíduos vegetais

# ESQUEMA RESUMIDO DA OBTENÇÃO DE UM ENZIMA MICROBIANA

## OTIMIZAÇÃO:

- meio de cultivo / Shaker / Biorreator
- cepa microbiana selvagem / expressão heteróloga



# ESQUEMA RESUMIDO DA OBTENÇÃO DE UM ENZIMA MICROBIANA

## PURIFICAÇÃO:

- Clarificação / Extração / Recuperação / Purificação



Gel Filtration



Ion Exchange



Hydrophobic interaction



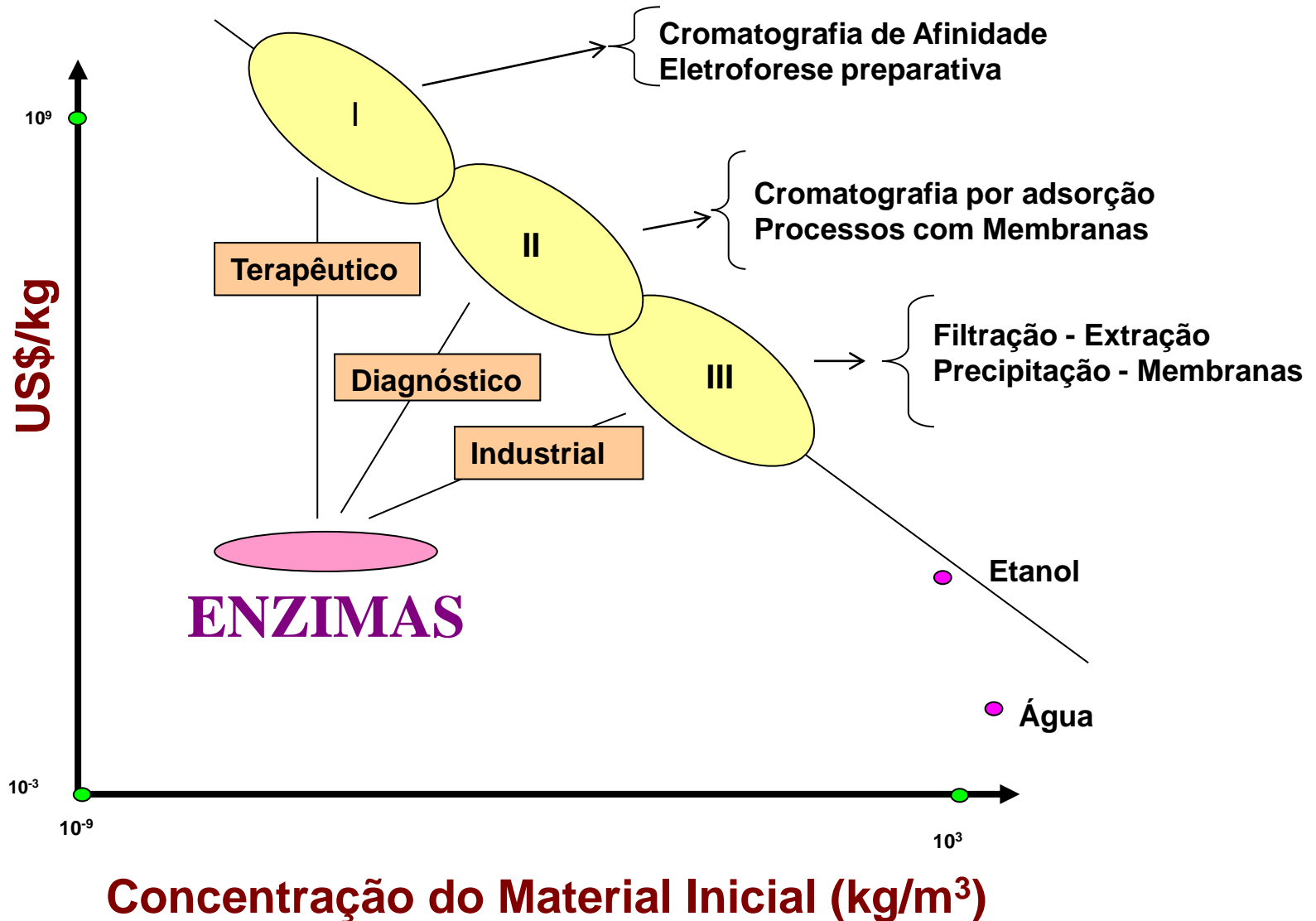
Affinity



Reversed phase

**Atenção para produtos com aplicação na área da saúde!!!**

# PREÇOS DE VENDAS DE BIOPRODUTOS EM FUNÇÃO DE SUA CONCENTRAÇÃO NO MEIO INICIAL

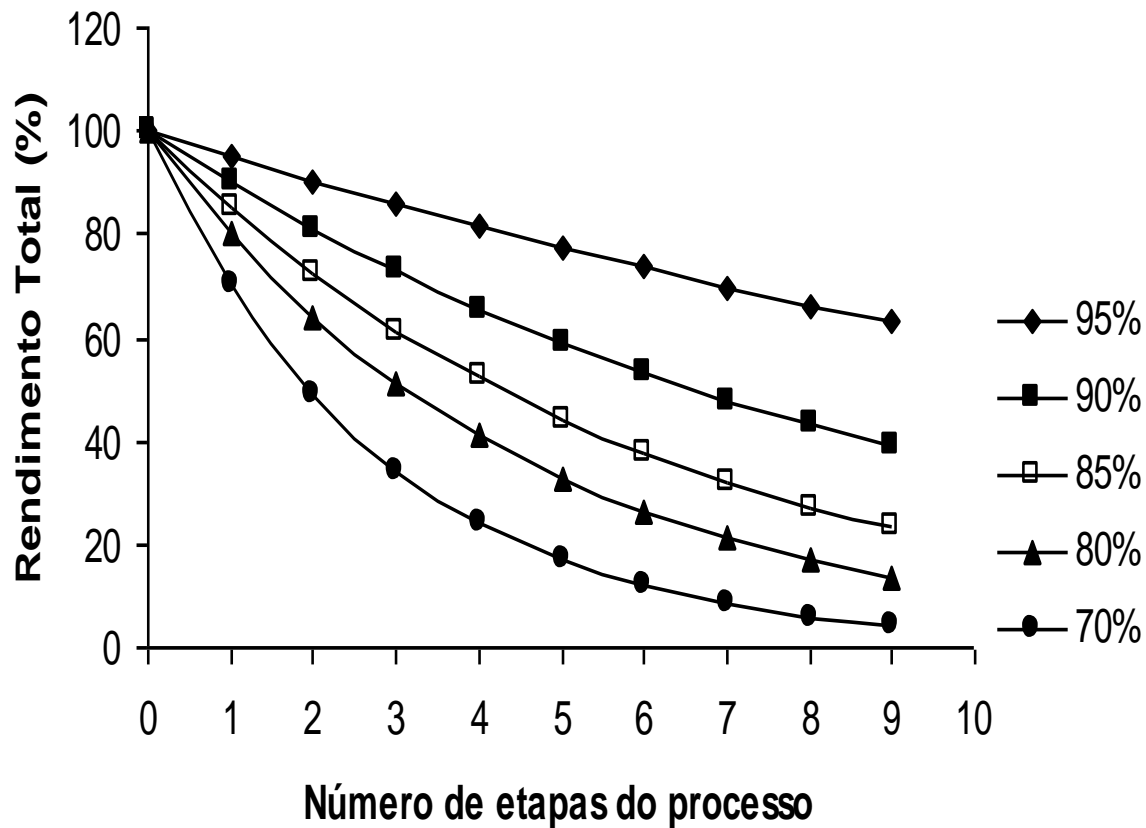




# PROTEIN BIOSEPARATION COSTS

Product	Approximate relative price	Biosep. cost as % of total cost of production
Food additives	1	10 – 30
Nutraceuticals	2 – 10	30 – 50
Industrial enzymes	5 - 10	20 – 40
Diagnostic proteins	50 -100	50 – 70
Therapeutic proteins	50 – 500	60 – 80

- O custo do processo de purificação dependerá → numero de etapas e tipo de operação utilizadas → produtos para aplicação farmacêutica e médica → processo de purificação pode representar 80% do valor do produto



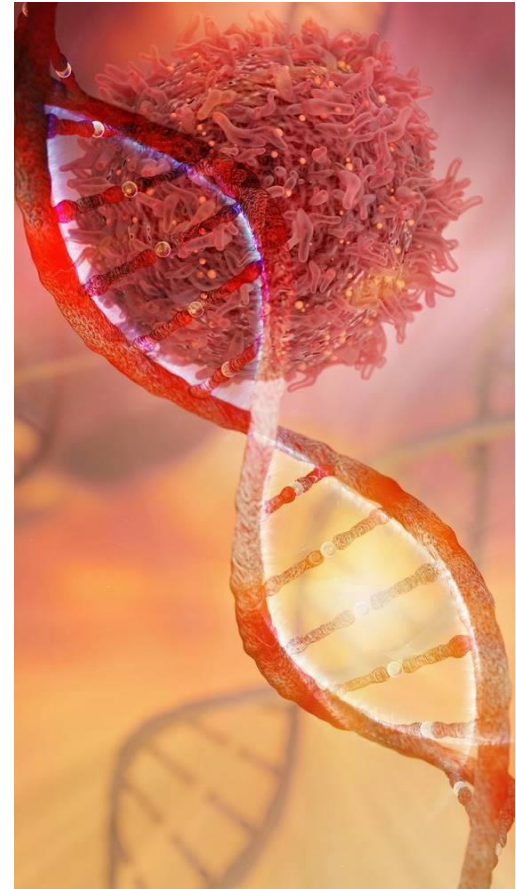
Influência do rendimento de cada etapa do processo de purificação sobre o rendimento do produto final

- Pode-se reduzir o número de etapas do processo combinando finalidades diferentes em uma única etapa → clarificando, concentrando e pré-purificando por meio da extração em sistema de duas fases.

## Rendimentos de purificação da enzima G6PDH, obtidos em vários processos.

ETAPAS	PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO	FONTE DA ENZIMA	RENDIMENTO (%)	REFERÊNCIAS
SIMPLES	Sistemas micelares em duas fases aquosas	<i>L. mesenteroides</i>	97,3	Silva et al. (2018)
	Cromatografia de troca-iônica	Homogeneizado de levedura	98,0	CHANG, (1996)
	Cromatografia de troca-iônica	Homogeneizado de levedura	99,0	CHANG <i>et al.</i> (1995)
	Cromatografia de afinidade	Homogeneizado de levedura	84,0	McCREATH <i>et al.</i> (1995)
	Cromatografia de afinidade	Homogeneizado de levedura	77,0	McCREATH <i>et al.</i> (1994)
	Sistemas de duas fases aquosas induzida pela temperatura	<i>S. cerevisiae</i>	73,0	ALRED <i>et al.</i> (1994)
MÚLTIPLAS	Precipitação com PEG + cromatografia de troca-iônica + membrana de afinidade	Extrato de levedura	51,0	CHAMPLUVIER, (1992)
	Centrifugação + precipitação com PEG + partição em sistemas de duas fases aquosas + cromatografia de troca-iônica	Homogeneizado de levedura	43,0	JOHANSSON (1985)
	Precipitação com sulfato de amônio + diálise + Duas etapas de cromatografia	<i>S. pombe</i>	46,7	TSAI, CHEN (1998)
	Precipitação com sulfato de amônio + cromatografia de troca-iônica + cromatografia de afinidade + gel filtração	Homogeneizado de levedura	53,0	FARMER (1991)

# L-ASPARAGINASE



**UM AGENTE ANTI-LEUCÊMICO**

# Bagó passou a cobrar 369% a mais do preço da CMED após perder o registro de Elspar

\$

Em 2013, o preço da CMED era R\$ 81,36

O preço da Aginasa referente à última compra via Bagó foi de R\$ 381,99

## Assessoria Jurídica do Ministério da Saúde contesta

**DEZEMBRO DE 2016:** Consultoria Jurídica do Ministério da Saúde emite parecer indicando a impossibilidade de **inexigibilidade de licitação**, já que havia **outros fornecedores no mundo**.

**JANEIRO DE 2017:** Ministério celebrou contrato com a concorrente de menor preço da cotação internacional

# Estratégia de mercado: outros medicamentos muito mais caros do que a L-Asparaginase

Empresa/ Fornecedor	Nome comercial	Substância ativa	Valor da unidade*	Valor em R\$	Total (R\$)	Percentual de aumento
Beijing/ Xetley	Leuginase	L-Asparaginase	USD 38	R\$ 125,30	7.683.702,60	-
Medac/ Bagó**	Spectrila	INN- Asparaginase	USD 582,17	R\$ 1.919,70	117.716.004,60	1.432%
Sigma-Tau/ Baxter	Oncaspar	PEG- Asparaginase	USD 1.619,10	R\$ 5.338,98	327.386.253,60	4.160%

\* Conversão com base no do dia da homologação da compra L-Asparaginase: R\$ 3,2975

\*\* Estimativa com base no preço pago pelo governo do Reino Unido / Fonte: medicinedict.com

## JANEIRO DE 2017

➤ Ministério da Saúde importa, em caráter excepcional, o medicamento **Leuginase/Beijing**

- A principal crítica é a falta de estudos clínicos que comprovem a eficácia do medicamento;

- Análise do Centro Boldrini sobre o laudo do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) indica que 130 vezes mais impurezas no medicamento chinês do que o medicamento Alemão.

# Grande repercussão na mídia – principalmente no Fantástico (Rede Globo). Forte oposição dos dirigentes do **Boldrini**.



## Falta do medicamento L-Asparaginase reduziria chances de cura, dizem especialistas

## MP pede recolhimento de remédio chinês utilizado pelo SUS para tratar câncer

Leuginase apresenta graves riscos aos pacientes, dizem especialistas ouvidos pelo Ministério Público Federal. Documento será encaminhado ao ministro da Saúde; gestor terá 10 dias para responder sobre providências adotadas.

Por G1 DF  
13/06/2017 19h38 - Atualizado há 3 anos



**A SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA solicitou análises em relação a Leuginase®, quais sejam:**

- se havia L-Asparaginase no frasco e sua quantidade;
- se a substância apresentava atividade enzimática;
- quantidade resíduos na solução e agregados à proteína.

## PARECER GERAL

**Aginasa™** - atividade pouco acima da declarada, cinética com parâmetro esperado para asparaginases de *E. coli*, estrutura secundária correta. Presença de bandas Contaminantes  $5 \pm 3\%$ ;

---

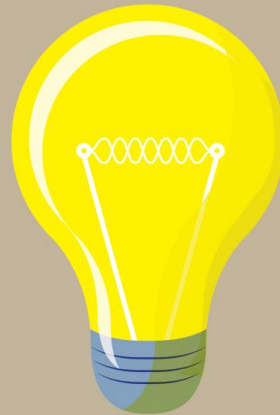
**Leuginase™** - possui 18% menor atividade do que a declarada pelo fabricante, cinética com parâmetro fora do esperado (uma afinidade menor pelo substrato asparagina), estrutura secundária correta, presença de menos de 2% de agregados proteicos.

**❑ Presença de bandas Contaminantes  $23 \pm 2\%$ .**

**PROCESSO DE PURIFICAÇÃO INEFICIENTE!!!**



*Já*  
parou para  
*pensar?*

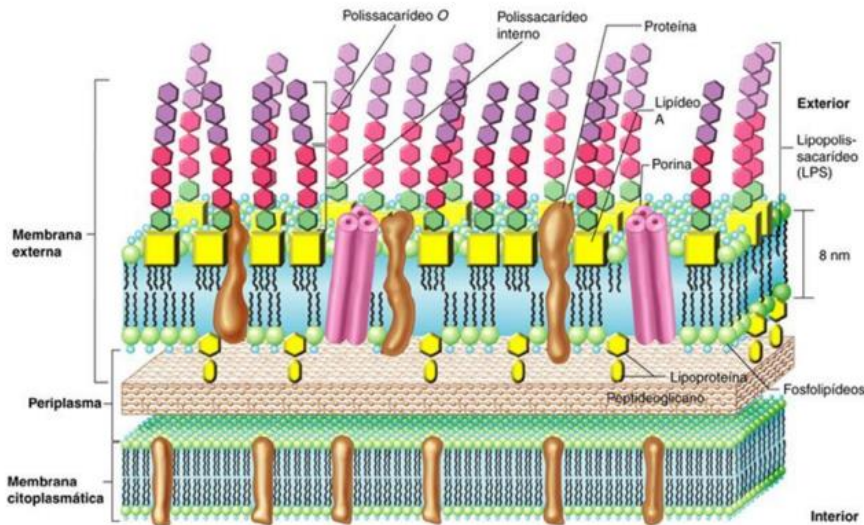
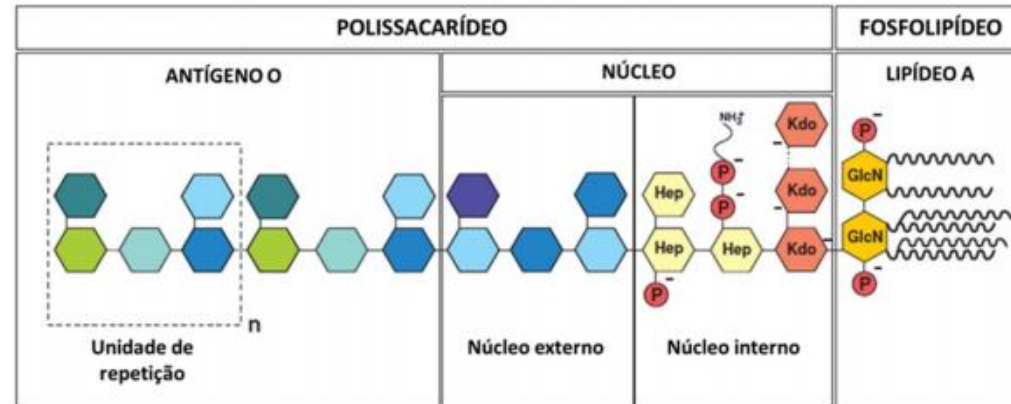


- Obter uma proteína com 95% de pureza ou mais significa que ela se encontra adequada para uso?

Dependerá do conteúdo remanescente que constituem a massa de 5% → diferenciar as impurezas que podem ser reduzidas a níveis aceitáveis daquelas que DEVEM ser totalmente eliminadas

- Endotoxinas (LPS de *E. coli*) → ~100 pg → pode ativar o sistema imune, alterar funções metabólicas, aumentar a temperatura corpórea e até levar o indivíduo a óbito → os limites aceitáveis são definidos em função da dose do medicamento (USP e FDA).
- Endotoxinas (LPS) podem ser separadas por cromatografia de exclusão → 10 – 20 kDa → mas podem formar agregados.

## ESTRUTURA GERAL DO LIPOPOLISSACARÍDEO

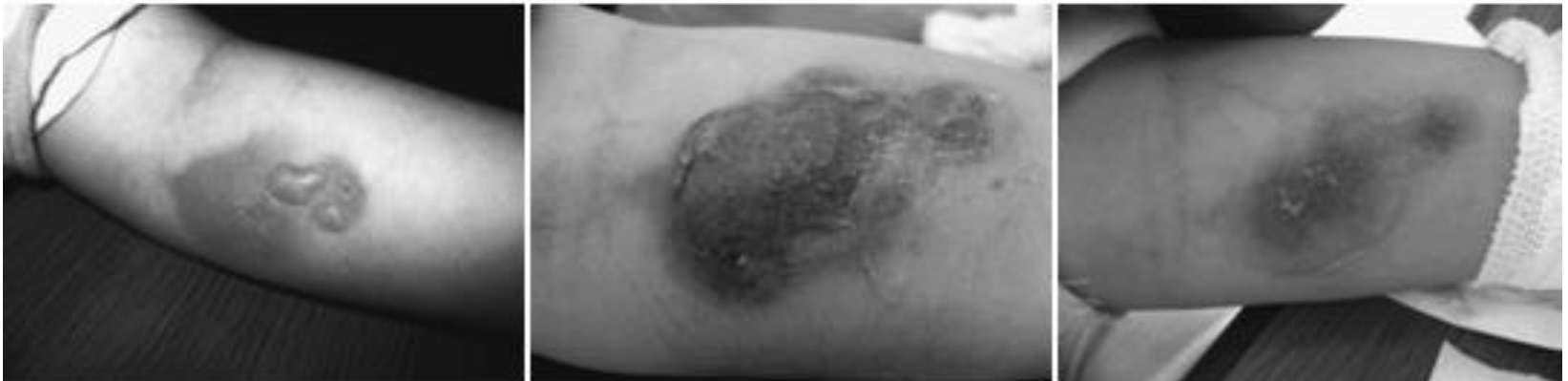


- Além da pureza, a homogeneidade é importante → formação de oligômeros, agregados, padrões diferentes de modificações traducionais (glicosilação) → resultam na presença de moléculas heterogêneas.

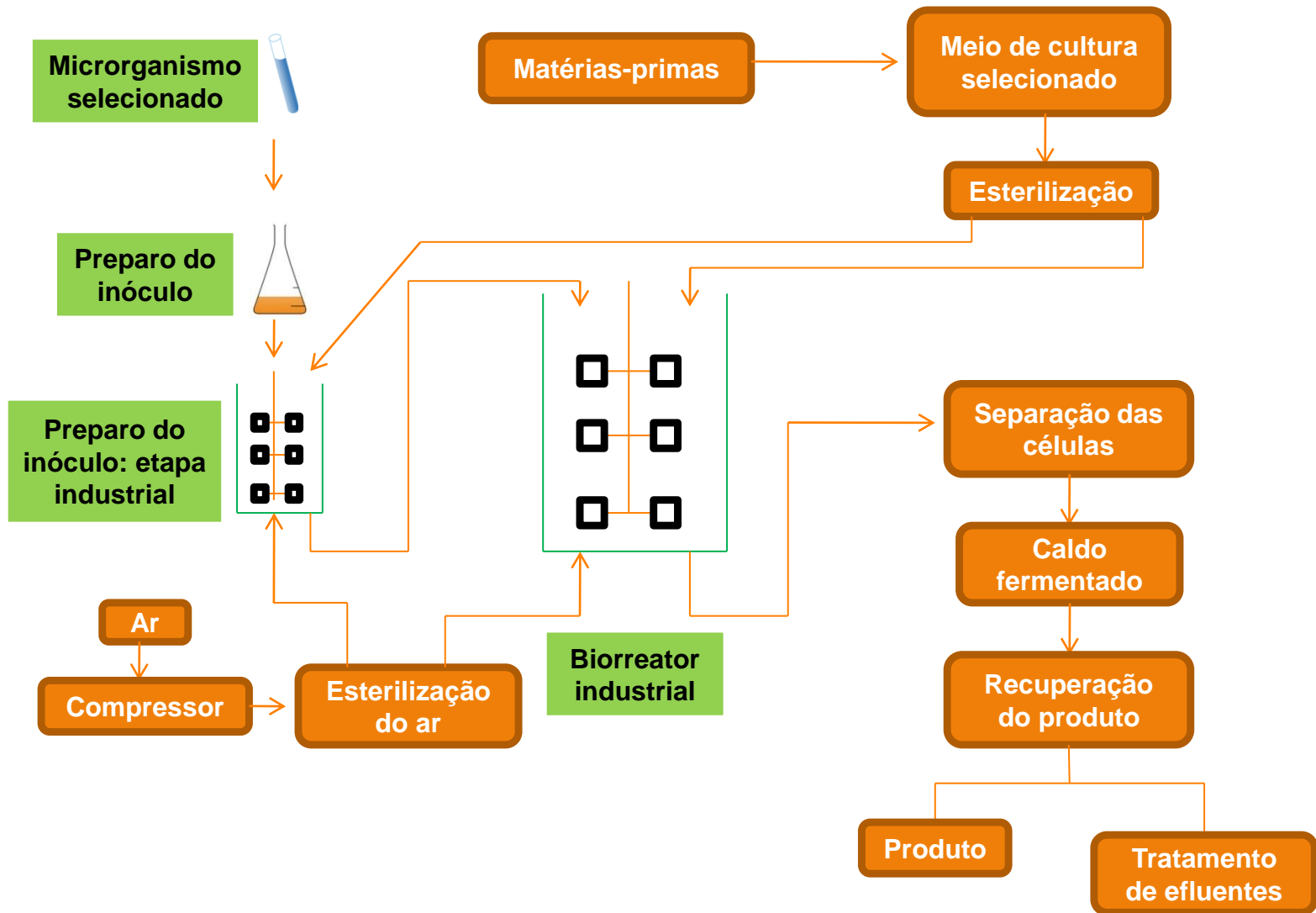
## PARECER GERAL

**Aginasa™** - atividade pouco acima da declarada, cinética com parâmetro esperado para asparaginases de *E. coli*, estrutura secundária correta. Presença de bandas Contaminantes  $5 \pm 3\%$ ;

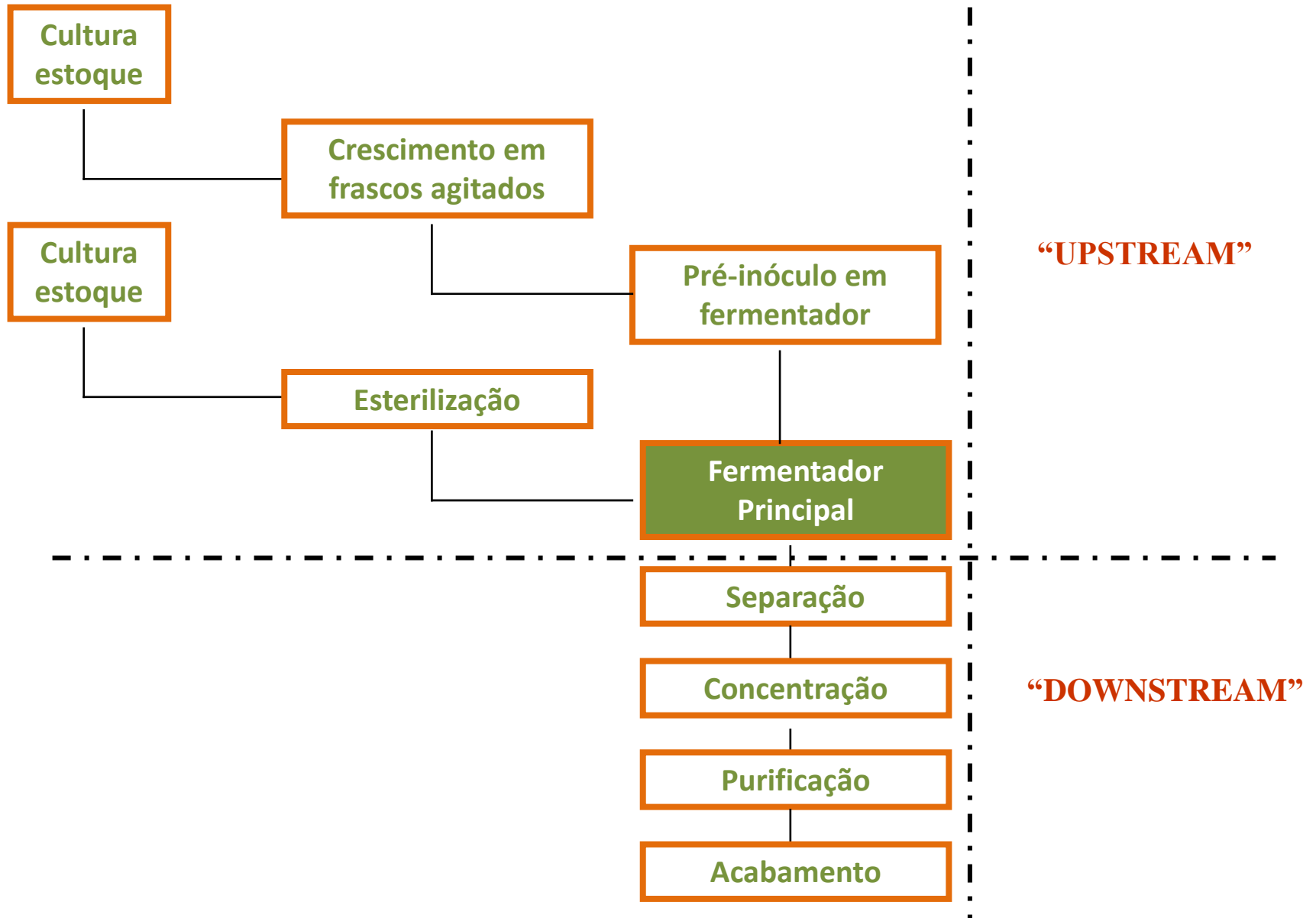
□ Presença de cerca de 5% de agregados proteicos.



# PROCESSO FERMENTATIVO – ESQUEMA GERAL



# Processo Fermentativo Genérico



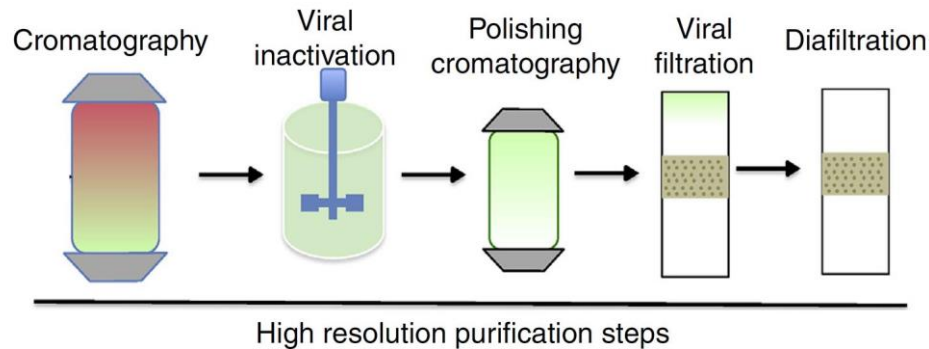
# O DESAFIO DA ETAPA DE DOWNSTREAM

É difícil recuperar de forma eficiente e econômica um produto de alta pureza a partir de uma mistura complexa contendo moléculas biologicamente relacionadas, impurezas e contaminantes que possuem propriedades físicas e químicas semelhantes.



**Pense no processo de purificação como uma longa escada em que o produto e as impurezas descerão a velocidades e taxas diferentes →  
EXPLORANDO SUAS DIFERENÇAS FÍSICO-QUÍMICAS.**

- Clarificação → remoção de células integras e debris celulares → **diminuição da turbidez do meio.**
- Rompimento celular → produtos intracelulares → **aumenta a viscosidade e gama de contaminantes.**
- Purificação de baixa resolução → separa a molécula-alvo de outras moléculas com características físico-químicas altamente significativas → **ex. separa uma proteína da água, pigmentos, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos....**
- Purificação de alta resolução → separa a molécula-alvo de outras moléculas com características físico-químicas semelhantes → **ex. separa uma proteína de outra proteína.**
- Operações de Polimento → **apenas concentrações residuais de impurezas são retiradas além da etapa de estabilização da molécula alvo.**





<b>ETAPAS</b>	<b>OPERAÇÕES UNITÁRIAS</b>	<b>PRINCÍPIO</b>
<b>CLARIFICAÇÃO</b>	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Filtração tangencial	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
<b>ROMPIMENTO CELULAR</b>	Homegeneização	Cisalhamento
	Ultrassom	Cisalhamento
	Moagem em moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Ruptura da parede ou membrana celular
<b>PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO</b>	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração	Massa molar e raio hidrodinâmico
	Extração em Sistemas de Duas Fases	Solubilidade
<b>PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO</b>	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão molecular	Massa molar
<b>TRATAMENTOS FINAIS</b>	Cristalização	Características de equilíbrio líquido–sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido–sólido

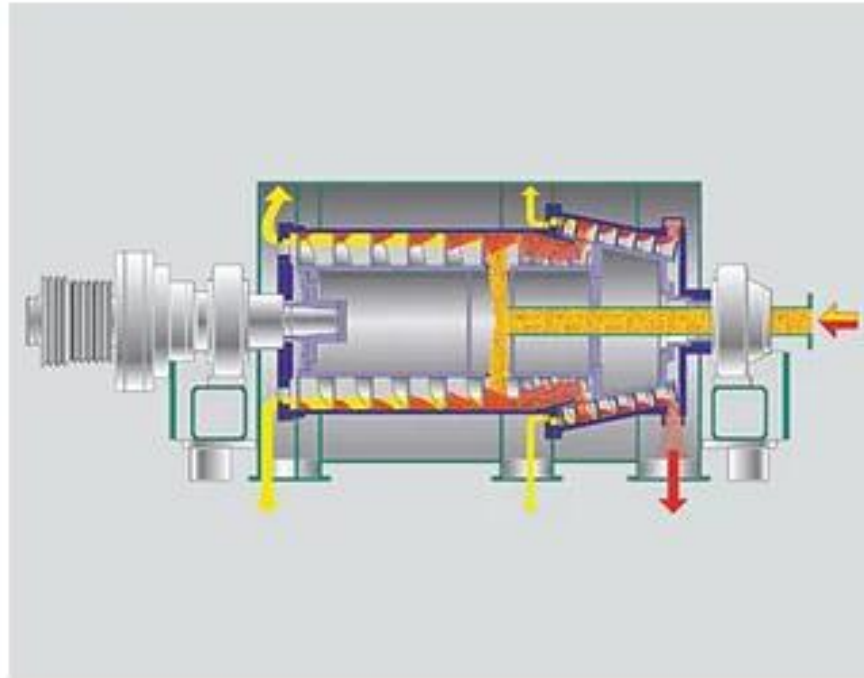
- **DEFINIÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO → SISTEMA DE EXPRESSÃO (CÉLULA) + MEIO DE CULTIVO + BIOMOLÉCULA + APLICAÇÃO FINAL (PUREZA).**

- Qual a composição do meio fermentado?
- Qual a localização da biomolécula dentro do micro-organismo?
  - Qual o uso final da biomolécula?
- Qual a concentração da molécula-alvo no meio de cultivo?
- Quais são as características físico-químicas da molécula-alvo?
  - Há purezas que devem ser eliminadas?
  - A molécula-alvo tem atividade biológica?
- Qual a capacidade de um determinado equipamento?

- Estabelecimento de metodologias analíticas para quantificação da molécula-alvo e impurezas → **fundamental para monitorar o processo de purificação.**

<b>ETAPAS</b>	<b>OPERAÇÕES UNITÁRIAS</b>	<b>PRINCÍPIO</b>
<b>CLARIFICAÇÃO</b>	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Filtração tangencial (membranas)	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
<b>ROMPIMENTO CELULAR</b>	Homegeneização	Cisalhamento
	Ultrassom	Cisalhamento
	Moagem em moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise ou solubilização de moléculas que compõem a parede ou membrana celular
<b>PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO</b>	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (Membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico
	Extração em Sistemas de Duas Fases	Solubilidade
<b>PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO</b>	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção)
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo)
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão molecular	Massa molar
	Membranas adsortivas	Massa molar ou sítios específicos da superfície de uma proteína
<b>TRATAMENTOS FINAIS</b>	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido-sólido

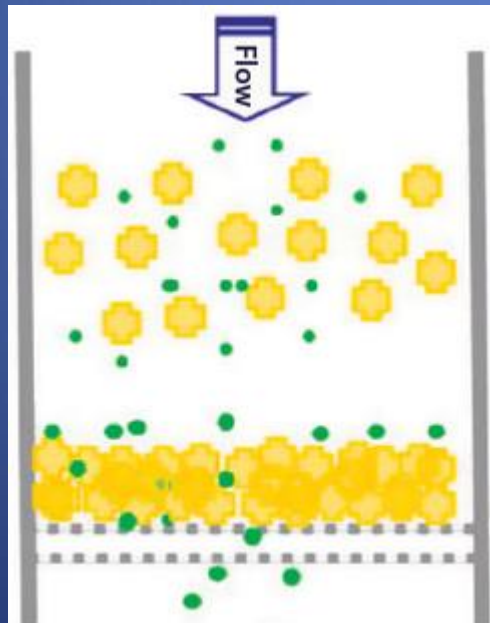
# ESTAPA DE CLARIFICAÇÃO



**CLARIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO → FILTRAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO → Clarificado ou Filtrado (Meio isento de célula com menor turbidez)**

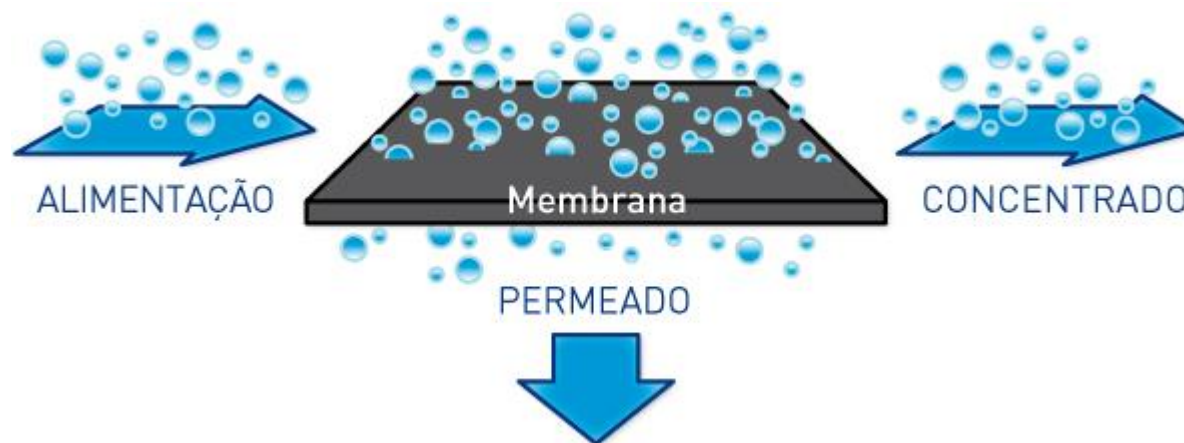
# FILTRAÇÃO

A filtração pode ocorrer pela imposição de uma pressão positiva à suspensão de celular ou por meio de um vácuo ao reservatório do filtrado

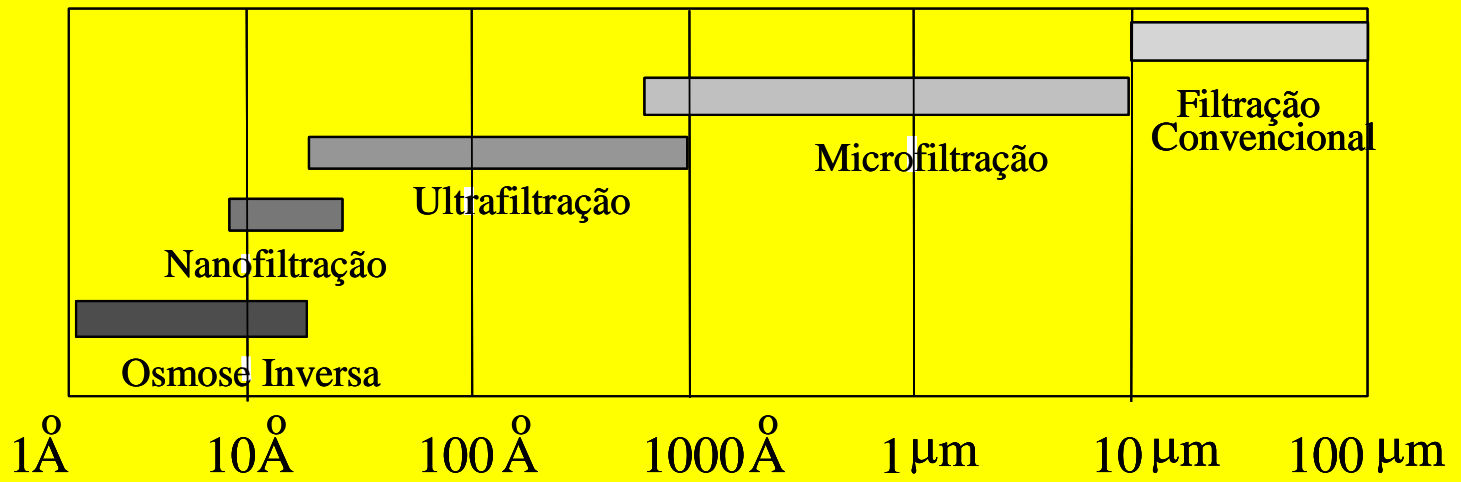
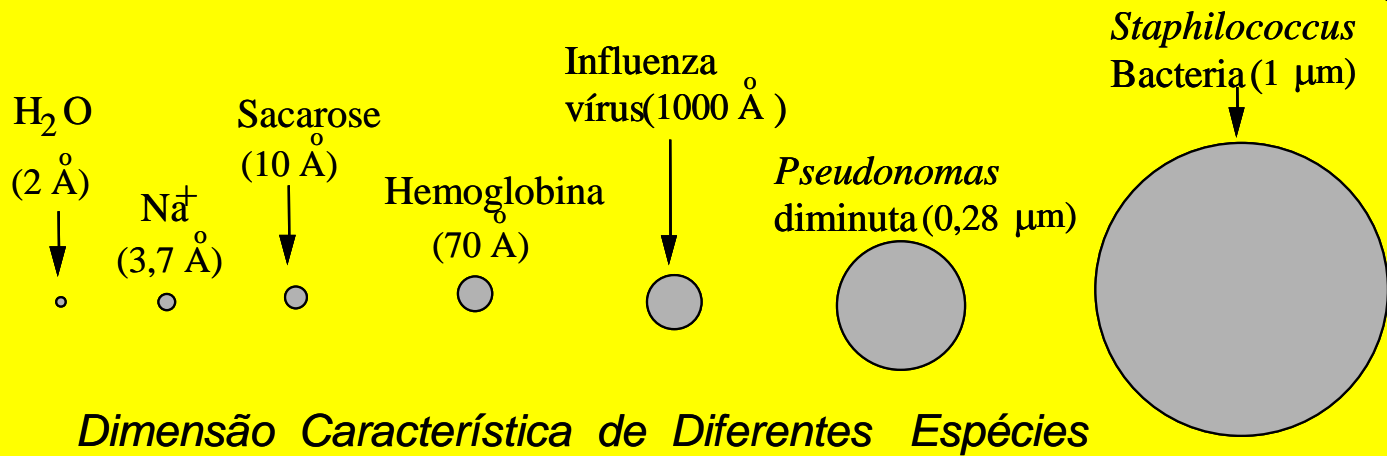


# PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

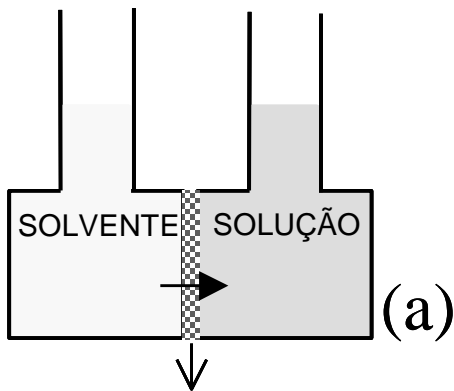
- Servem tanto para separação como para concentração;
- Emprego de moderadas ou mesmo baixas temperaturas;
  - Baixo efeito químico e mecânico prejudiciais;
    - Não envolvem mudança de fase;
    - Boa seletividade (em muitos casos);
  - Fácil ampliação de escala e flexibilidade.



# Faixa de porosidade de membranas de MF, UF, NF e OI.

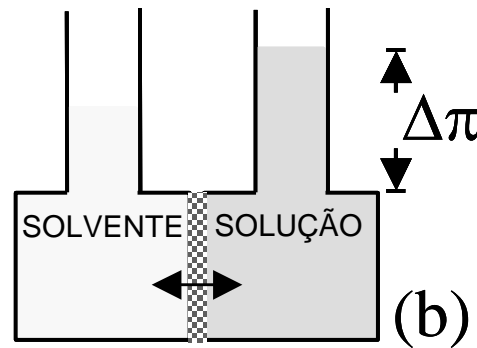


$\Delta\pi =$  Pressão Osmótica

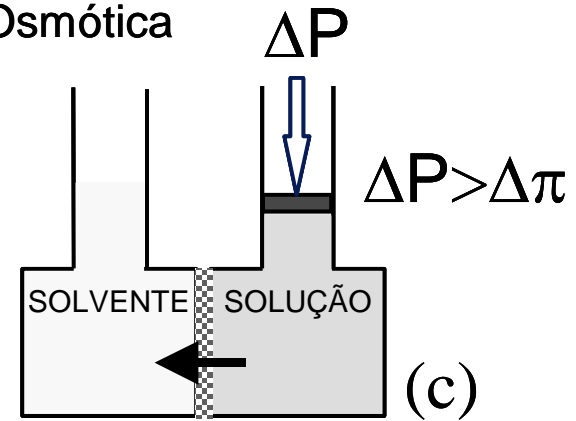


Membrana Semi-permeável

**FLUXO OSMÓTICO**



**EQUILÍBRIO OSMÓTICO**



**OSMOSE INVERSA**

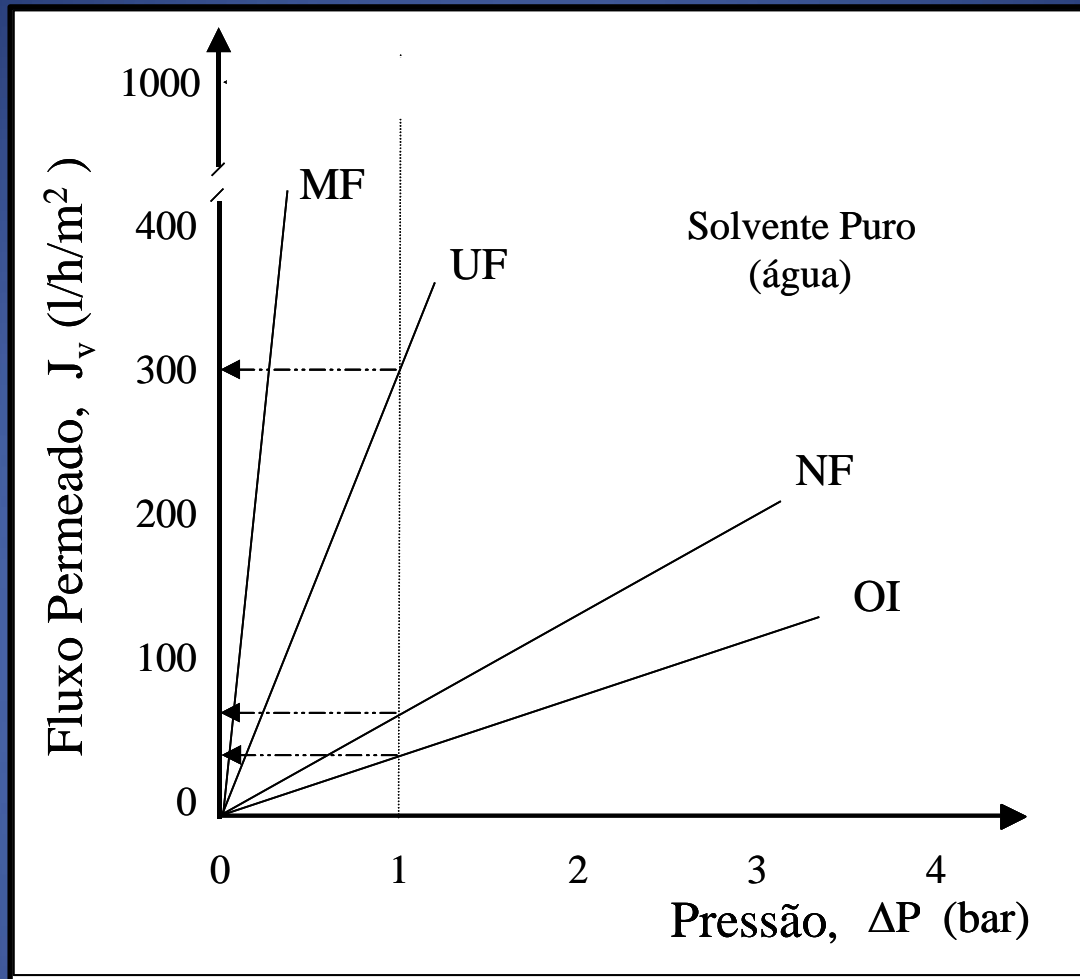
## O FENÔMENO OSMÓTICO E A OSMOSE INVERSA

$\Delta P$  - diferença de pressão aplicada

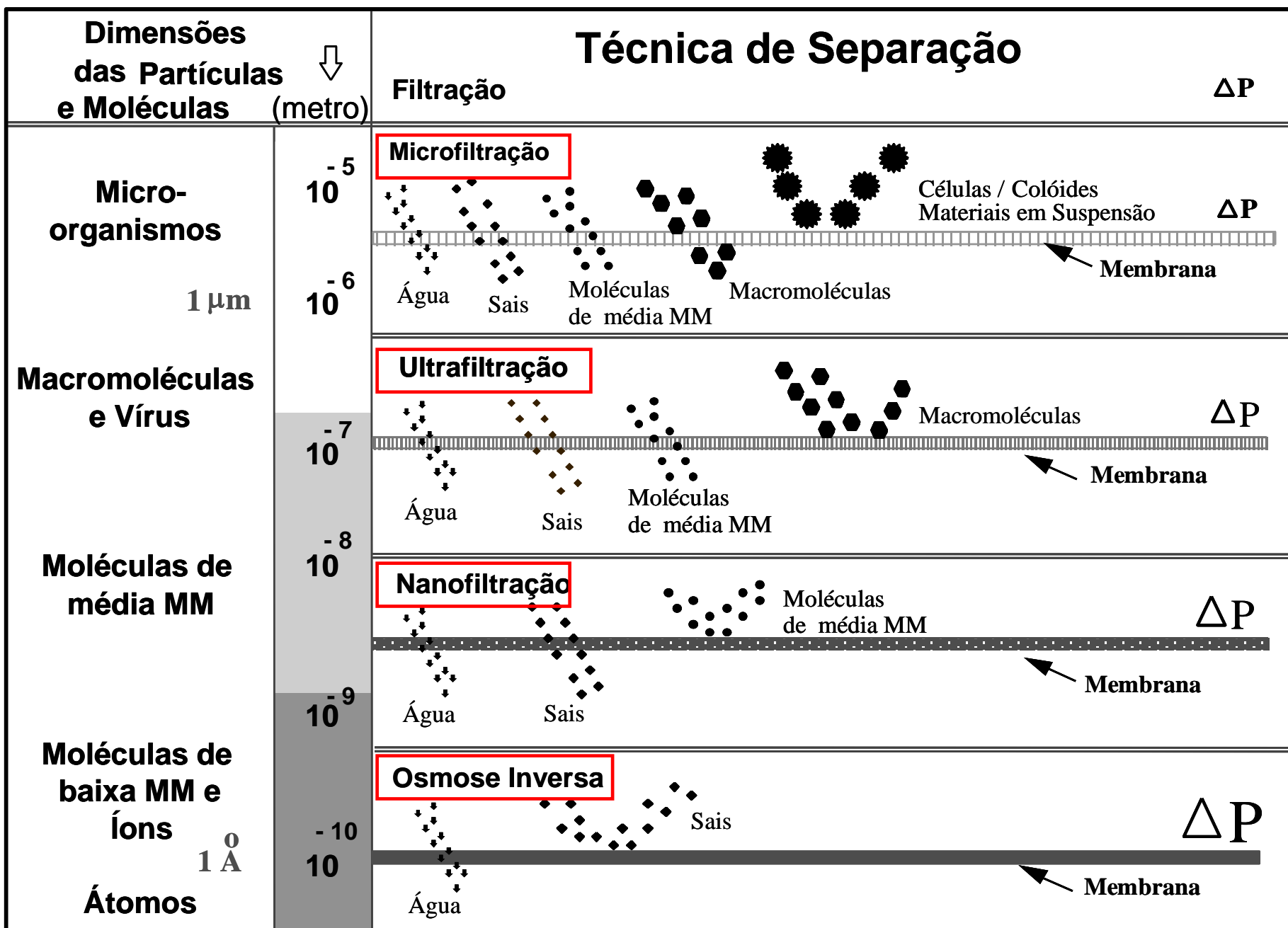
$\Delta\pi$  - diferença entre a pressão osmótica da solução e do solvente

- ❖ Utiliza membranas densas, portanto, são permeáveis apenas ao solvente, em geral, água, retendo, praticamente, todas as moléculas solúveis e materiais em suspensão;
- ❖ Alta pressão faz a água atravessar a membrana no sentido da solução **mais** concentrada **para a menos** concentrada.





**Valores típicos de fluxo permeado de solvente puro em função da pressão, para membranas de MF, UF, NF e OI.**



Principais características dos processos que utilizam diferença de pressão como força motriz.

# ESPÉCIES RETIDAS EM OI, NF, UF e MF

ESPÉCIE	Massa Molar (Dalton)	Tamanho (nm)	PROCESSOS			
			OI	NF	UF	MF
Leveduras e fungos		$10^3 - 10^4$				X
Células bacterianas		$300 - 10^4$			X	X
Colóides		$100 - 10^3$			X	X
Vírus		30 - 300			X	X
Proteínas	$10^4 - 10^6$	2 - 10			X	
Polissacarídeos	$10^3 - 10^6$	2 - 10		X	X	
Enzimas	$10^3 - 10^6$	2 - 5		X	X	
Açúcares simples	200 - 500	0,8 - 1,0	X	X		
Comp. orgânicos	100 - 500	0,4 - 0,8	X	X		
Íons inorgânicos	10 - 100	0,2 - 0,4	X			

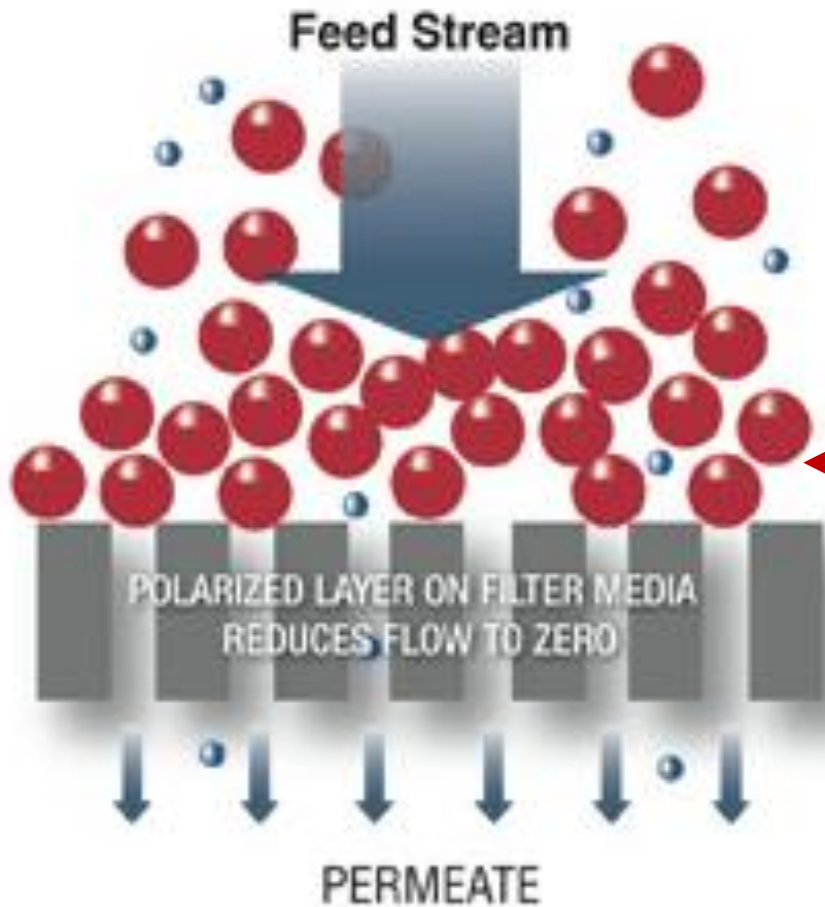
# VELOCIDADE DE FILTRAÇÃO:

- Diferença de pressão entre suspensão e filtrado  $\rightarrow \Delta P$ 
  - Viscosidade do meio  $\rightarrow \mu$
  - Concentração de células na suspensão  $\rightarrow X$ 
    - Área do filtro  $\rightarrow A$
    - Resistência do filtro  $\rightarrow R$
    - Volume do filtrado  $\rightarrow V$
    - Tempo de filtração  $\rightarrow t$
  - Resistência da torta de filtração  $\rightarrow \alpha$

$$1dV/Adt = \Delta P / \mu(\alpha X \cdot V/A + R)$$

## MODOS DE AUMENTAR A VELOCIDADE DE FILTRAÇÃO:

- Aumentar a pressão exercida na suspensão celular
- Viscosidade do filtrado  $\rightarrow$  diluição da suspensão (aumenta volume) ou encerrar o cultivo antes que a células sofram lise.



**Dead-End Filtration**

## FILTRAÇÃO CONVENCIONAL

**TORTA DE FILTRAÇÃO**

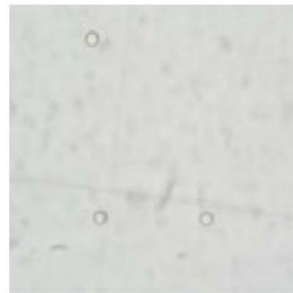
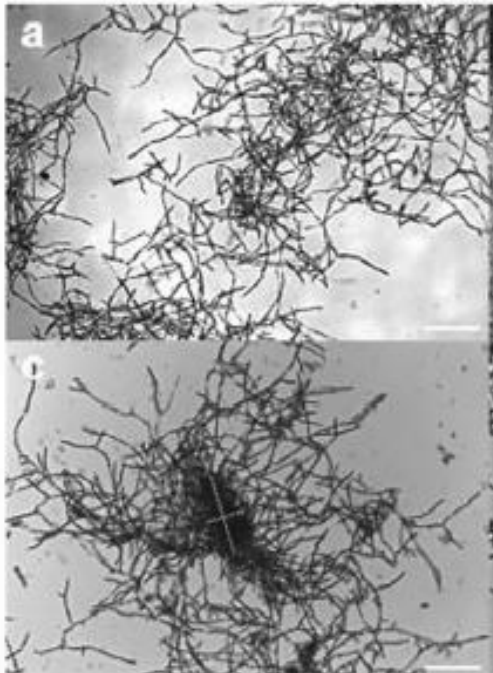
**\* RESISTÊNCIA \***

**Diminui velocidade e a eficiência  
da etapa de filtração**

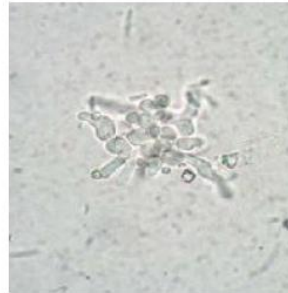
# DIMINUIÇÃO DA RESISTÊNCIA DA TORTA DE FILTRAÇÃO

## 1. MANIPULAÇÃO DO PRÓPRIO MICRO-ORGANISMO

- Agregação das células microbianas → uso de polieletrólitos → aumento do tamanho das partículas.
- Aquecimento da suspensão de fungos filamentosos → agregação
- Interferência da forma e densidade das células → hifas X pellets



0h (400 times)



24h (1000 times)



36h (1000 times)

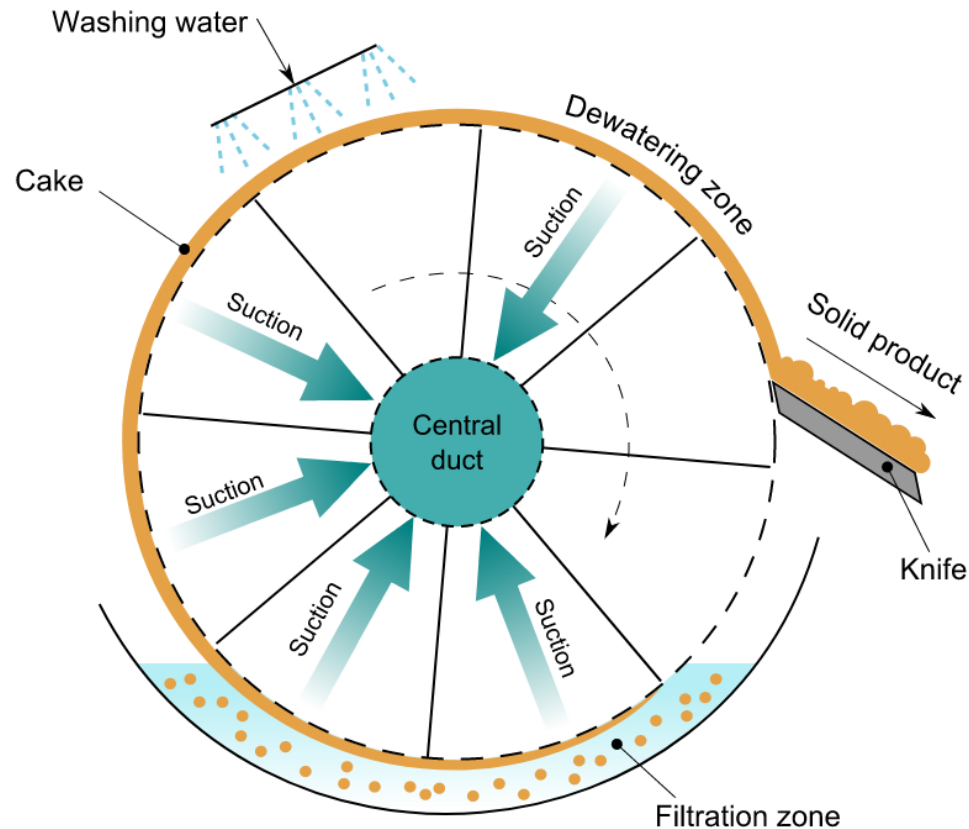


72h (No zoom)



**Pellets de *Aspergillus terreus***  
→ crescimento micelial na forma esférica

## 2. USO DO FILTRO ROTATIVO A VÁCUO – FRV



**Tambor horizontal oco cujo diâmetro varia entre 0,5 a 3 m**

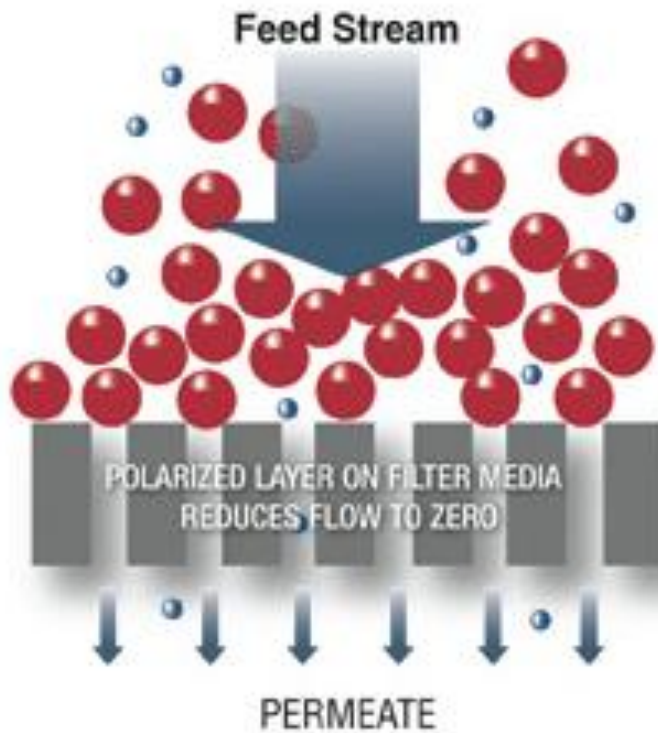
**Ordem de rotação → 0,1 – 2 rpm**

**Pressão reduzida no interior do tambor (vácuo) → promove a filtração.**

**Alta capacidade → 100 a 200 L/m<sup>2</sup>.h.**

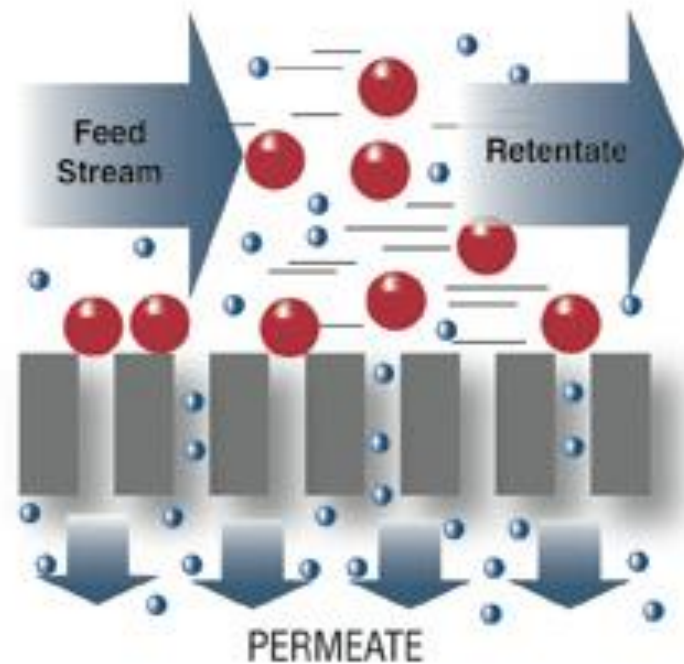
### 3. ALTERAÇÃO NA DIREÇÃO DO FLUXO DE ALIMENTAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR

#### FILTRAÇÃO CONVENCIONAL



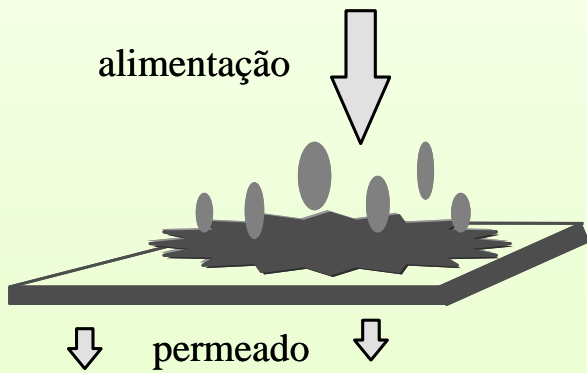
**Dead-End Filtration**

#### FILTRAÇÃO TANGENCIAL

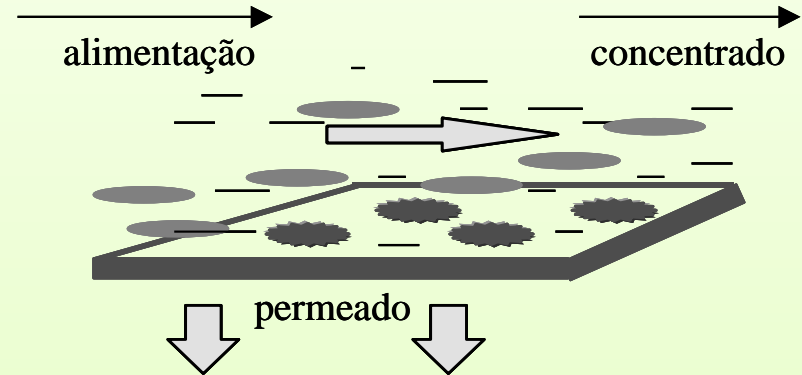
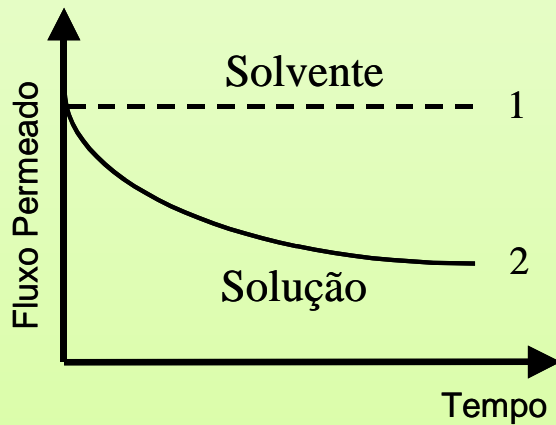


**Tangential (Cross) Flow Filtration**

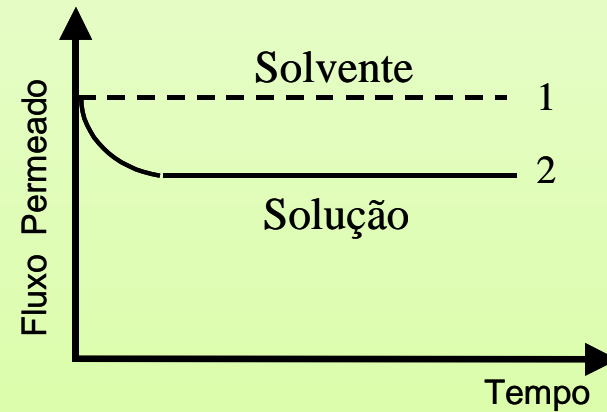




Filtração Convencional  
*"Deadend Filtration"*



Filtração Tangencial  
*"Cross Flow Filtration"*



**Filtração convencional ("*dead-end filtration*")**

**Filtração em Fluxo Cruzado ou Filtração Tangencial (*cross-flow filtration* ou *Tangential Filtration*).**



Aparelho de Filtração  
Tangencial da Millipore

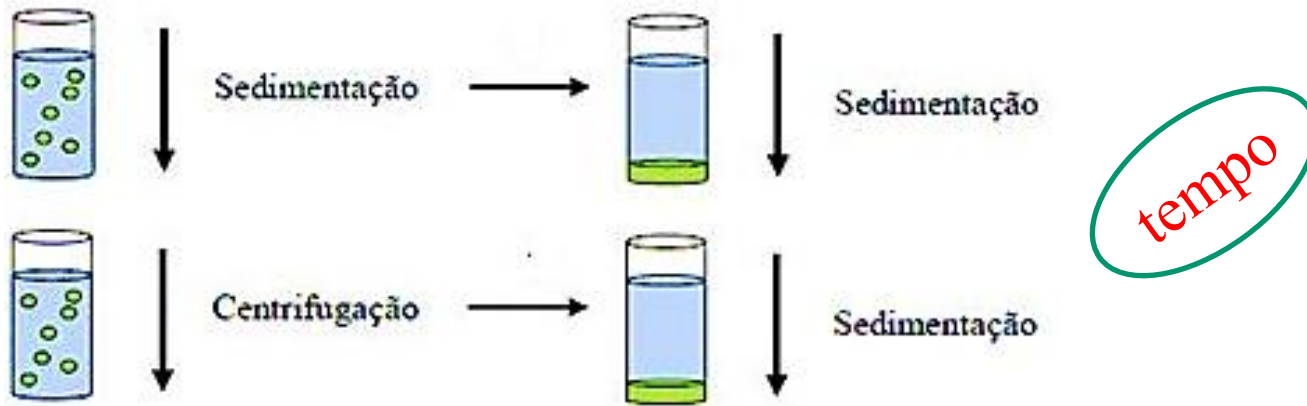


Cassetes  
de Filtração - Pellicon®



Cassetes  
de Filtração - Pellicon®

# CENTRIFUGAÇÃO



Método que acelera o processo de sedimentação por ação de um campo gravitacional centrífugo

Baseia-se na diferença de densidade entre a célula e o meio líquido, na viscosidade do meio líquido, na força motriz e no diâmetro da partícula.

Fungos filamentosos → Filtração  
Levedura → Centrifugação  
Bactéria → Filtração tangencial

# CENTRIFUGATION

Fermented  
Medium Feed

plates

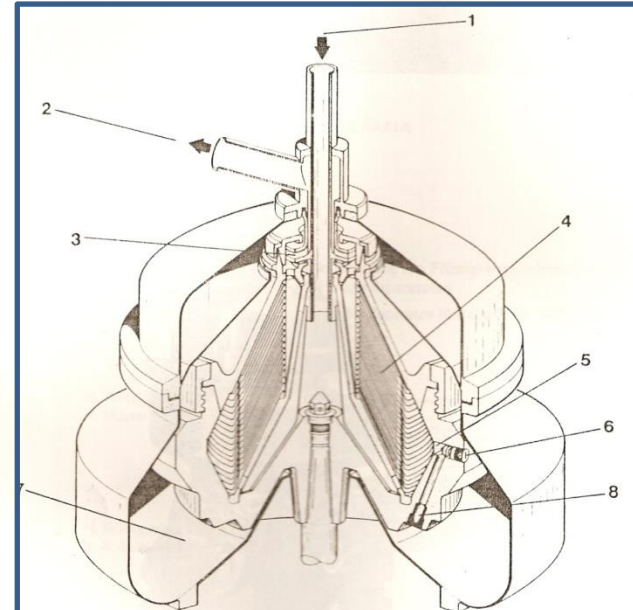
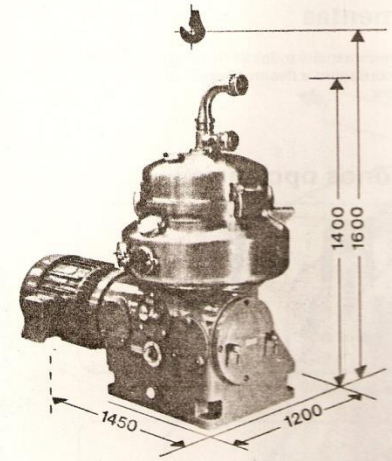
Exit of  
concentrated

Exit of  
clarified

Chamber of  
solids

Collector of  
concentrated  
cells

1. Alimentação
2. Saída (fase clarificada)
3. Pratos
4. Câmara de sólidos
5. Coletor de concentrado
6. Bicos ejetores (saída de concentrado)



- 1 Alimentação
- 2 Saída (fase clarificada)
- 3 Rodete
- 4 Pratos
- 5 Câmara de sólidos
- 6 Bico cego (opcional: válvula de limpeza)
- 7 Coletor de concentrado
- 8 Bico ejetor (saída de concentrado)



17 6 2008



<b>ETAPAS</b>	<b>OPERAÇÕES UNITÁRIAS</b>	<b>PRINCÍPIO</b>
<b>CLARIFICAÇÃO</b>	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Filtração tangencial (membranas)	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
<b>ROMPIMENTO CELULAR</b>	Homegeneização	Cisalhamento
	Ultrassom	Cisalhamento
	Moagem em moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise ou solubilização de moléculas que compõem a parede ou membrana celular
<b>PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO</b>	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (Membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico
	Extração em Sistemas de Duas Fases	Solubilidade
<b>PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO</b>	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção)
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo)
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão molecular	Massa molar
	Membranas adsortivas	Massa molar ou sítios específicos da superfície de uma proteína
<b>TRATAMENTOS FINAIS</b>	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido-sólido

**DOWNSTREAM**

**PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO**

**PRODUTO INTRACELULAR**

**PRODUTO EXTRACELULAR**

**SEPARAÇÃO DE CÉLULAS**  
Centrifugação/ Filtração

**SEPARAÇÃO DE CÉLULAS**  
Centrifugação/Filtração

**Sobrenadante**

**Células -PRODUTO-**

**Sobrenadante - PRODUTO -**

**Células**

**Subproduto –  
ou Resíduo**

**ROMPIMENTO  
CELULAR**

**Subproduto  
ou Resíduo**

**Fragmentos Celulares:  
Filtração**

**Fragmentos  
Celulares**

**Sobrenadante  
- PRODUTO -**

**CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO**  
Extração Líquido-Líquido  
Precipitação (Sais, solventes)  
Ultrafiltração

**Processos de Purificação de Alta Resolução**  
Processos Cromatográficos

**Acondicionamento**

**Trat. Finais**

**Transporte**



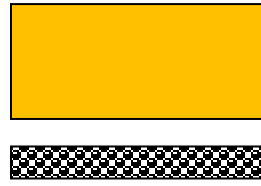
Tabela 3.1: Fatores que afetam a operação de rompimento celular

<b>Dependentes do Organismo</b>	<b>Dependentes do Produto Final</b>
Tipo de célula	Sensibilidade ao calor
Estado fisiológico	Tempo de rompimento
Velocidade de Crescimento	Sensibilidade a tensões de cisalhamento
Tamanho da célula	
Forma da célula	Custo do processo
Meio de cultivo utilizado	Localização na célula



# ESQUEMA SIMPLIFICADO DE DIFERENTES ENVOLTÓRIOS CELULARES

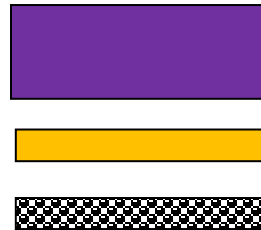
**Bactéria Gram (+)**



**Peptideoglicano – 90%**

**Membrana citoplasmática**

**Bactéria Gram (-)**



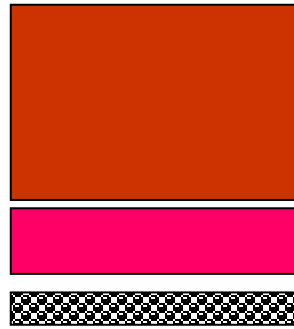
**Membrana externa**

**Peptideoglicano – 10%**

**Membrana citoplasmática**

- **Composição química e tamanho da célula → confere diferentes graus de resistência ao rompimento celular.**

**Leveduras**

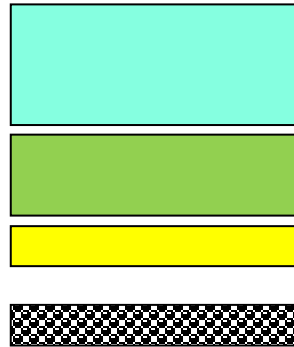


**Manana com pontes de fosfodiéster**

**Glicano com proteína**

**Membrana citoplasmática**

**Fungos**



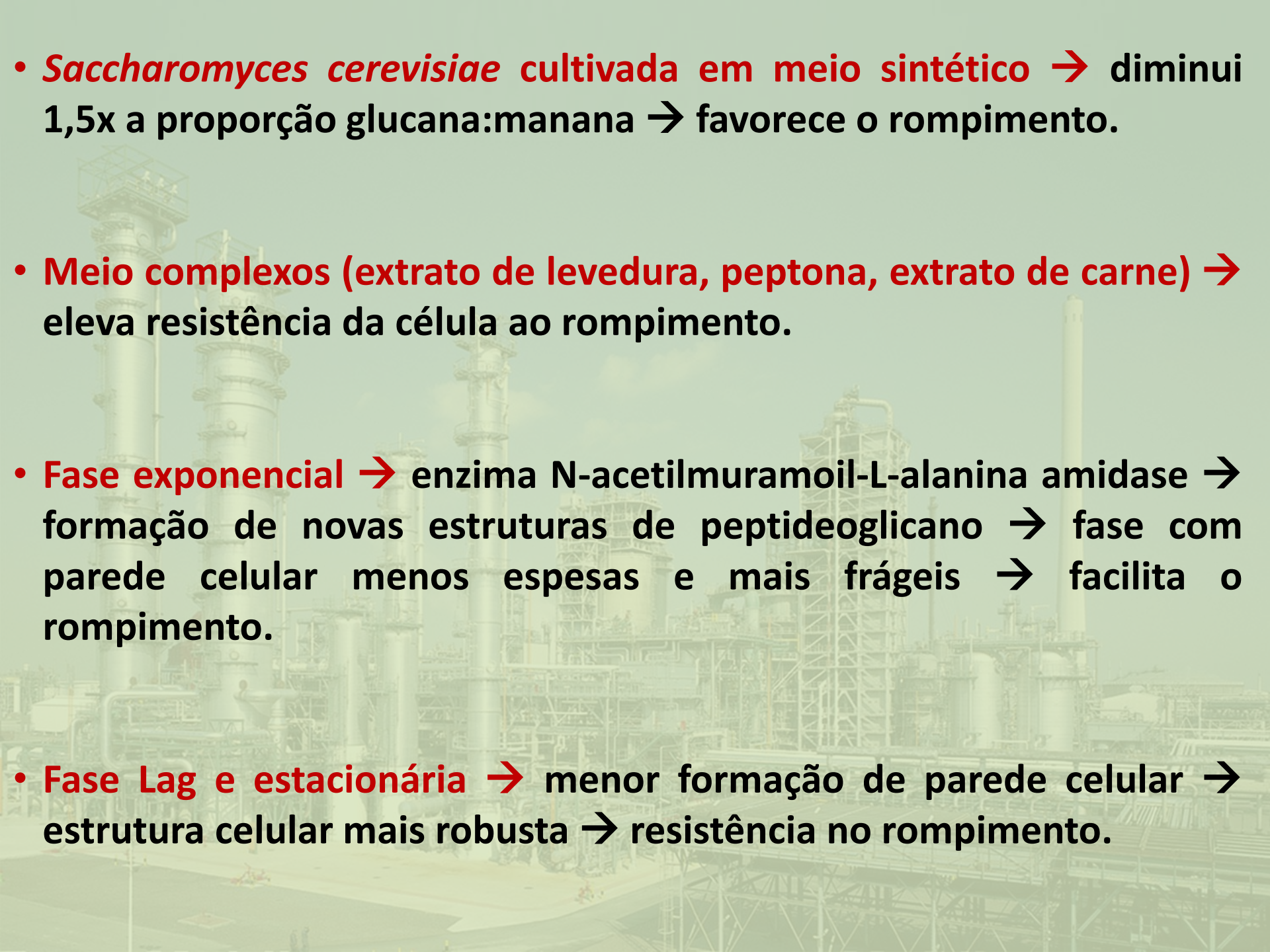
**Alfa e beta-glicanos**

**Camada glicoproteica**

**Quitina/microfibrilas**

**Membrana citoplasmática**

- Células de maior tamanho de uma mesma cepa → menor resistência ao rompimento → quantidade de glucana na parede celular é reduzida.

- 
- ***Saccharomyces cerevisiae* cultivada em meio sintético** → diminui 1,5x a proporção glucana:manana → favorece o rompimento.
  - **Meio complexos (extrato de levedura, peptona, extrato de carne)** → eleva resistência da célula ao rompimento.
  - **Fase exponencial** → enzima N-acetilmuramoil-L-alanina amidase → formação de novas estruturas de peptidoglicano → fase com parede celular menos espesas e mais frágeis → facilita o rompimento.
  - **Fase Lag e estacionária** → menor formação de parede celular → estrutura celular mais robusta → resistência no rompimento.

# MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR

## Mecânicos

- Homogeneizador de alta pressão
- Moinho de bolas
- Ultrassom

## Não-mecânicos

- Choque osmótico
- Congelamento-descongelamento
- Aquecimento
- Secagem

## Químicos

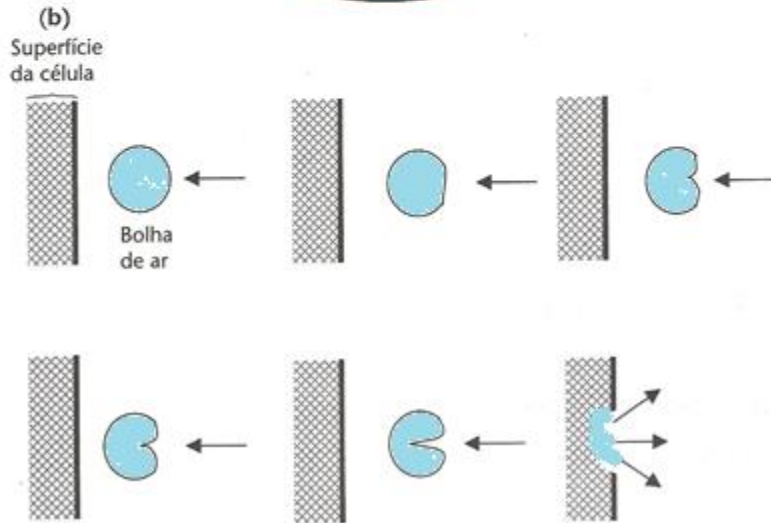
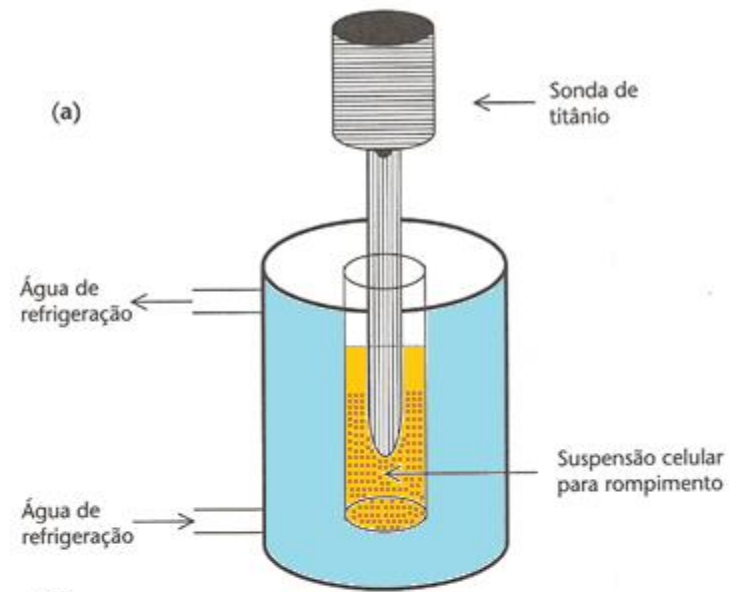
- Álcalis
- Solventes
- Detergentes
- Ácidos

## Enzimáticos

- Lize enzimática

# 1. ULTRASSOM

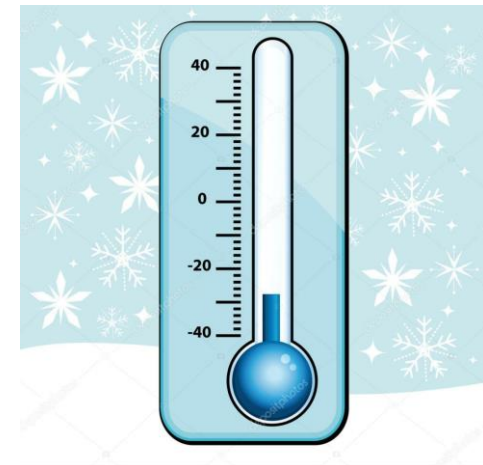
- Propagação de ondas de ultrassom em meio líquido → causa cavitação (surgimento de bolhas) → transferência de elevada energia para o meio → força de cisalhamento → resulta em rompimento da célula.
- Pontos negativos → aumento da temperatura e inviabilidade de uso em escala industrial (seria necessário a disposição de vários ultrassons em serie e sistema de refrigeração).



# Rompimento Mecânico: ULTRASSOM

## DESAFIO:

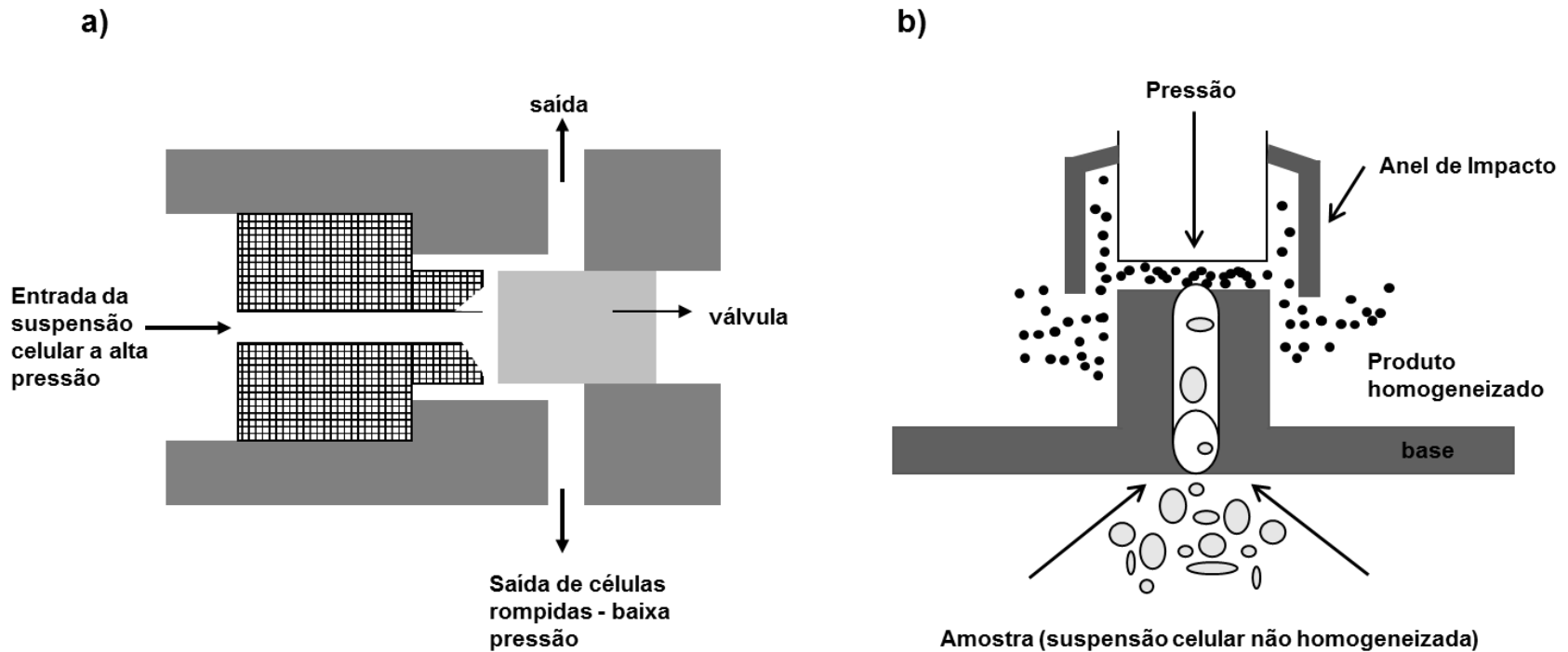
Controle da temperatura – inferior a 5 °C.



**Sequência de colapso de uma bolha simples contra a superfície da célula a ser rompida, provocada pelo ultrassom.**

## 2. HOMOGENEIZADOR A ALTA PRESSÃO

- **Consiste da passagem forçada da suspensão celular (a alta pressão) através de um orifício estreito seguida de colisão contra uma superfície em uma câmara de baixa pressão.**
- **A queda instantânea da pressão associada ao impacto provoca o efetivo rompimento celular sem danificar proteínas.**



**Esquema genérico de homogeneizadores a alta pressão com câmara horizontal (a) e vertical (b).**



# Fatores que afetam o desempenho de um HAP:

- Pressão de operação
- Velocidade de alimentação
- Temperatura
- Fase de crescimento do micro-organismo
- Condições de cultivo
- Tipo de célula
- Concentração de células

Ideal: Bactérias e Leveduras

- As hifas de fungos filamentosos podem bloquear a válvula de descarga.

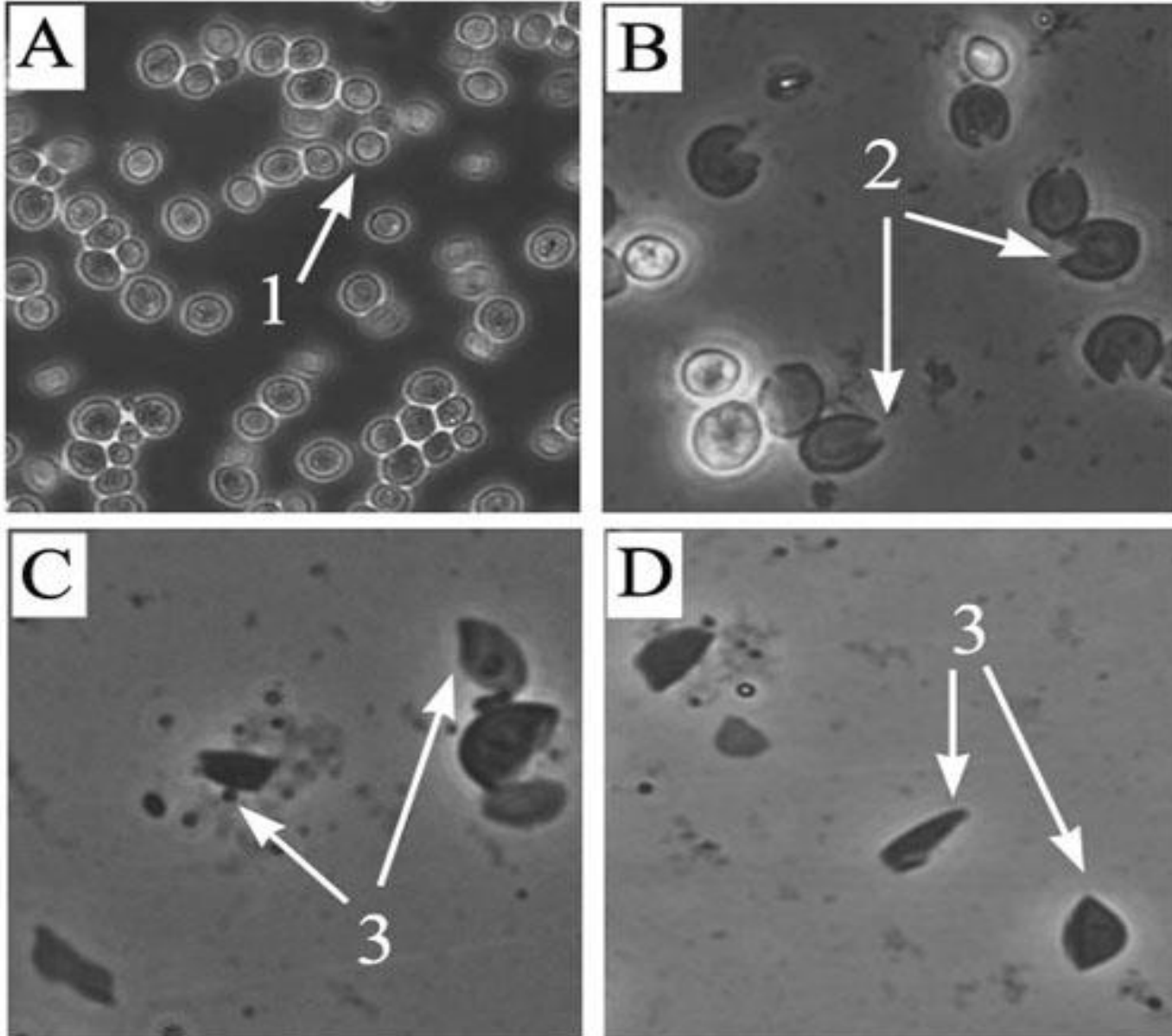


Pressões típicas para alguns micro-organismos.

<b>Microrganismo</b>	<b>Pressão</b>
<i>S. cerevisiae</i>	2,90
<i>E. coli</i> (fase exponencial)	0,64
<i>E. coli</i> (fase estacionária)	1,71
<i>E. coli</i> (células contendo corpos de inclusão)	1,65
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	1,70

- A energia é dissipada como calor, logo o controle de **temperatura** é fator muito importante
- Existem equipamentos (sistema tipo válvula) para escala de produção de até **4500 L/h a 70 MPa**

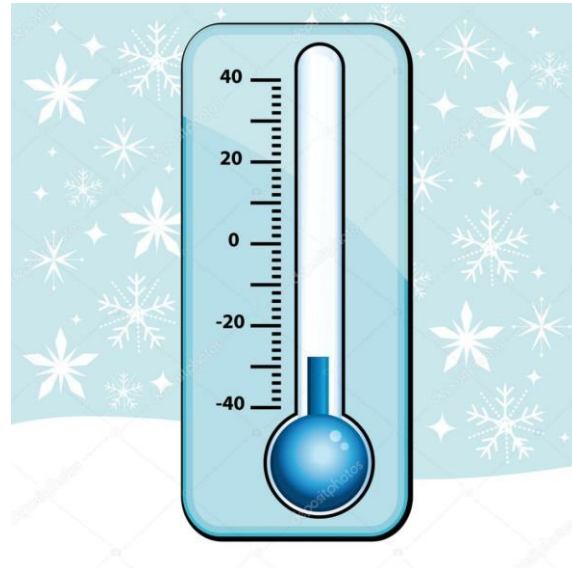
# Leveduras rompidas em homogeneizador de alta pressão



- Este tipo de rompimento provoca aumento da temperatura do meio, por isso necessita de sistema de refrigeração

## DESAFIO:

Controle da temperatura – inferior a 5 °C.

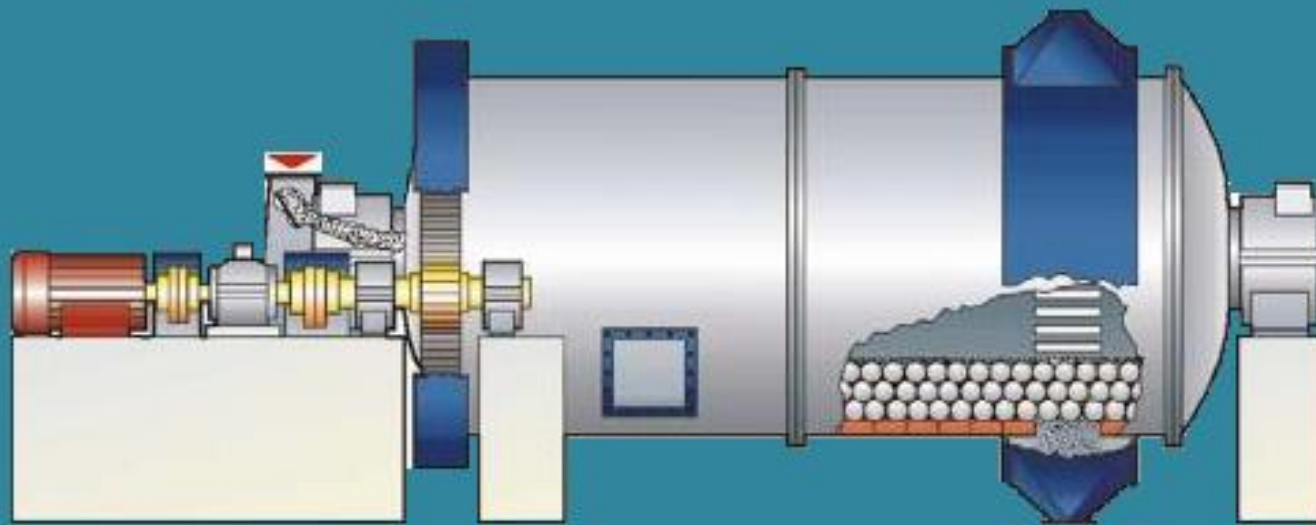


Normalmente usa-se pressões que variam de 5.000 a 20.000 psi

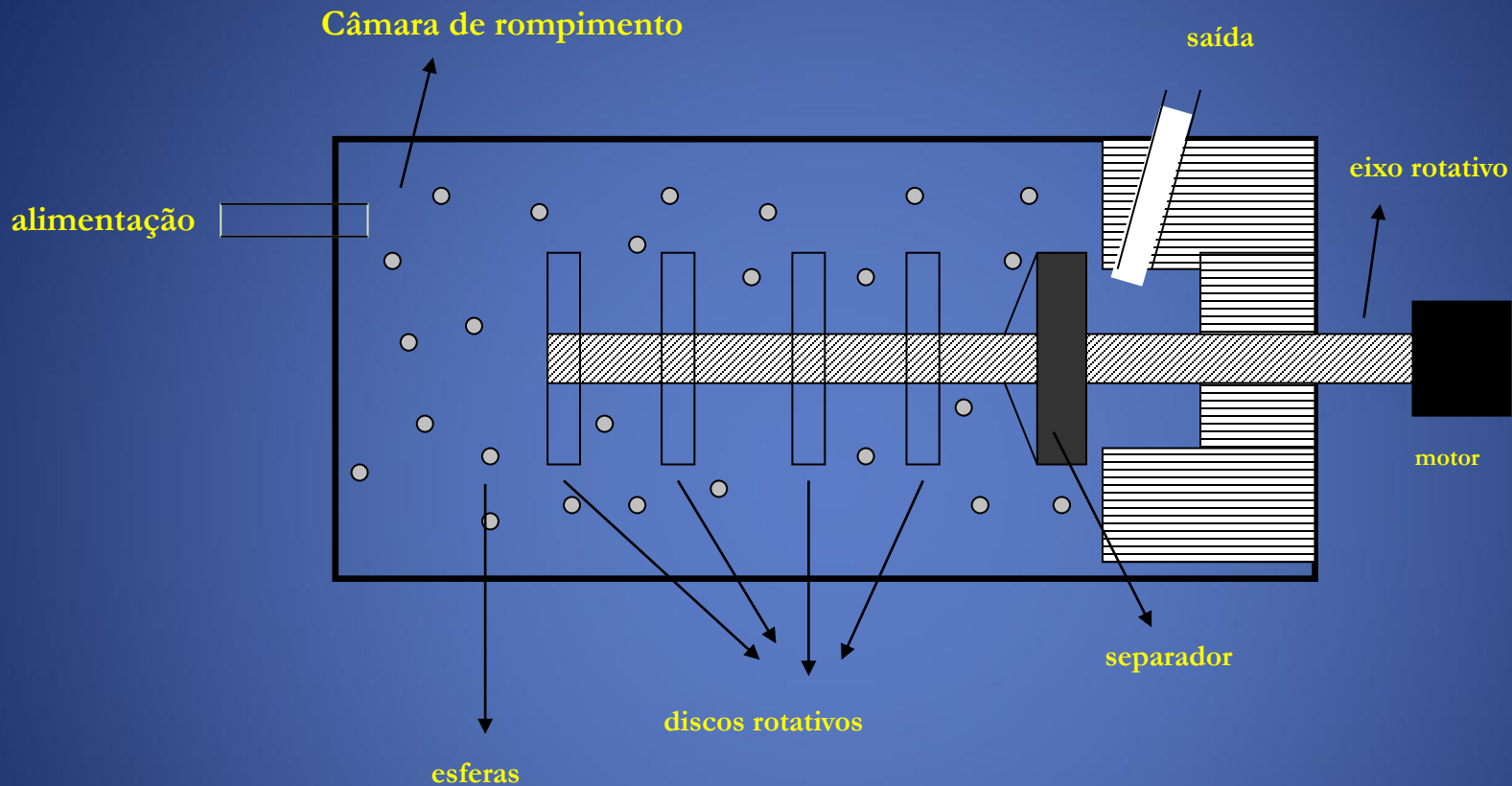
Para cada 1.000 psi na pressão → aumento de 1,5 °C

Se o equipamento for operado a 10.000 psi → a temperatura aumentará 10 °C a cada ciclo de rompimento.

# 3.MOINHO DE BOLAS



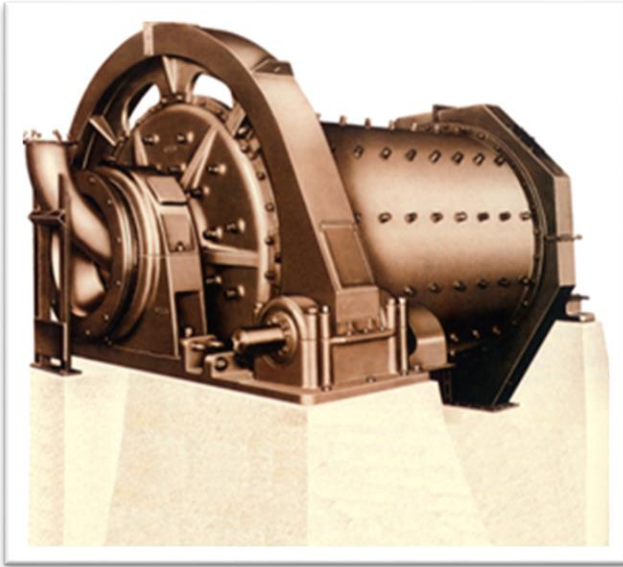
# Esquema simplificado de um moinho de bolas



## MOINHO DE BOLAS

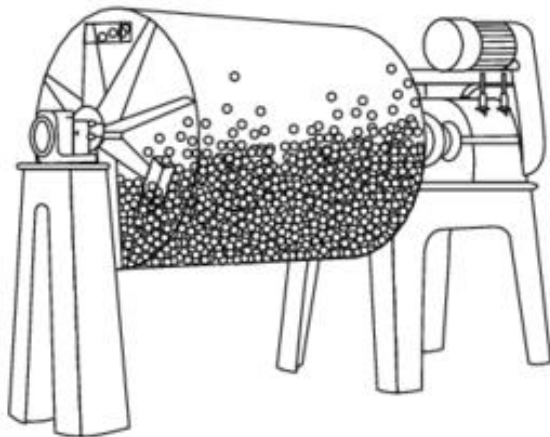
Mecanismo: Dentro da câmara, aumentam a frequência de colisões entre os grânulos e a célula, causando a ruptura da célula por cisalhamento.

# MOINHO DE BOLAS



- Originalmente desenvolvidos para reduzir partículas de pigmentos para indústrias de tintas.
- Foram realizados testes para rompimento celular de fungos filamentosos - 1969
- Projetou-se novos equipamentos adaptados para rompimento celular de fungo filamentosos, leveduras e microalgas.

# MOINHO DE BOLAS



## EFICIÊNCIA DO PROCESSO DEPENDE DE:

- Geometria da câmara de rompimento
  - Velocidade
  - Tipo do agitador
- Tamanho e composição das esferas (vidro, inox e cerâmica)
- Carga de esferas (80-85% câmara horizontal e 50-60% câmara vertical)



# MOINHO DE BOLAS

**Tamanho das perolas de vidro:**

**Bacterias: 0.1 - 0.45 mm.**

**Leveduras: 0.5 – 0.75 mm.**

**Fungos: > 0.85 mm.**





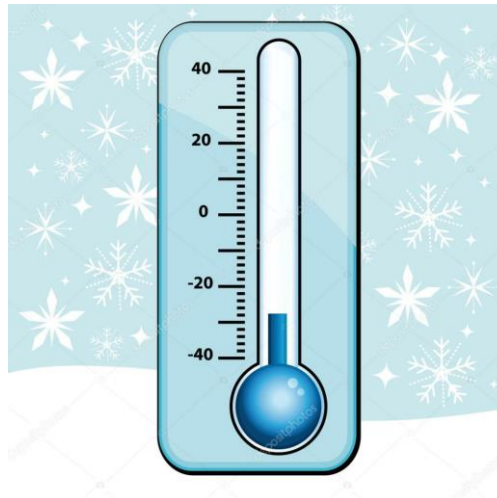
Mikro-Dismembrators

Laboratory ball mills for fine grinding

**Moinho de bolas para rompimento celular em escala de laboratório**

## DESAFIO:

Controle da temperatura – inferior a 5 °C.



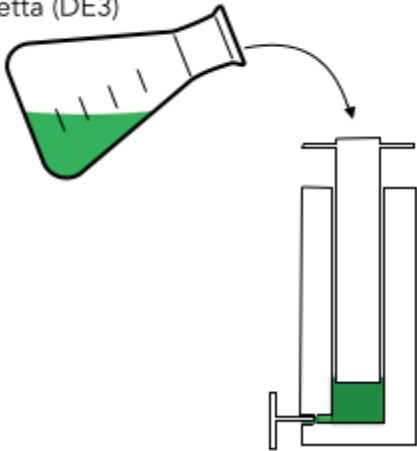
**Possibilidade de utilizar nitrogênio líquido na câmara de rompimento → processo criogênico de rompimento em moinho de bolas**

# 4. PRENSA FRANCESA



Usa a extrusão por pressão → processo mecânico no qual o material é forçado a passar através de uma matriz e ter sua forma alterada.

Expression in  
Rosetta (DE3)



Cell lysis using  
French press

- A prensa francesa consiste em uma bomba hidráulica que aciona um pistão.
- O pistão força a amostra líquida através de uma pequena válvula sob alta pressão.



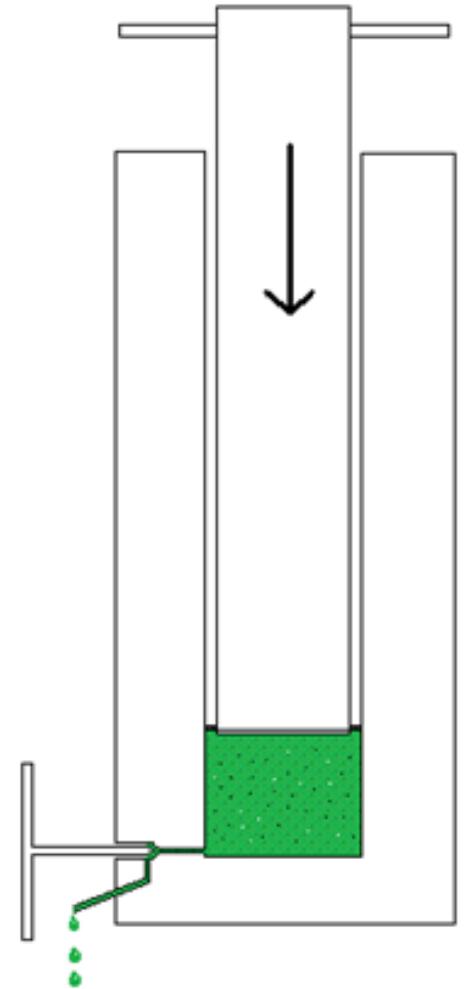
**Estresse por cisalhamento**

- À medida que as células se movem através da válvula, elas sofrem descompressão e subsequentemente se expandem e se rompem.





Figure 2. French Press Cylinder.

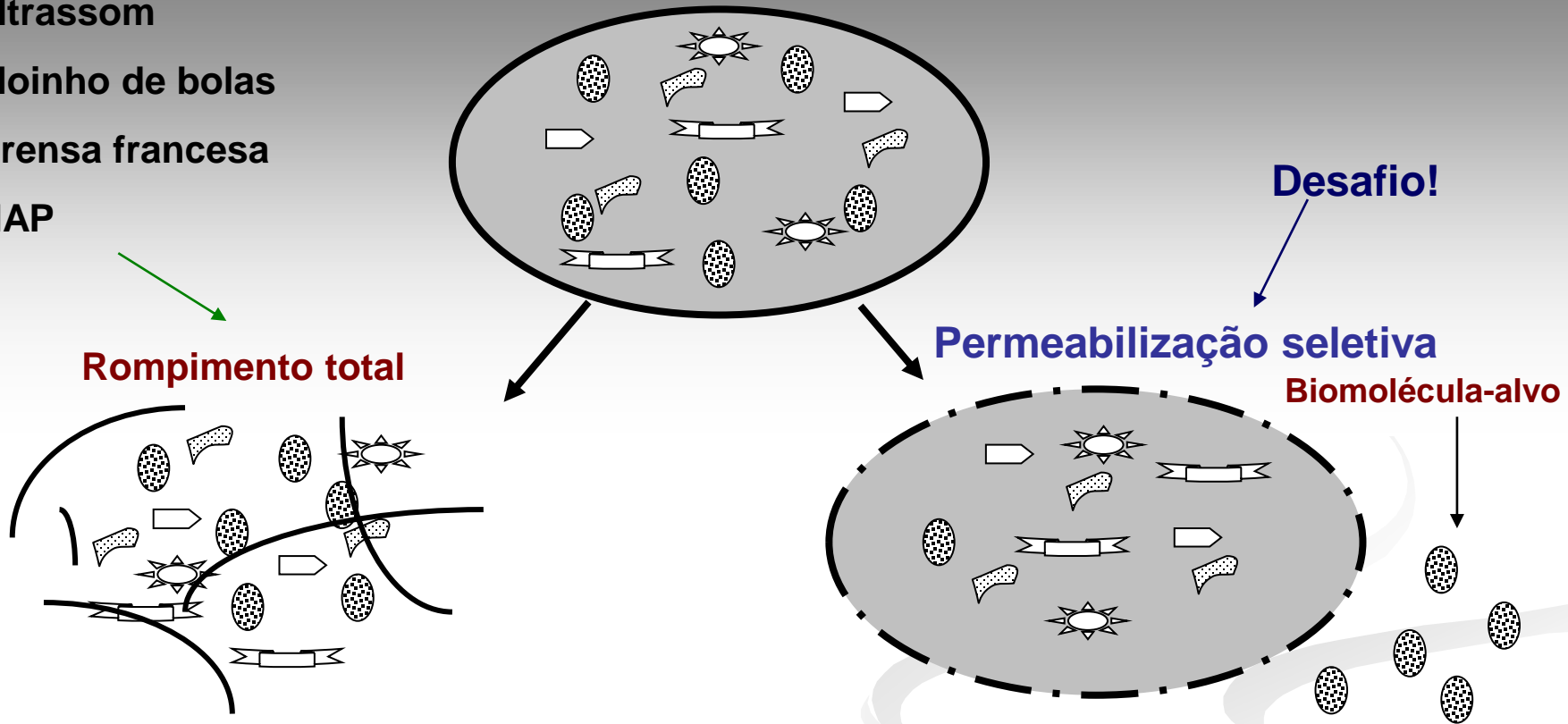


**Apesar de atingir rendimento de até 90% → difícil aplicação em grande escala (trabalho em pequenos volumes e processo descontínuo).**

**Recomenda-se a realização de várias extrusões da mesma amostra.**

# Célula intacta

- Ultrassom
- Moinho de bolas
- Prensa francesa
- HAP



**Esquema comparativo entre rompimento total da célula e permeabilização seletiva**

**ROMPIMENTO TOTAL → DIFICULTA A PURIFICAÇÃO!!**

## Choice of host

Each host system has its own advantages and disadvantages, and it is important to consider these before final selection of host.

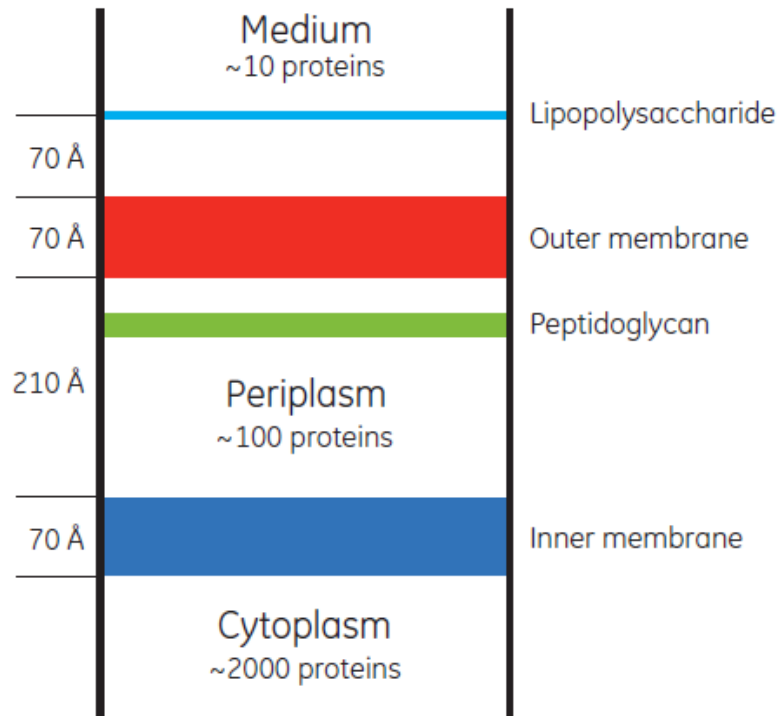


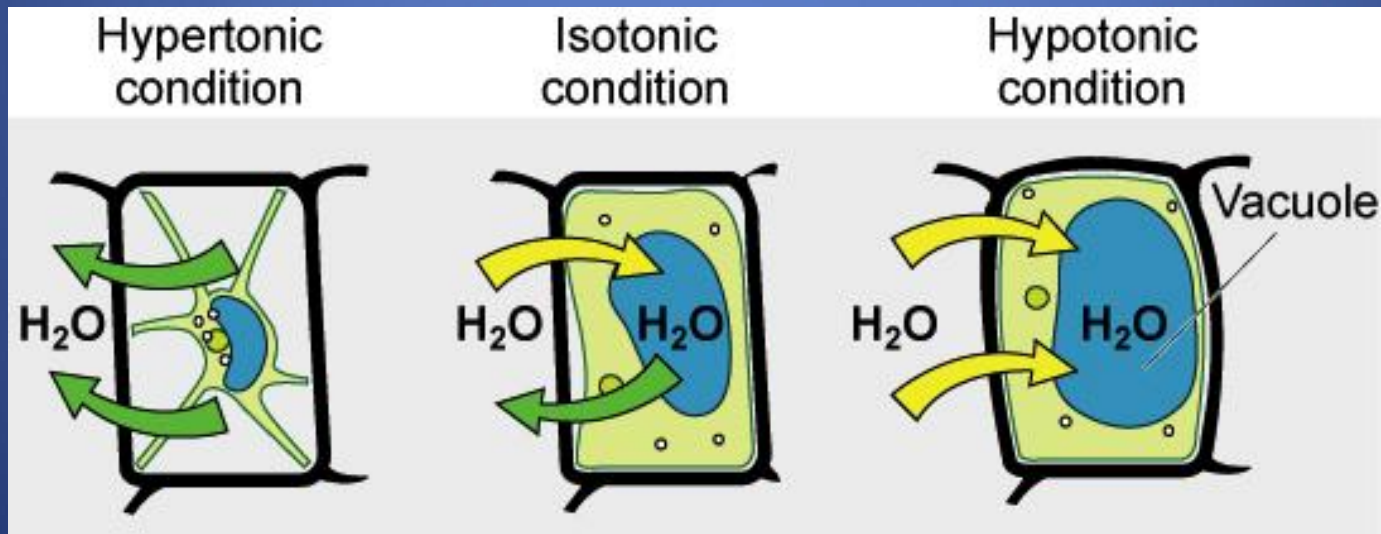
Fig 1.1. Schematic cross-section of the cell wall and typical number of protein species in *E. coli*.

Expression in different parts of the cell will lead to varying amounts of cellular (contaminant) proteins that will need to be removed to obtain a pure target protein.

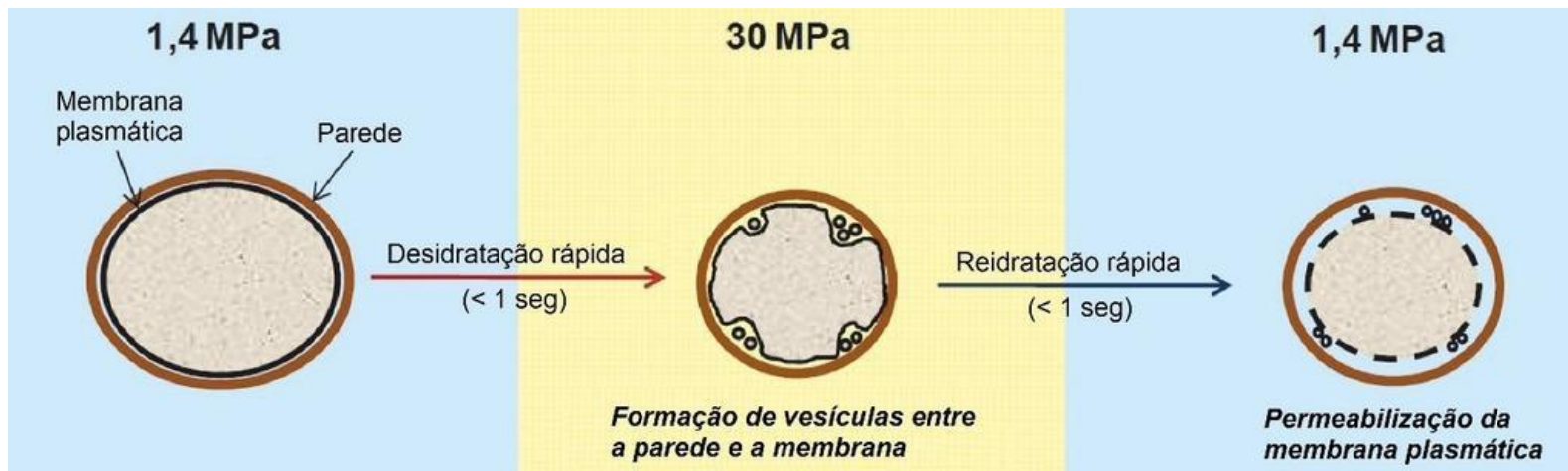


# MÉTODOS NÃO-MECÂNICOS

## CHOQUE OSMÓTICO



- **As células recolhidas são ressuspensas em solução tamponada contendo 20% (m/v) de sacarose.**
- **Após equilíbrio (~30 minutos) centrifuga-se novamente e ressuspende-se o *pellet* em água pura a 4 °C.**
- **Método inadequado para bactérias Gram positivas, pois as mesmas apresentam alta pressão osmótica interna.**
- **Mesmo não rompendo integralmente a célula, propicia permeabilização seletiva, permitindo a saída da molécula alvo.**



# CONGELAMENTO – DESCONGELAMENTO

- **Consiste em se congelar e descongelar as células de forma repetida, em velocidade e temperaturas adequadas. A ruptura\* total ou parcial da parede celular se dá pela ação dos cristais de gelo formados.**

Os fatores de importância a se considerar são: tipo de célula, sua idade, temperatura final de congelamento e velocidades de congelamento e aquecimento.

- **Método demorado e de difícil implantação em grande escala**
- **Enzimas sensíveis ao congelamento podem ser inativadas**





**As enzimas são capazes de hidrolisar as paredes celulares.**

**As principais enzimas bacteriolíticas são: glicosidases, acetilmuramilalanina amidases, neuroaminidase, endopeptidases e proteases.**

**Métodos enzimáticos de rompimento de células são adequados para a recuperação de biomoléculas sensíveis à tensão de cisalhamento ou pressão de trabalho, geradas pelos métodos mecânicos.**

**Desvantagens:** alto custo das enzimas e variação da eficiência da lise enzimática em função do estado fisiológico do micro-organismo.

# ROMPIMENTO QUÍMICO (COM ÁLCALI)

- Hidrólise da membrana e parede celular → saponificação de lipídeos
- Adequado quando a biomolécula-alvo é estável em pH maior que 11

*Erwinia carotovora* → pH 11,5 → L-asparaginase

**Vantagens:** O método é simples, de baixo custo e de fácil ampliação de escala.

**Desvantagem:** geração de poluentes

---

**Detergentes e solventes** → dissociam proteínas e lipídeos da parede celular → formação de poros e liberação da molécula-alvo.

**Triton** → *Norcadia sp.* → **colesterol oxidase**

**Tolueno** → *Agrobacterium radiobacter* → **invertase**



# Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase

Tales A. Costa-Silva\*, Juan Carlos Flores-Santos\*, Rominne K. B. Freire, Michele Vitolo and Adalberto Pessoa-Jr

Department of Pharmaceutical and Biochemical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

## ABSTRACT

The efficacy of a simple laboratory method for cell disruption based on the glass bead stirring, sonication, osmotic shock, freezing and grinding, or use of solvents and detergents was assessed in this study, via measurements of the release of total protein and L-asparaginase activity. Three different microbial sources of L-asparaginase were used: *Escherichia coli* BL21 (DE3), *Leucosporidium muscorum*, and *Aspergillus terreus* (CCT 7693). This study adjusted and identified the best procedure for each kind of microorganism. Sonication and glass bead stirring led to obtaining filamentous fungus cell-free extracts containing high concentrations of soluble proteins and specific activity; however, sonication was the best since it obtained  $4.61 \pm 0.12 \text{ IU mg}^{-1}$  after 3 min of operation time. Mechanical methods were also the most effective for yeast cell disruption, but sonication was the technique which yielded a higher efficiency releasing 7.3 IU<sub>total</sub> compared to glass bead stirring releasing 2.7 IU<sub>total</sub> at the same operation time. For bacterium, sonication proved to be the best procedure due to getting the highest specific activity ( $9.01 \text{ IU mg}^{-1}$ ) and total enzyme activity (61.7 IU). The data presented lead to conclude that the mechanical methods appeared to be the most effective for the disintegration of the all microbial cells studies. This is the first report related to the experimental comparison of L-ASNase extraction procedures from different microorganisms, which can also be used for extracting periplasm located enzymes from other organisms.

## KEYWORDS

Anticancer enzyme;  
L-asparaginase recovery;  
microbial cell disruption;  
periplasmic protein;  
protein release

# Micro-organismos

Foram utilizados 3 tipos diferentes de micro-organismos:

*Escherichia coli*

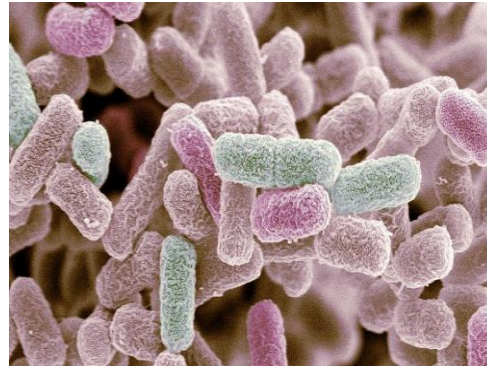
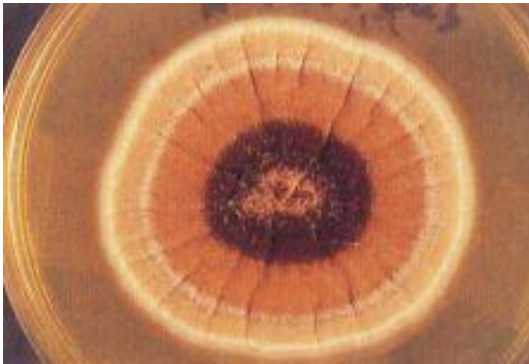
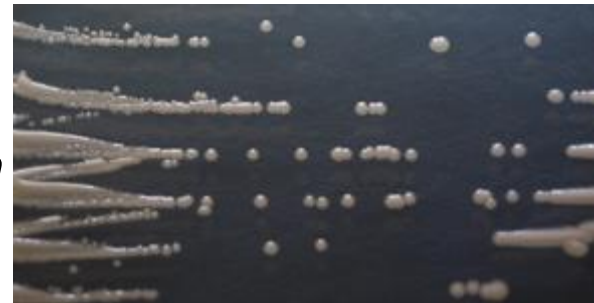


Imagem da Internet



*Aspergillus terreus*

*Leucosporidium muscorum*



# 1. ROMPIMENTOS MECÂNICOS

## Pérolas de vidro



Table 1. Conditions of cellular disruption using glass beads.

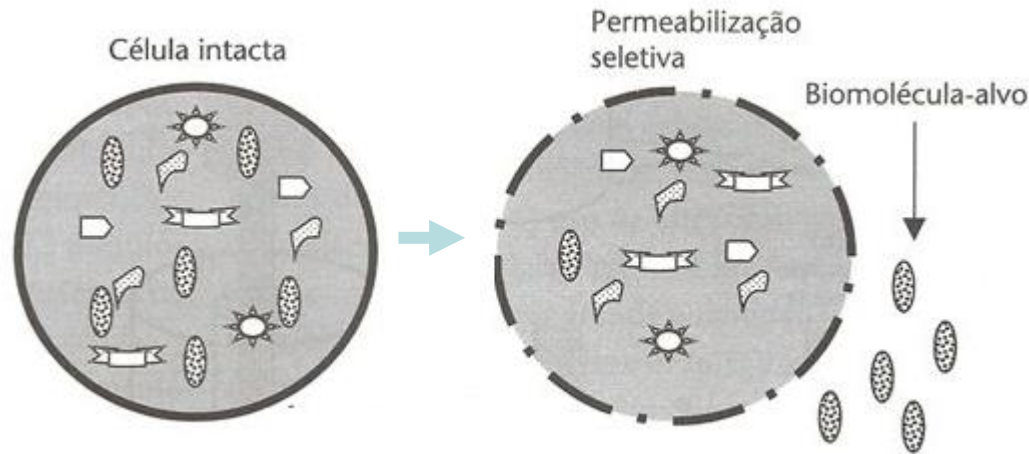
Microorganism	Bead diameter (mm)	Tube volume (mL)	Beads/cell g mL <sup>-1</sup>	Lysis buffer	Stirring/cooling time (s/s)
Bacterium	0.17	2	3:4	Tris-HCl, 20 mM pH 8.0	60/30
Yeast	0.5	2	3:4	Sodium phosphate, 50 mM pH 7.4	60/30
Filamentous fungi	4.0	50	3:6	Tris-HCl, 20 mM pH 8.6	60/45

## Ultrassom



## 2. ROMPIMENTOS FÍSICO

# CHOQUE OSMÓTICO

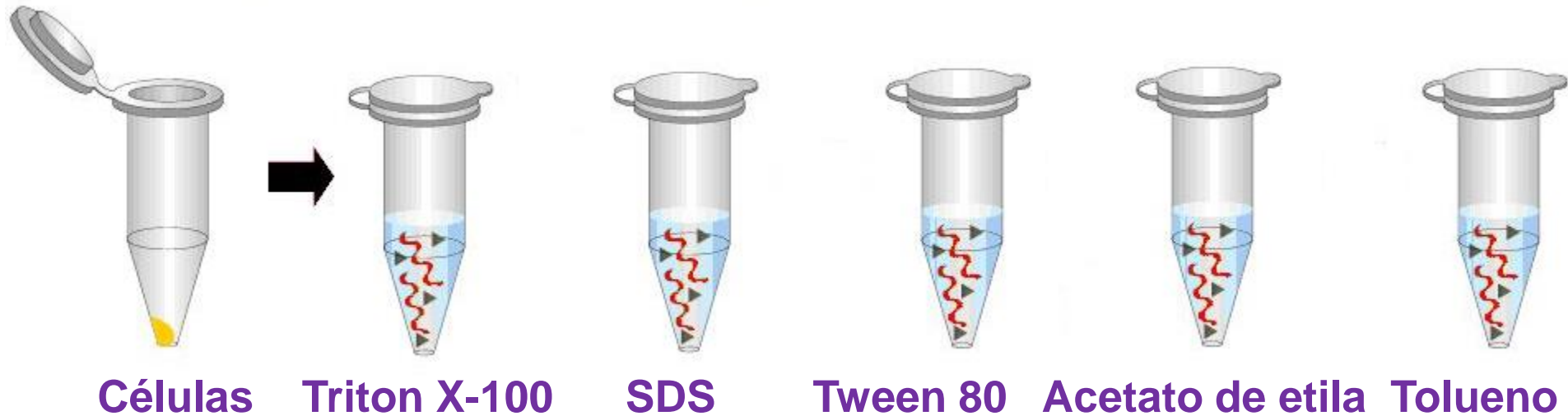


the suspension was treated in two steps:

**(1)** The suspension was dispersed by stirring gently for 10 min in cold solution I (0.5M sucrose, 0.1 or 1.0mM EDTA, 33mM Tris-HCl (pH 7.2). Cells were harvested by centrifugation (10,000X g, 4 °C for 5min) and used in the next stage.

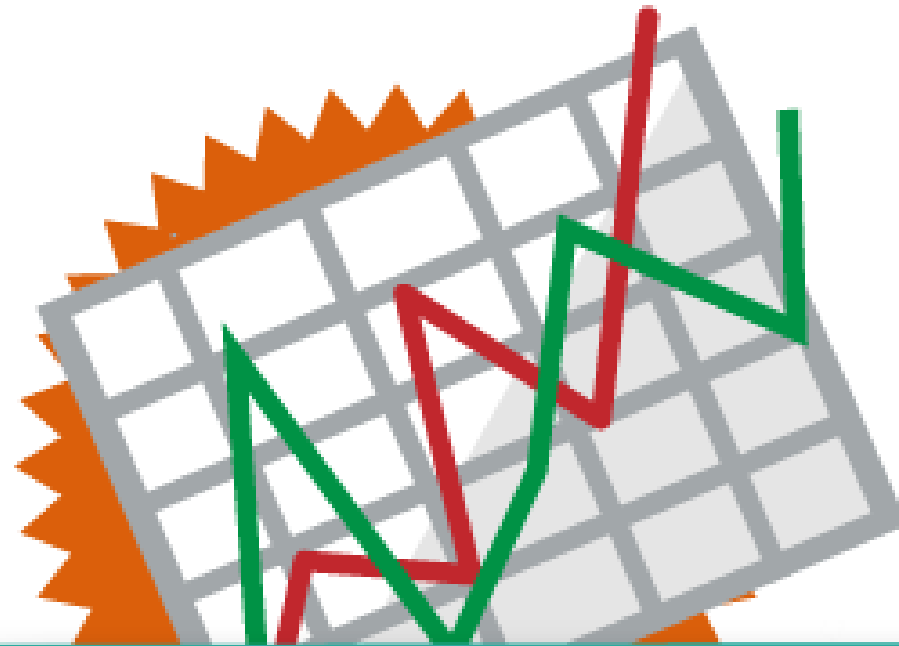
**(2)** The cells were dispersed under gentle stirring for 10 min in cold solution II (0.5mM MgCl<sub>2</sub>), then the cells were centrifuged (10,000X g, 4 °C for 15 min).

# ROMPIMENTOS QUÍMICOS



**Células foram suspensas em tampão na presença de detergentes ou solventes orgânicos.**

**2 horas a 250 rpm e 4 °C → Centrifugação**



**RESULTADOS**

# ROMPIMENTOS FÍSICO

## CHOQUE OSMÓTICO

Table 2. Osmotic shock method for releasing ASNase from *Escherichia coli*, *Leucosporidium Muscorum*, and *Aspergillus terreus*.

ASNase source	EDTA (mM)	Total enzyme activity (IU)		Specific activity (IU mg <sup>-1</sup> )	
		Hypertonic solution <sup>a</sup>	Hypotonic solution <sup>b</sup>	Hypertonic solution	Hypotonic solution
<i>Escherichia coli</i>	0.1	1.15 ± 0.03	1.93 ± 0.17	0.63 ± 0.01	1.76 ± 0.07
	1.0	1.63 ± 0.04	8.20 ± 0.40	0.88 ± 0.04	5.38 ± 0.08
<i>Leucosporidium muscorum</i>	0.1	ND	ND	ND <sup>c</sup>	ND
	1.0	ND	ND	ND	ND
<i>Aspergillus terreus</i>	0.1	0.13 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.16 ± 0.09	0.37 ± 0.04
	1.0	0.24 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.32 ± 0.06	0.87 ± 0.02

<sup>a</sup>Hypertonic solution I (0.5 M sucrose, 33 mM Tris-HCl pH 7.2, 1.0 or 0.1 mM EDTA).

<sup>b</sup>Hypotonic solution II (0.5 mM MgCl<sub>2</sub>).

<sup>c</sup>ND = not detected.

**Ineficiente para levedura e fungo filamentoso**

# ROMPIMENTOS QUÍMICOS

Table 3. Disruption of *Escherichia coli*, *Leucosporidium muscorum*, and *Aspergillus terreus* cells through the chemical method.

Chemical method	ASNase source					
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Leucosporidium muscorum</i>		<i>Aspergillus terreus</i>	
	Total enzyme activity (IU)	Specific activity (IU mg <sup>-1</sup> )	Total enzyme activity (IU)	Specific activity (IU mg <sup>-1</sup> )	Total enzyme activity (IU)	Specific activity (IU mg <sup>-1</sup> )
SDS	34.1 ± 0.12	6.3 ± 0.11	ND	ND	ND	ND
Tween 80	37.6 ± 0.30	8.7 ± 0.06	ND	ND	0.17 ± 0.01	0.43 ± 0.07
Triton X-100	31.2 ± 0.28	7.1 ± 0.22	ND	ND	0.11 ± 0.04	0.27 ± 0.03
Toluene	37.0 ± 0.12	8.7 ± 0.10	ND	ND	ND	ND
Ethyl acetate	37.7 ± 0.14	5.6 ± 0.11	ND	ND	ND	ND

ND: no detected.

**Ineficiente para levedura e fungo filamentoso**



# ROMPIMENTOS MECÂNICOS

## Sonicação

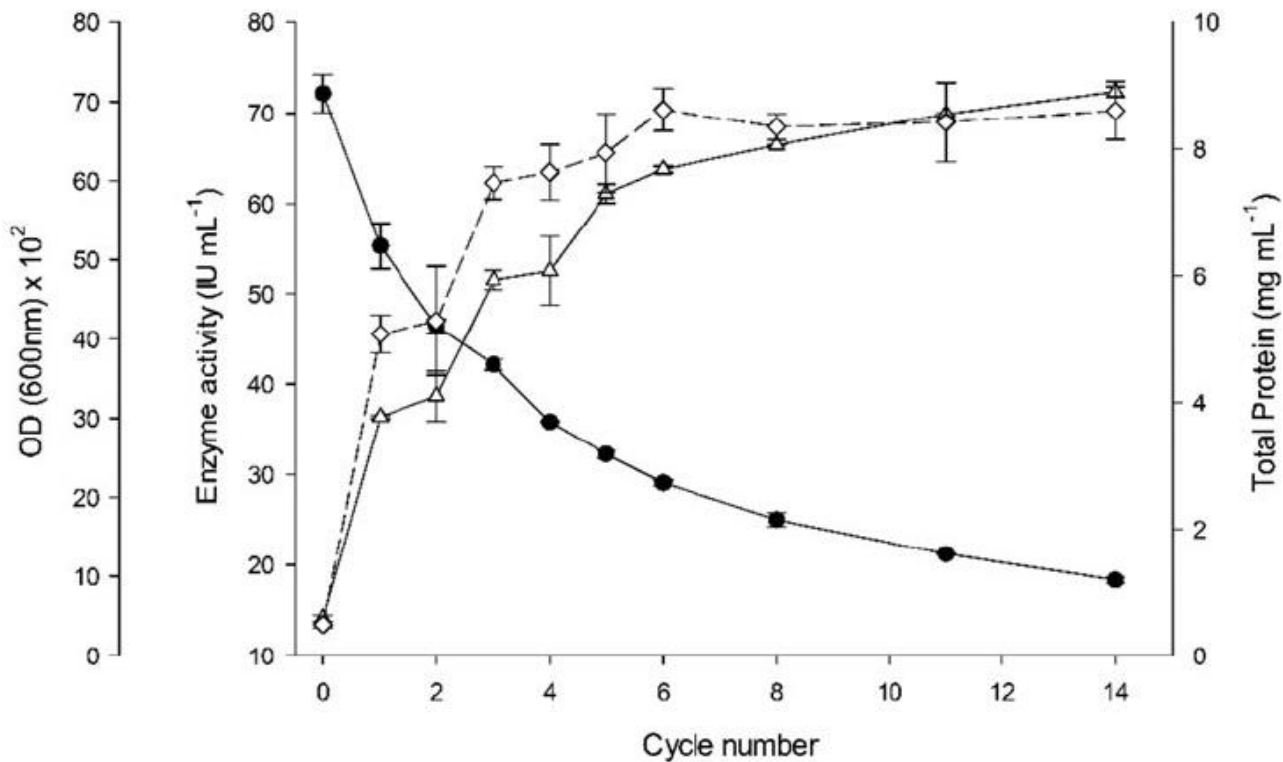


Figure 4. Variation of *Escherichia coli* cell disruption (●), enzyme (◇) and protein (Δ) releasing by the sonication procedure as the number of cavitation/resting cycles increased.

# ROMPIMENTOS MECÂNICOS

## Pérolas de vidro

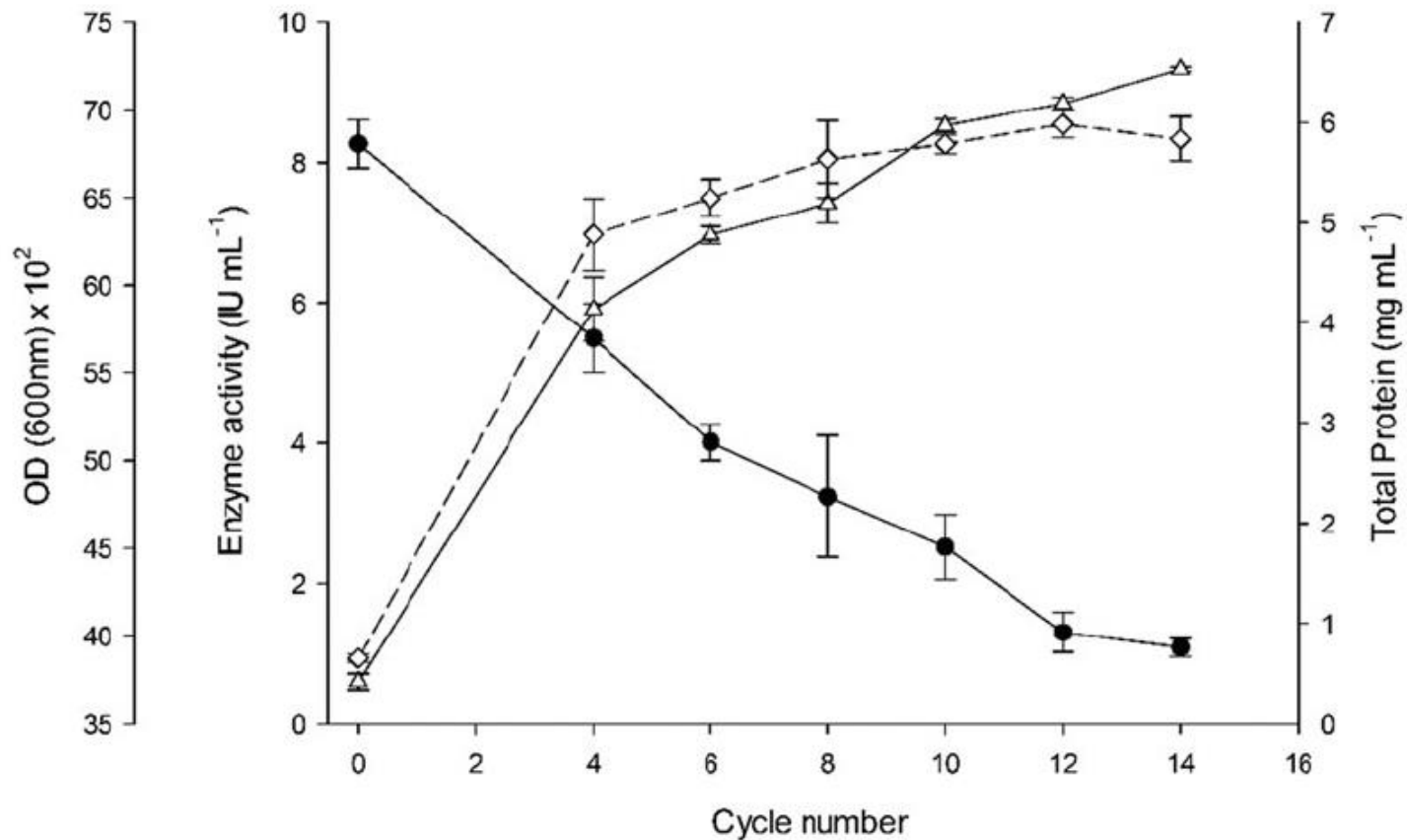


Figure 3. Variation of *Escherichia coli* BL21 (DE3) cell disruption (●), enzyme (◆), and protein (Δ) releasing as the number of stirring/cooling cycles increased.

# COMPARAÇÃO DO MÉTODOS DE ROMPIMENTOS

**Table 4.** Comparison of disruption methods used for microbial ASNase release.

ASNase Source	Specific activity (IU mg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>				
	Methods of disruption				
	Mechanical			Physical	Chemical
Glass beads	Sonication	Freeze grinding			
<i>Escherichia coli</i>	5.09 ± 0.24	9.01 ± 0.24	–	9.12 ± 0.09	8.7 ± 0.10 <sup>b</sup>
<i>Leucosporidium muscorum</i>	0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.002	–	ND	ND
<i>Aspergillus terreus</i>	3.37 ± 0.12	4.6 ± 0.12	2.8 ± 0.62	0.87 ± 0.02	0.63 ± 0.12

<sup>a</sup>Specific activity obtained at the best condition of each disruption method.

<sup>b</sup>By use of 1.5% v/v toluene.

ND: No detected.

## CONCLUSÃO:

**BACTÉRIA → TODOS OS METÓDOS EFICIENTES**

**LEVEDURA → Mecânicos com baixa eficiência**

**FUNGO FILAMENTOSO → METÓDOS MECÂNICOS EFICIENTES**