

THAMIRES RIGHI

**TESTE DE TOXICIDADE *IN VIVO* DO EMULSIFICANTE PROTEICO PHAP
DE *Azotobacter sp.* FA08 EXPRESSO EM SISTEMA HETERÓLOGO
BACTERIANO PARA UTILIZAÇÃO EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte do Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R571t
2017 Righi, Thamires, 1990-
Teste de toxicidade *in vivo* do emulsificante proteico
PHAP de *Azotobacter sp.* FA08 expresso em sistema
heterólogo bacteriano para utilização em alimentos /
Thamires Righi. - Viçosa, MG, 2017.
viii, 42f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Monique Renon Eller.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.32-39.

1. Testes de toxicidade. 2. Biossurfactantes. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 628.4

THAMIRES RIGHI

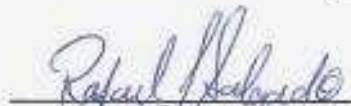
**TESTE DE TOXICIDADE *IN VIVO* DO EMULSIFICANTE PROTEICO PHAP
DE *Azotobacter sp.* FA08 EXPRESSO EM SISTEMA HETERÓLOGO
BACTERIANO PARA UTILIZAÇÃO EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte do Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 05 de outubro de 2017.


Camilo Amaro de Carvalho
(Coorientador)


Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)


Rafael Locatelli Salgado


Monique Renon Eller
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado e me dado forças para continuar a minha trajetória.

Aos meus pais, irmão e familiares por estarem sempre do meu lado, me incentivando, orientando e compreendendo as minhas ausências.

Ao meu sobrinho Iago, pelo carinho, amizade, companheirismo e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Você é meu orgulho!

Aos meus amigos Esther, Serginho, Paula, Carol B., Carol R., Mayara, Nat, Jose e Samuca pela cumplicidade, amizade, irmandade... Às companheiras de república e agregadas (Trá, Madona, Linda, KamisGirl, Teresa e Elaine) e a todos os amigos que de algum modo compartilharam momentos nesses 8 anos de Viçosa. A caminhada sempre foi mais leve ao lado de vocês!

À Universidade Federal de Viçosa e agências de fomento (CAPES), pelas grandes oportunidades de estudo oferecidas durante toda minha vida acadêmica.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Bioquímica e Biologia Molecular (DBB), Departamento de Medicina e Enfermagem (DEM), Departamento de Biologia Geral (DBG), Departamento de Zootecnia (DZO) e ao LIMA (Laboratório de Infectologia Molecular Animal), professores e funcionários pela boa convivência e infraestrutura cedida para execução de experimentos.

Aos professores Mariana Machado e Gustavo Bressan pelos esforços despendidos para realização dos experimentos.

Aos professores Leandro Licursi (DBG) e Camilo Amaro (DEM) pela coorientação e pelos auxílios valiosos durante os experimentos realizados.

Aos amigos Yan, Natália, Fernanda e Grazi por toda convivência e auxílio no ambiente de pesquisa e também fora dele.

Um agradecimento especial à professora Monique por toda confiança depositada em mim, pela sua orientação e extrema competência. Obrigada por toda paciência e motivação

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	vii
RESUMO	i
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Emulsões	2
2.2 Surfactantes	3
2.3 Biossurfactantes	4
2.4 Fasinas	7
2.5 PhaP8	
2.6 Escherichia coli como sistema de expressão de proteínas recombinantes	9
2.6.1 Lipopolissacarídeos (LPS)	10
2.7 Métodos de purificação de proteínas	11
2.7.1 Aquecimento	11
2.7.2 Precipitação fracionada por sulfato de amônio	12
2.7.3 Purificação por cromatografia de afinidade	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivo específico	13
4. METODOLOGIA	13
4.1 Obtenção do liofilizado proteico contendo a PhaP	14
4.1.1 Produção/ Expressão da PhaP	14
4.1.2 Recuperação e purificação da proteína PhaP	15
4.2 Avaliação da toxicidade da proteína PhaP	16
4.2.1 Delineamento experimental	17
4.2.2 Análise sanguínea: hemograma e bioquímica	18

4.2.3	Análise histológica qualitativa	19
5.	RESULTADOS	19
5.1	Obtenção da proteína PhaP	20
5.2	Teste toxicológico	21
5.2.1	Parâmetros hematológicos e bioquímicos	22
5.2.2	Análise histológica qualitativa	24
6.	DISCUSSÃO	27
7.	CONCLUSÃO	31
8.	REFERÊNCIAS	41
9.	ANEXOS	42

LISTA DE ABREVIACÕES

ALT: Alanina aminotransferase

AQ: Aquecimento

AST: Aspartato aminotransferase

C.A: Cromatografia de afinidade

CTR: Grupo controle

GRA: Granulócitos

HCT: Hematócrito

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HGB: Hemoglobina

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LYM: Linfócitos

MCH: Hemoglobina corpuscular média

MCHC: Concentração de hemoglobina corpuscular média

MID: Teor da mistura de monócitos, eosinófilos, basófilos e células imaturas

MVC: Volume corpuscular médio

RBC: Células vermelhas (eritrócitos)

RDW: Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos

S.A: Sulfato de amônio

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

WBC: Células brancas (leucócitos)

RESUMO

RIGHI, Thamires, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2017. **Teste de toxicidade in vivo do emulsificante proteico PhaP de *Azotobacter sp.* FA08 expresso em sistema heterólogo bacteriano para utilização em alimentos.** Orientadora: Monique Renon Eller. Coorientadores: Camilo Amaro de Carvalho, Leandro Licursi de Oliveira, Gustavo Costa Bressan, Mariana Machado Neves e Rafael Locatelli Salgado.

A PhaP é uma pequena molécula proteica com característica anfifílica, localizada na superfície de grânulos de polihidroxialcanoatos (PHA) e a sua habilidade em interagir com superfícies hidrofóbicas despertou interesse pela sua atividade como biosurfactante. Durante experimentos de expressão heteróloga da proteína PhaP em *Escherichia coli*, fora observado a “solubilização” atípica dos componentes celulares após a lise pelo processo de sonicação; entretanto, os métodos de ruptura de célula para liberação das moléculas produzidas por *E. coli* recombinante levam a liberação de grandes quantidades de LPS. Dessa forma, os produtos provenientes dessa bactéria, precisam passar por processos de purificação. Neste trabalho foi avaliado a toxicidade do biosurfactante PhaP de *Azotobacter sp.* FA8, expresso em *E. coli*, e três diferentes metodologias de purificação, sendo, aquecimento (AQ), precipitação fracionada (S.A) e cromatografia de afinidade (C.A) e, ao final, as proteínas foram liofilizadas, diluídas na quantidade de 50 mg/kg e utilizadas para o teste de toxicidade *in vivo*. Não ocorreu a morte de nenhum animal durante os 14 dias de tratamento diário, entretanto, a partir do 4º dia de tratamento alguns animais apresentaram diarreia. Tanto a série vermelha (RBC, HGB e HCT) quanto a série branca (WBC, LYM, MID e GRA) se mantiveram inalteradas em relação à quantidade e morfologia nos diferentes tratamentos. Não foi observada diferença nos níveis de creatinina, ureia e no perfil lipídico dos animais (colesterol total, triglicerídeos, HDL, VLDL e LDL). A quantidade de albumina foi maior no grupo C.A em relação ao grupo S.A, a quantidade de ALT e AST foi maior em relação aos grupos C.A e S.A e C.A, S.A e controle, respectivamente. Não foram observadas diferenças na morfologia nos órgãos dos animais tratados durante 14 dias consecutivos com a PhaP. Dessa forma conclui-se que através da associação da análises histológica, ausência na alteração dos valores do hemograma, da creatinina e da ureia que o biosurfactante PhaP, assim como possíveis vestígios de LPS presentes na amostra, não foram capazes de alterar a estrutura morfológica das células, o funcionamento dos órgãos associados ao metabolismo e digestão de substâncias ingeridas pelo trato gastro-intestinal, nem provocaram intoxicação nos animais.

ABSTRACT

RIGHI, Thamires, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2017. **In vivo toxicity test of the protein emulsifier PhaP de *Azotobacter* sp. FA08 expressed in a bacterial heterologic system for use in foods.** Advisor: Monique Renon Eller. Advisors: Camilo Amaro de Carvalho, Leandro Licursi de Oliveira, Gustavo Costa Bressan, Mariana Machado Neves and Rafael Locatelli Salgado.

PhaP is a small amphiphilic protein molecule located on the surface of polyhydroxyalkanoate (PHA) granules and its ability to interact with hydrophobic surfaces has aroused interest in its activity as biosurfactants. During experiments of heterologous expression of the PhaP protein in *Escherichia coli*, our research group observed atypical "solubilization" of the cellular components after lysis by the sonication process, however, the cell rupture methods for release of the molecules produced by *E. coli* recombinant cells lead to the release of large amounts of LPS. In this way, the products derived from this bacterium must undergo purification processes. The low toxicity of *Azotobacter* sp. Biosurfactant PhaP was tested. (AQ), fractional precipitation (SA) and affinity chromatography (CA), and, finally, the proteins were lyophilized, diluted in the amount of 50 mg / kg and used for the *in vivo* toxicity test. No animals died during the 14 days of daily treatment, however, from the 4th day of treatment, some animals presented diarrhea. Both the red series (RBC, HGB and HCT) and the white series (WBC, LYM, MID and GRA) remained unchanged in relation to the quantity and morphology in the different treatments. No difference was observed in creatinine, urea and lipid profile of the animals (total cholesterol, triglycerides, HDL, VLDL and LDL). The amount of albumin was higher in group C.A compared to group S.A, the ALT and AST was higher in groups C.A and S.A or C.A, S.A and control, respectively. No difference was observed in the morphology of the organs of the animals treated for 14 consecutive days with PhaP. In this way, was concluded by associating histological analysis, absence of changes in hemogram, creatinine and urea values, that the PhaP biosurfactant, as well as possible traces of LPS present in the sample, were not able to alter the morphological structure of the cells. functioning of the organs associated with the metabolism and digestion of substances ingested by the gastro-intestinal tract and did not provoke intoxication in the animals.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os biosurfactantes são moléculas anfipáticas produzidas principalmente por microrganismos a partir de vários substratos incluindo açúcares, óleos, alcanos e aminoácidos, e são considerados menos tóxicos, renováveis e apresentam maior biodegradabilidade em relação aos demais surfactantes (WEI et al., 2011). Na indústria de alimentos, essas moléculas são utilizadas na produção de emulsões como maionese, chocolate, molhos para saladas, sorvetes, sopas, margarinas, manteigas, etc. Proteínas podem atuar como surfactantes ou emulsificantes devido à sua capacidade de adsorver na interface de fases imiscíveis e reduzir a tensão interfacial do sistema, levando a uma menor instabilidade cinética das emulsões (DAMODARAN, 2005).

A PhaP é uma pequena molécula proteica anfifílica, localizada na superfície de grânulos de polihidroxialcanoatos (PHA). A habilidade da PhaP de interagir com superfícies hidrofóbicas despertou interesse pela sua atividade como biosurfactantes (WEI et al., 2011). Durante experimentos de expressão heteróloga da proteína PhaP de *Azotobacter* sp. FA08 em *Escherichia coli*, observou-se a solubilização atípica dos componentes celulares dessa bactéria após sua lise, o que levou à busca por propriedades dessa proteína que explicassem esse fenômeno. Dessa forma, foi demonstrado o potencial uso dessa molécula para a estabilização de emulsões e solubilização de compostos lipofílicos (SALGADO, 2015).

A expressão de biomoléculas em *E. coli* e sua recuperação via processos de ruptura celular levam à contaminação do sistema por lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana dessa bactéria (LOPES; ELBINUMA; MAZZOLA, 2012). Dessa forma, os produtos gerados a partir desses sistemas precisam passar por processos de purificação para que sejam considerados seguros para uso no setor alimentício. Entretanto, o acréscimo de etapas de purificação aumenta o custo associado ao processo. Assim, para viabilização da comercialização de proteínas expressas nesses sistemas faz-se necessário estudos de metodologias de purificação de baixo custo e que gerem produtos que não representem riscos à saúde do consumidor.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade da PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 expressa em *Escherichia coli* recuperada por diferentes metodologias de purificação para viabilizar o uso desse biosurfactante na indústria de alimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Emulsões

Uma emulsão é formada quando uma fase líquida está completamente difusa em outra, imiscível àquela, na forma de gotículas (BECHER, 1965). A formação de uma emulsão consiste na mistura sob agitação constante das fases imiscíveis, promovendo a dispersão das gotículas na fase contínua (BOUYER et al., 2012) (Figura 1).

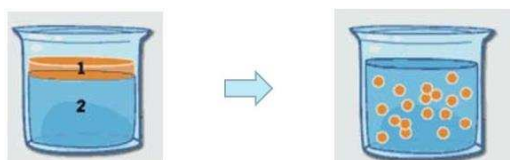


Figura 1. Ilustração de formação de emulsões através da dispersão de gotículas em uma fase líquida imiscível a ela.

As emulsões podem ser simples ou múltiplas; emulsões simples são compostas por duas fases, nas quais uma está dispersa na outra, enquanto emulsões múltiplas são constituídas por sistemas complexos envolvendo mais de duas fases (PEREIRA, 2015). O exemplo mais simples desse tipo de emulsão consiste no sistema óleo em água em óleo (O/W/O) (OLIVIERI et al., 2001).

A emulsificação de duas fases imiscíveis na forma de gotículas dispersas leva a um aumento da área interfacial entre as fases, ocasionando também em um aumento significativo da energia livre do sistema (REDDY, 1980). Isso faz com que emulsões sejam, por definição, termodinamicamente instáveis, levando à separação de fases (BOUYER et al., 2012). O processo de união de duas ou mais parcelas de uma fase é conhecido como coalescência.

A instabilidade cinética das emulsões pode ser reduzida a partir da adição de substâncias conhecidas como agentes emulsificantes, agentes de espessamento ou surfactantes, antes da homogeneização (REDDY, 1980). Na indústria são utilizados vários sistemas de emulsões, as quais dependem da utilização desses agentes. Surfactantes possuem a capacidade de reduzir a tensão interfacial de uma solução aquosa

devido à sua composição química de natureza anfifílica (KACI et al., 2016). Essa redução permite a estabilização da dispersão de gotículas de uma fase em outra com polaridade oposta, havendo assim a diminuição da instabilidade da emulsão (DICKINSON, 1897).

A indústria de alimentos é considerada a maior consumidora de emulsificantes. Exemplos de emulsões simples óleo/água (O/A) são o leite, o iogurte, os cremes, os molhos para saladas, a maionese, o sorvete e as sopas. Sistemas formados por gotas de água dispersas em uma fase óleo, chamados emulsões simples água/óleo (A/O), têm como exemplos a margarina e a manteiga (PEREIRA, 2015).

Os emulsificantes mais utilizados em alimentos são a lecitina, ésteres de ácidos graxos de origem animal ou vegetal e álcoois polivalentes, como glicerol, propilenoglicol, sorbitol e sacarose. Estes podem ser adicionalmente esterificados com ácidos orgânicos, como ácido láctico, tartárico, succínico, cítrico (SANTOS, 2008). A emulsificação tem um papel importante na formação da textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

2.2 Surfactantes

Os surfactantes (do acrônimo “surface active agent”) são moléculas anfipáticas que se acumulam na interface de duas fases imiscíveis diminuindo a tensão interfacial entre elas, ou seja, diminuindo a energia livre da superfície por unidade de área (ROSEN, 1978). A eficácia de um surfactante é determinada, em parte, pela sua capacidade de diminuir a tensão interfacial de um sistema. Eles possuem a capacidade de compor a interface de estruturas agregadas, diminuindo a instabilidade cinética desses sistemas pela alteração do comportamento interfacial (Figura. Estas propriedades fazem os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, formação de espumas, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

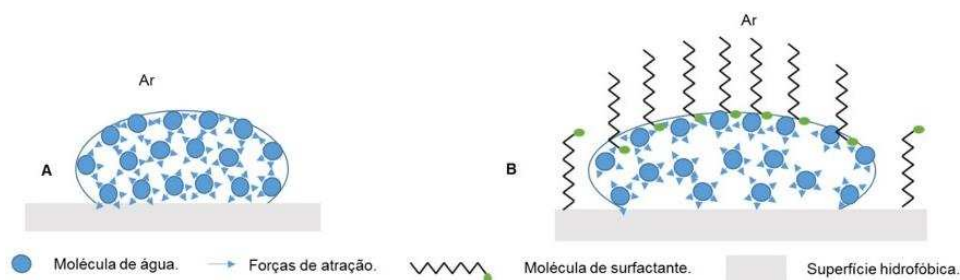


Figura 2. (A) Representação esquemática de uma gota de água em uma superfície hidrofóbica. (B) Mesma superfície contendo moléculas de surfactante (OLIVEIRA; DIAS, 2017).

Os surfactantes são geralmente caracterizados por propriedades como a concentração micelar crítica (CMC), o equilíbrio lipofílico-hidrofílico (hydrophilic-lipophilic balance, HLB), a estrutura química e de carga, bem como pela fonte de sua obtenção (BURGOS-MÁRMOL et al., 2016). A CMC é definida como a concentração mínima necessária para iniciar a formação de micelas (BECHER, 1965). A tensão interfacial correlaciona-se com a concentração do composto ativo de superfície até que a CMC seja atingida (ATWOOD, 1983). Surfactantes eficazes têm uma baixa concentração micelar crítica, isto é, menos agente surfactante é necessário para diminuir a tensão superficial (ATWOOD, 1983).

Surfactantes químicos são em sua maioria derivados de petróleo, não-renováveis, possuem toxicidade elevada e difícil decomposição natural (SCHMITT, 2001). Os principais exemplos de agentes surfactantes químicos amplamente utilizados na indústria incluem o dodecil sulfato de sódio (SDS), Tween e Triton X- 100. Os impactos ambientais e a alta toxicidade dessas moléculas têm levado à pesquisa e ao desenvolvimento de novos surfactantes, especialmente para uso na área farmacêutica e biomédica (MA et al., 2013b), de alimentos e cosméticos (KACI et al., 2016) e agricultura (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

2.3 Biosurfactantes

Biosurfactantes são moléculas produzidas por seres vivos, normalmente microrganismos, que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão interfacial. Eles geralmente consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos, leveduras e extratos de plantas (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biosurfactantes são produzidos a partir de vários substratos incluindo açúcares, óleos, alcanos e aminoácidos; são considerados menos tóxicos, renováveis e apresentam maior biodegradabilidade que os surfactantes químicos (WEI et al., 2011). Os biosurfactantes podem compreender moléculas de diferentes composições químicas como glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). Grande parte dessas moléculas constitui compostos aniônicos ou neutros. Estruturalmente, a maioria dos biosurfactantes possui a parte hidrofóbica da molécula baseada em ácidos graxos de cadeia longa e a porção hidrofílica como um carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool (DALVIN, 2011).

Biosurfactantes são aplicados para diminuir a instabilidade cinética de emulsões nas mais diversas áreas como, por exemplo, agricultura (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013), cosméticos (KACI et al., 2016), farmacêutica (BOUYER et al., 2012), limpeza (NITSCHKE; PASTORE, 2002) e alimentos (KACI et al., 2016). Os biosurfactantes podem ser utilizados em áreas de saúde humana e animal, como na formulação de carreadores de substâncias bioativas e antimicrobianas (MA et al., 2013b) e na formulação de adjuvantes (MANSILLA et al., 2012), que estabilizam emulsões formadas durante a formulação de vacinas e podem promover maior eficiência na resposta imunológica. Um dos biosurfactantes mais conhecidos é a surfactina. Ela pode ser aplicada para a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral (SANTOS, 2012).

Algumas células microbianas, por apresentarem elevada hidrofobicidade superficial, são consideradas biosurfactantes. Alguns exemplos são os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, como algumas espécies de *Cyanobacteria*, e alguns patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Serratia* sp (KAPPELI; FINNERTY, 1979). Bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. produzem vesículas extracelulares, possuindo atividade surfactante com importante função na captação de alcanos para a célula (NITSCHKE; PASTORE, 2002). As vesículas e células microbianas com atividade surfactante são classificadas como biosurfactantes particulados (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

Os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Os mais utilizados são mono ou di-glicéridos, ésteres de glicol, derivados de polióxi-etileno (triesterato de sorbinata, polisorbatos) e os fosfolipídeos, especialmente a lecitina, um fosfolipídeo extraído principalmente de ovo e soja (AZZAM et al., 2012; SONG et al., 2011). Na tabela 1 estão descritos alguns biossurfactantes utilizados comercialmente e os microrganismos produtores.

Quadro 1. Principais biossurfactantes utilizados comercialmente e microrganismos produtores (adaptado de NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Tipo de biossurfactante	Microrganismo
GLICOLIPÍDEOS	
Ramnilipídeos Soforolipídeos Trealolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
LIPOPEPTÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS	
Viscosina Surfactina	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus subtilis</i>
SURFACTANTES POLIMÉRICOS	
Emulsan Biodispersan Liposa	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i>

A indústria de alimentos obteve sucesso com o uso de polissacarídeos e proteínas como emulsificantes/estabilizantes na formulação de emulsões (BOUYER et al., 2012). Os surfactantes proteicos usualmente empregados na indústria são geralmente utilizados para preparar emulsões em concentrações variando entre 1,0 a 3,0% (m/m) (10 a 30 mg.mL⁻¹) (DAMODARAN, 2005). Exemplos de proteínas usadas comercialmente para a estabilização de emulsões são a caseína (caseinato de sódio) (HUCK-IRIART, 2011), proteínas extraídas de trigo (SCHMALENBERG, 2010) e proteínas globulares do soro do leite, como beta-lactoglobulina, alfa-lactalbumina e a soroalbumina (KOTSMAR, 2008; TCHOLAKOVA, 2006).

2.4 Fasinas

As fasinas (phasins - PF05597) compreendem uma família de proteínas normalmente associadas a grânulos de poli-3-hidroxibutirato (PHB), um dos polímeros mais bem conhecidos da classe dos poli-hidroxialcanoatos (PHAs) (MATSUMOTO et al., 2002) (Figura 3).

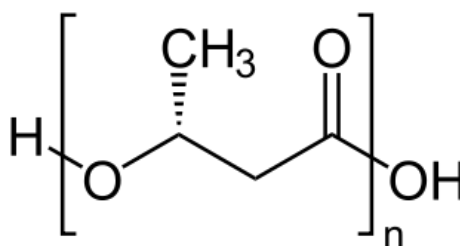


Figura 3. Estrutura molecular geral de um poli-3-hidroxibutirato

PHAs são polímeros biodegradáveis produzidos naturalmente por muitos gêneros de bactérias (VEGA-CASTRO et al., 2016). São corpos de inclusão intracelulares utilizados como reservas de energia em resposta aos meios com excesso de carbono e quantidades limitadas de nitrogênio, oxigênio e fósforo (VEGA-CASTRO et al., 2016). Os PHAs se acumulam na célula na forma de grânulos e são alvos de pesquisas principalmente pelo seu potencial de formação de polímeros biodegradáveis, em substituição aos plásticos sintéticos (CENTENO-LEIJA et al., 2014; URTUVIA, 2014).

Na célula bacteriana, os PHAs interagem com diversas proteínas, dentre elas as fasinas, as quais são responsáveis pela sua síntese e estabilização. Entre as proteínas que integram a família das fasinas com função de sintetizar PHA em bactérias estão PhaP1, PhaP2, PhaP3, PhaP4, PhaP5, PhaP6 e PhaP7 de *Ralstonia eutropha* (PFEIFFER; JENDROSSEK, 2012; PÖTTER et al., 2004; WIECZOREK et al., 1995), PhaP de *Bacillus megaterium* (MCCOOL; CANNON, 1999), PhaF e PhaI de *Pseudomonas putida* (GALÁN et al., 2011), PhbP de *Azotobacter vinelandii* (PERALTA-GIL et al., 2002).

Além de seu papel estrutural como parte da cobertura de grânulos de PHA, diferentes funções têm sido associadas às fasinas, como atividades reguladora (PhaF de *Pseudomonas putida*) (GALÁN et al., 2011) e repressora (PhaR). PhaR é a proteína responsável pela regulação da síntese de PHA e possui propriedades anfifílicas, com potencial biossurfactante e como agente bactericida. Em estudos feitos por Hong-Kun

Ma, em 2013, PhaR apresentou boa compatibilidade aos substratos oleosos e provável compatibilidade com pele e corpo humano (MA et al., 2013a). PhaP1 produzida por *Ralstonia eutropha* H16 apresenta capacidade de se ligar à superfície de inclusões lipídicas (HANISCH; WALTERMANN; ROBENEK, 2006), enquanto PhaP produzida por *Aeromonas hydrophila* 4AK4 possui atividade biossurfactante e emulsificante (WEI et al., 2011).

2.5 PhaP

A PhaP é uma pequena molécula proteica com característica anfifílica, localizada na superfície de grânulos de PHA, constituindo a interface entre as regiões hidrofóbica dos grânulos e hidrofílica do citoplasma, sendo aproximadamente 5% (m/m) do total de proteínas da célula (CAI et al., 2012).

A habilidade da PhaP em se ligar à superfície hidrofóbica foi usada para desenvolver métodos de purificação de proteínas recombinantes (WANG et al., 2008), veículo de drogas, engenharia de tecidos (WANG et al., 2010) e biossurfactantes (WEI et al., 2011). A PhaP produzida por *Aeromonas hydrophila* 4AK4 já foi usada para emulsificar óleos de soja, lubrificante e diesel (WEI et al., 2011). Os resultados, quando comparados com surfactantes convencionais como dodecil-sulfato de sódio (SDS), Tween 20, BSA e detergente líquido, comprovaram seu potencial de aplicação (WEI et al., 2011).

Durante experimentos de expressão heteróloga da proteína PhaP em *E. coli*, nosso grupo de pesquisa observou a solubilização atípica dos componentes celulares após a lise pelo processo de sonicação, o que levou à busca por propriedades dessa proteína que explicassem esse fenômeno. Dessa forma, uma aplicação inédita para esta proteína foi descoberta. Esse trabalho originou uma carta pedido de patente no Brasil para o uso de uma proteína associada a grânulos de polihidroxialcanoato (PhaP) de *Azotobacter* sp. FA8, da família *Phasin 2* (PF09361), em sua sequência de ocorrência natural como biossurfactante na obtenção e estabilização de emulsões (SALGADO et al., 2015).

Como vantagens da aplicação proposta podem ser citadas, além daquelas inerentes ao uso de biossurfactantes (menor toxicidade, biodegradabilidade e produção a partir de fontes renováveis), a sua estabilidade estrutural e térmica, a possibilidade de produção

em sistemas microbióticos (como bactérias, leveduras, entre outros) em meios fermentativos simples, de baixo custo e de alto rendimento, além de esta proteína ter se mostrado mais eficiente na redução da tensão superficial em relação a outros surfactantes proteicos já descritos, como por exemplo, um concentrado proteico de proteínas globulares do leite (SALGADO, 2015). Essas características tornam a PhaP uma excelente alternativa para uso em indústrias devido à possibilidade de utilização em sistemas escalonados, além de sua resistência a uma ampla faixa de condições de armazenamento e processamento.

2.6 *Escherichia coli* como sistema de expressão de proteínas recombinantes

Uma das principais fontes produtoras de biosurfactantes proteicos utilizadas atualmente na indústria são os microrganismos como leveduras, fungos e bactérias (ZIMMER et al, 2009). Estes são considerados fontes atrativas e de baixo custo na produção de metabólitos a partir do uso de fontes renováveis (PASTORE, 2005), por apresentarem grande capacidade adaptativa e por poderem ser cultivados em grandes quantidades, em tempo relativamente curto (ZIMMER et al., 2009).

Dentre os microrganismos utilizados na produção de biomoléculas, diversas bactérias e fungos são produtores de toxinas (CRUZ-MACHADO, 2010). As toxinas produzidas por bactérias podem ser classificadas em exotoxinas (proteínas produzidas dentro da célula como parte de seu metabolismo e secretadas posteriormente) e endotoxinas, que constituem a parte externa da parede celular de bactérias gram-negativas, como por exemplo *E. coli*. As principais endotoxinas são as lipoproteínas, os fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS), que são liberados quando as bactérias morrem ou sofrem lise celular (TORTORA, 2012).

A bactéria *E. coli*, apesar de ser gram-negativa, é um dos hospedeiros mais utilizados para expressão de proteínas recombinantes (BANEYX, 1999) devido ao amplo conhecimento sobre sua estrutura e metabolismo e à facilidade de manipulação genética (JEONG; KIM; LEE, 2015; PROMEGA, 2013). Ela possui capacidade de se multiplicar rapidamente e em altas concentrações celulares, mesmo em substratos de baixo custo, e além disso, a maioria dos vetores e cepas mutantes disponíveis no mercado atualmente

são confeccionados para a produção de proteínas recombinantes neste sistema (BANEYX, 1999).

Essa espécie é amplamente utilizada na indústria para expressão de produtos heterólogos. Em estudos recentes, dois grupos de pesquisa diferentes utilizaram a *E. coli* para expressão heteróloga de hormônios humanos como glucagon (XU et al., 2017) e hormônio de crescimento (BENNETT et al., 2017). Essa bactéria também foi utilizada na produção de bioetanol a partir de fontes renováveis como casca de arroz (TABATA et al., 2017) e na produção de biopolímeros (ALMEIDA et al., 2011).

Atualmente estão disponíveis comercialmente diferentes cepas de *E. coli* com alterações genéticas próprias para cada tipo de expressão (LARENTIS; ARGONDISO, 2011). A cepa *E. coli* BL21(DE3) (EINSFELDT, 2014), derivada de BL21, permite a indução pela adição de IPTG ou lactose, além de possuir deleções nos genes de duas importantes proteases para evitar a degradação da proteína recombinante (JEONG; KIM; LEE, 2015).

Na produção de biomoléculas a partir de *E. coli*, quando é necessário o uso de processos de ruptura celular para recuperação da molécula de interesse, ocorre a liberação de LPS (LOPES; ELBINUMA; MAZZOLA, 2012). Os produtos provenientes desse processo, como a proteína surfactante citada neste estudo, precisam passar por processos de purificação para serem utilizados em alimentos.

i. Lipopolissacarídeos (LPS)

Os lipopolissacarídeos são formados por três regiões estruturalmente distintas: lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico e a região externa ou O-antígeno (ALMEIDA et al., 2016; SUTHERLAND, 1985). O lipídeo-A é a porção lipofílica do LPS responsável por ancorar a estrutura à membrana externa da bactéria, além de ser a região mais conservada entre as classes de bactérias (POKORNI et al., 1973), e apresenta atividade citotóxica em células animais (WANG; QUINN, 2010).

Em condições de exposição a LPS, mesmo em concentrações muito baixas (<1,0 unidade endotóxicas (UE) por mL), ocorre uma resposta inflamatória sistêmica (ANSPACH, 2001; OGIKUBO et al., 2004). O termo UE descreve a atividade biológica

de uma endotoxina, como por exemplo, 120 pg de endotoxina proveniente de *E. coli* O111:B4 tem atividade de 1,0 UE (DANESHIAN et al., 2006). O LPS ativa as células B e induz macrófagos, células dendríticas e outras células a liberarem interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral, causando vários efeitos tais como: febre, vasodilatação, diarreia, coagulação sanguínea, deficiência de funções hepáticas e sistema endócrino, calafrios, podendo levar à morte (MELNICK; ADELBERG, 2014). Dessa forma, os LPS devem ser completamente removidos de amostras utilizadas para consumo humano, o que é feito por meio de processos de purificação ou inativação da endotoxina (TAKAGI, 2003).

O lípideo A tem um maior caráter apolar, embora possua grupos fosfatos. Já o core é a região mais carregada do LPS e possui não apenas açúcares fosforilados, mas também carboxilados. Desta maneira, a superfície da membrana de LPS é negativa e a interação com os cátions necessária para neutralizar a carga da membrana.

2.7 Métodos de purificação de proteínas

Uma preparação pura é essencial para a determinação das propriedades e atividades de uma proteína. Como as células contêm diferentes tipos de proteínas, alguns métodos clássicos para separação de proteínas se aproveitam das propriedades que variam de uma para a outra, incluindo tamanho, carga e ligações. Exemplos de métodos de purificação são coacervação (CAPITANI, 2005), ultrafiltração e precipitação fracionada por agentes precipitantes (CARREIRA, 2003), centrifugação, aquecimento e diálise (NELSON, D. L., COX, 2014) e métodos cromatográficos (ANKLESARIA et al., 2016). Dentre esses, destaca-se a purificação por aquecimento, precipitação fracionada utilizando o sal sulfato de amônio e as cromatografias, dentre elas, a cromatografia de afinidade.

2.7.1 Aquecimento

O aquecimento é um método simples, prático e de baixo custo que leva à lise bacteriana e pode, concomitantemente, promover a recuperação das proteínas de interesse em um alto grau de pureza. Quando submetidas a altas temperaturas, ocorre a precipitação

seletiva de proteínas contaminantes (NELSON; COX, 2014). A proteína surfactante PhaP de *Azotobacter* sp. FA08 possui alta estabilidade térmica, mesmo quando submetida a temperaturas de mais de 90°C (SALGADO, 2015). Dessa forma, as proteínas de interesse são recuperadas na fração solúvel e possuem a vantagem de se manterem estáveis por mais tempo em solução, uma vez que o processamento térmico elimina microrganismos contaminantes da solução e inativa enzimas proteolíticas, os quais poderiam ser responsáveis pela degradação da amostra durante o seu armazenamento (SALGADO, 2015).

2.7.2 Precipitação fracionada por sulfato de amônio

Etapas iniciais de fracionamento em uma purificação utilizam diferenças na solubilidade de proteínas, função complexa do pH, temperatura, concentração de sais e outros fatores (NELSON; COX, 2014). A solubilidade de proteínas é reduzida em presença de alguns sais, dessa forma, a proteína de interesse pode ser recuperada e purificada por meio da adição de sais à solução que a contém (CARREIRA, 2003). A quantidade de sal a ser adicionada para promover a precipitação varia de acordo com parâmetros como a temperatura da solução e o tipo de sal. A precipitação da proteína de interesse ocorre em um processo conhecido por “salting out” e o sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) é um dos sais mais utilizados para precipitar proteínas devido a sua alta solubilidade, baixo custo, baixa toxicidade e praticidade (PRESTES; ADAIME, 2011).

2.7.3 Purificação por cromatografia de afinidade

Os métodos mais eficazes para fracionar e obter soluções altamente puras de proteínas utilizam a cromatografia em coluna, que se baseia na utilização das diferenças na carga, estrutura ou afinidade de ligação (GOYON et al., 2017). Entretanto, métodos cromatográficos são trabalhosos, apresentam alto custo, e são muito sensíveis; usualmente são detectados problemas como obstrução no injetor, devido ao excesso de sal ou impurezas na amostra e sobrepressão na coluna, devido ao aumento do fluxo (GOYON et al., 2017).

A cromatografia de afinidade baseia-se na afinidade de ligação da matriz da coluna à molécula de interesse e, qualquer proteína com afinidade para esse ligante, se adere à coluna e sua migração através da matriz é retardada. A remoção da proteína de interesse aderida pode ser realizada com variação de pH do meio e adição de elevadas concentrações de competidores da ligação (ANKLESARIA et al., 2016). A proteína surfactante citada neste estudo possui uma cauda contendo seis resíduos do aminoácido histidina e pode ser purificadas por cromatografia de afinidade em coluna contendo íons de níquel (Ni^{2+}) imobilizados (SALGADO, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade da PhaP de *Azotobacter sp.* FA8 expressa em *Escherichia coli* recuperada por diferentes metodologias de purificação para viabilizar o uso desse biosurfactante na indústria de alimentos.

3.2 Objetivo específico

- Verificar rendimento/grau de pureza da PhaP nos processos de purificação para o uso em alimentos;
- Avaliar marcadores bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar alimentados com concentração sub- aguda da PhaP;
- Verificar se a ingestão da PhaP causa dano hepático, renal, intestinal e estomacal em ratos Wistar.

4. METODOLOGIA

A sequência que codifica a PhaP de *Azotobacter sp.* FA8 foi selecionada e otimizada visando o aumento da sua expressão em *E. coli* e diferentes protocolos de recuperação/purificação, anteriormente padronizados (SALGADO, 2015), foram

utilizados. Dessa forma, este trabalho consistiu de duas etapas: na primeira, a PhaP foi produzida e recuperada/purificada por três técnicas distintas: aquecimento, precipitação fracionada e cromatografia de afinidade (Figura 4). As frações de proteínas obtidas nos processos de purificação foram avaliadas quanto ao teor de proteína total através o método de absorção no ultra-violeta (DEUTSCHER, 1996; ZAIA; LICHTIG, 1998) e por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 15% (LAEMMLI, 1970), e em seguida, foram liofilizadas no Laboratório de Nutrição Animal, no Departamento de Zootecnia da Universidade de Viçosa (UFV). Na segunda etapa, o liofilizado proteico foi solubilizado em água (pH 8) na quantidade de 50 mg de proteína/kg de animal e utilizado para o teste de toxicidade *in vivo* em ratos Wistar.

4.1 Obtenção do liofilizado proteico contendo a PhaP

4.1.1 Produção/ Expressão da PhaP

A proteína PhaP foi expressa de forma heteróloga em *E. coli*, linhagem BL21-(DE3) -RIL Codonplus® (Stratagene - Canadá). A introdução dos plasmídeos ocorreu por transformação por meio de choque térmico. Para isso foram adicionados 2% de solução aquosa contendo 0,25 % (m/v) da solução de DNA plasmidial nas células competentes de *E. coli* BL21. A mistura foi incubada por 30 min no gelo, seguido por 1 min e 30 seg a 42 °C e novamente em gelo por 2 min.

As células transformantes foram selecionadas em meio LB líquido contendo 100 µM do antibiótico ampicilina (50 mg/L) e mantidas em Erlenmeyer sob agitação (180 rpm) por um período de 18 h a 37 °C. Após esse período, 20 mL do material foram utilizados para inocular 1000 mL de meio LB contendo 100 µM de ampicilina (50 mg/L) em um frasco com capacidade para 2000 mL.

O meio inoculado foi mantido sob agitação (180 rpm) a 37 °C por um período de aproximadamente 3 h, até que fosse atingida a Densidade Ótica, a 600 nm (DO₆₀₀), de 0,8. Para a indução da expressão da proteína, foi utilizado o indutor isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) suficiente para a concentração final de 0,25 mM, com posterior incubação durante 16 h a 37 °C. As células foram coletadas por centrifugação a

8.000 x g por 5 min e o precipitado foi coletado, ressuspendido em 4 mL de tampão fosfato (10 mM de tampão fosfato pH 7,8 e 50 mM NaCl)/ 100 mL de indução e a proteína foi recuperada/purificada por i) aquecimento; ii) lise por sonicação e precipitação fracionada; ou iii) lise por sonicação e cromatografia de afinidade (Figura 4).

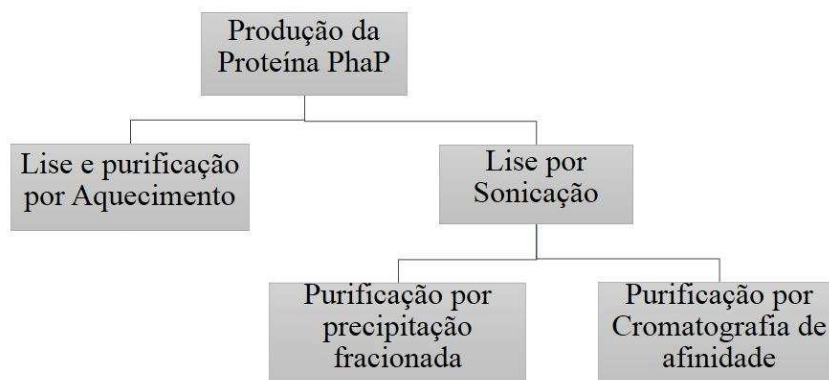


Figura 4. Métodos de lise celular e purificações utilizadas para obtenção da proteína PhaP.

4.1.2 Recuperação e purificação da proteína PhaP

(i) Lise e purificação por aquecimento

As células ressuspendidas foram aquecidas a 70 °C por 30 min e centrifugadas por 20 min a 8.000 x g para separação das frações solúvel e insolúvel (corpo de inclusão). A maior parte da proteína de interesse permaneceu na fração solúvel, a qual foi liofilizada e utilizada para o teste de toxicidade.

(ii) Lise por sonicação e purificação por precipitação fracionada

As células ressuspendidas em tampão de lise foram rompidas para liberação da proteína de interesse. A lise celular ocorreu por sonicação (Misonix S-4000 - QSONICA) por 2 min a uma potência de 200 W. Em seguida, a solução foi centrifugada por 30 min a 8.000 x g para separar as frações solúvel e insolúvel (corpo de inclusão). A maior parte da proteína permaneceu na fração solúvel, a qual foi utilizada para purificação por precipitação fracionada utilizando o sal sulfato de amônio (S.A).

A precipitação utilizando o SA foi realizada com a adição de 40% de saturação desse sal. A amostra foi mantida por 20 min no gelo e centrifugada a 8.000 x g por 10

min. O precipitado foi recuperado, ressuspendido no mesmo tampão de lise e dialisado por 24 h contra a água (pH 7,8). A solução resultante foi liofilizada e utilizada no teste de toxicidade.

(iii) Lise por sonicação e purificação por cromatografia de afinidade

As células foram rompidas para liberação da proteína de interesse por sonicação, como descrito anteriormente.

A PhaP recombinante foi purificada a partir da fração solúvel por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HisTrap FF crude 5 mL (GE, Suécia) utilizando o cromatógrafo ÄKTA purifier 10 (GE, Suécia). Em 120 mL do sobrenadante contendo a proteína adicionou-se Imidazol até a concentração de 10 mM a fim de diminuir a interação de proteínas contaminantes com a resina de Ni^{2+} . Em seguida, o sobrenadante foi injetado na coluna e o volume não ligado foi mantido a um fluxo de 3,5 mL/min, mantendo a pressão do sistema abaixo de 0,25 MPa.

Após a passagem de todo o volume não ligado, foi injetado na coluna, a um fluxo de 4,5 mL/min, um volume de tampão A (fosfato 10 mM pH 7,8; 50 mM de NaCl e 10 mM de imidazol) até que não se observasse mais alteração na medida da absorbância a 280 nm. A eluição da proteína de interesse ocorreu com tampão B (fosfato 10 mM pH 7,8; 50 mM de NaCl e 250 mM de imidazol). A fração contendo a proteína purificada foi dialisada contra água por 24 h, liofilizada e utilizada no teste de toxicidade.

4.2 Avaliação da toxidade da proteína PhaP

A pesquisa recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), processo número 87/2016 (ANEXO 1). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 24 ratas da linhagem Wistar, com aproximadamente 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. O delineamento experimental foi baseado no “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia”, seção de estudos de toxicidade de doses repetidas da ANVISA (ANVISA, 2013), com algumas modificações. Os animais permaneceram durante toda a fase experimental no biotério do Departamento de Biologia Geral da UFV, em um ambiente com a temperatura média e o ciclo claro-escuro controlados. Receberam água e ração “ad libitum” sob livre demanda. A água e alimentação eram repostos em dias alternados, assim como a limpeza das gaiolas.

A administração da proteína para os animais foi realizada pelo método da gavagem; para isso, os animais eram suspensos/contidos pela base da cauda e, após realizada a gavagem, eram prontamente colocados em uma superfície de apoio para evitar o desconforto dos mesmos. Os animais permaneceram alojados em gaiolas (dimensão: 18 cm x 34 cm x 41 cm), separados de acordo com os tratamentos (Quadro 1).

Quadro 1. Grupos experimentais na administração repetida de uma mesma dose de PhaP

Grupo (n=6)	Conteúdo administrado do liofilizado proteico	Processo de recuperação da proteína
Controle (CTR)	Água (2 mL/ kg de animal)	-
S.A	50 mg de proteína/kg de animal	Sulfato de amônio
C.A	50 mg de proteína/kg de animal	Cromatografia de afinidade
AQ	50 mg de proteína/kg de animal	Aquecimento

Anteriormente ao início da administração da proteína aos animais, foi realizada a sua adaptação por cinco dias (Figura 5). O experimento foi realizado durante 14 dias, com administrações diárias de 50 mg de proteína/kg de animal, sendo respeitado o limite do volume gástrico de 2 mL/kg de animal, levando à ingestão diária de aproximadamente 15

mg de proteína/0,6 mL de água. Durante este período, a ocorrência de alterações comportamentais ou metabólicas (Quadro 2) foi documentada conforme a codificação: diarreia (X), diarreia e prostração (XX) ou diarreia, prostração e pelos eriçados (XXX). Os animais foram pesados a cada dois dias durante todo o experimento. No 20º dia foi realizada a eutanásia de todos os animais utilizando a quetamina (10% m/v) e xilazina (2% m/v) associadas, seguido da exanguinação pela retirada total do sangue por punção cardíaca.

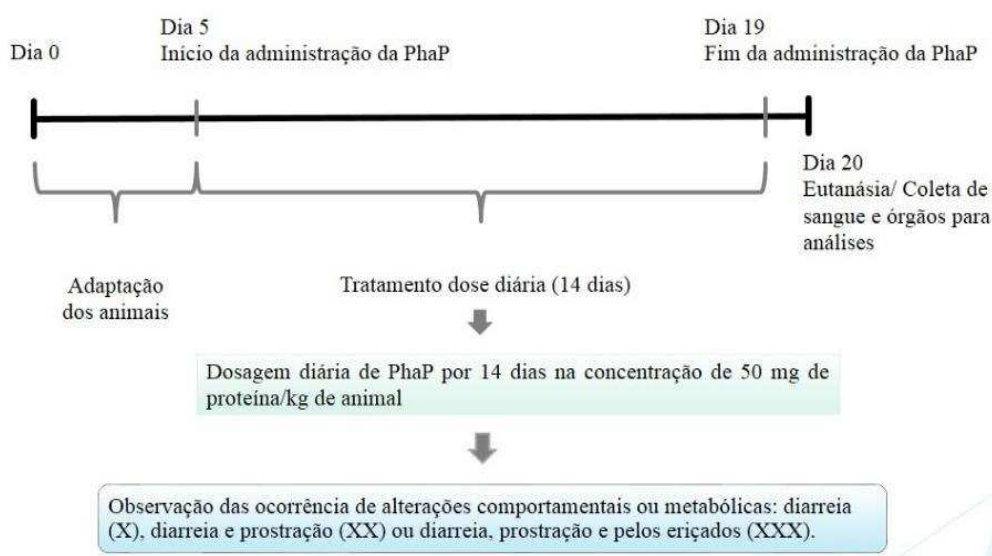


Figura 5. Esquema demonstrando os passos do experimento para avaliação de toxicidade da PhaP em ratos Wistar

O sangue coletado ao final da administração da PhaP foi utilizado para análises hematológicas e bioquímicas. O intestino, rim, estômago e fígado de cada animal foram utilizados para análises histológicas.

4.2.2 Análise sanguínea: hemograma e bioquímica

A coleta do sangue foi realizada ao final do experimento por punção cardíaca, utilizando-se agulhas, seringas e tubos de ensaio. O sangue foi acondicionado em tubos com anticoagulante HB (Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os valores para eritrócitos (RBC), leucócitos (WBC), hemoglobina (HGB) e hematócrito (HCT) foram determinados imediatamente após a coleta por meio de um

analisador automático de células hematológicas Human Count (Human do Brasil LTDA[®]), no Núcleo de Biofármacos da UFV.

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 1.183 x g durante 10 min. Os teores de uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina, colesterol total e frações e triglicerídeos foram quantificados utilizando HumaStar 300 (Human do Brasil LTDA[®]) com sistemas comerciais da Labtest[®].

Os resultados das análises foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (Anexo 2). Foram submetidos à análise de variância one-way (ANOVA) seguidos do pós-teste (Tukey) para múltiplas comparações. A significância estatística foi considerada com $p < 0.05$. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

4.2.3 Análise histológica qualitativa

As lâminas de rins e intestino coletados foram preparadas pelo Laboratório de Histologia da Faculdade Univiçosa. Os órgãos foram fixados em solução a 10% (v/v) de formol por 24 h para paralisar o metabolismo celular e preservar as estruturas do tecido. Após esse período, o material foi submetido às técnicas histológicas, desde a desidratação na série crescente de álcoois 70, 80, 90 e 100% (v/v), até a inclusão em parafina histológica purificada (ponto de fusão entre 56 e 60 °C).

Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação manual (Americal Optical Company[®]), com espessura de 5 μ m e os cortes teciduais corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE) (FILHO, 1981).

A leitura histológica das lâminas foi realizada no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Medicina e Enfermagem/UFV, em microscópio de luz BX 41 (Olympus, Tóquio, Japão[®]), utilizando objetiva de 10X e 40X (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Foi documentada, quando observada, a presença de infiltrado inflamatório, vacuolização, fibrose, degeneração ou retração e necrose.

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção da proteína PhaP

A expressão da proteína gerou rendimentos de aproximadamente 74 mg de proteína/L de meio induzido. Após as purificações por precipitação fracionada, cromatografia de afinidade e aquecimento, as concentrações finais, obtidas por meio da aferição da massa do liofilizado proteico, foram de 19,4; 7,2 e 59,9 mg de proteína/mL, respectivamente. A pureza da proteína foi avaliada pelo perfil de proteínas observado no gel de SDS-PAGE, no qual foi aplicado um volume de 5 μ L das amostras obtidas pelas três metodologias de purificação (Figura 6). A proteína estava diluída em água na concentração utilizada no teste de toxicidade *in vivo* (50 mg de proteína/kg de animal).

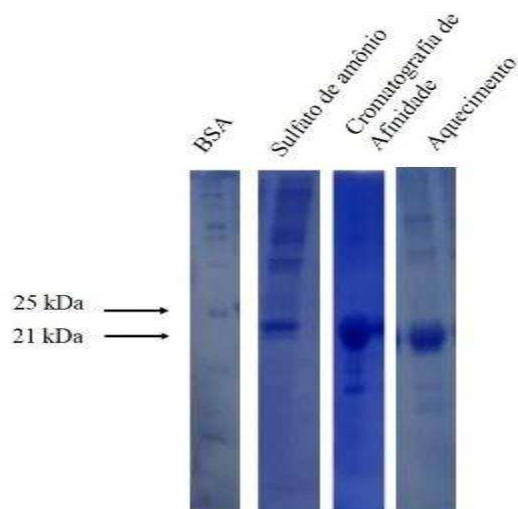


Figura 6. Gel de eletroforese desnaturante das frações contendo a proteína PhaP (21,7 kDa) obtidas pelos diferentes processos de purificação.

O precipitado obtido a partir do S.A continha um grande número de proteínas contaminantes, mais concentrados que no aquecimento e a banda relativa à PhaP teve, portanto, menor concentração relativa frente às bandas observadas nas demais metodologias. A cromatografia de afinidade, além de apresentar a maior banda de expressão da proteína, foi eficiente em recuperá-la com grande pureza, sendo que praticamente toda massa do recuperado proteico era composta pela PhaP. O perfil das proteínas recuperadas por aquecimento, embora tenha apresentado a banda de expressão da PhaP bem evidente, também apresentou bandas de proteínas contaminantes, indicando que grande quantidade de massa de liofilizado recuperada por essa metodologia era composto também por outras proteínas.

5.2 Teste toxicológico

Todos os animais que receberam diariamente a proteína PhaP sobreviveram aos 14 dias de administração desse biossurfactante em doses subagudas. Entretanto, a partir do 4º dia de tratamento alguns animais dos três grupos tratados apresentaram diarreia e, ao longo do tratamento, esses sinais se intensificaram, tornando-se constantes nos animais dos grupo S.A e AQ; apenas um animal do grupo AQ apresentou prostração e pelos eriçados, sintomas iniciados a partir do 7º dia de administração da PhaP (Quadro 2).

Quadro 2. Ocorrência de alterações comportamentais ou metabólicas: diarreia (X), diarreia e prostração (XX) ou diarreia, prostração e pelos eriçados (XXX)

		Anamnese													
GRUPO	ANIMAL	10/mar	11/mar	12/mar	13/mar	14/mar	15/mar	16/mar	17/mar	18/mar	19/mar	20/mar	21/mar	22/mar	23/mar
CTR	1														
	2														
	3													X	X
	4														
	5														
	6														
SA	1									X	X				
	2								X				X	X	
	3	X							X		X		X	X	X
	4										X				
	5									X			X		
	6											X		X	X
CA	1											X	X	X	X
	2														
	3														
	4										X				
	5									X			X	X	X
	6												X	X	X
AQ	1							XX	X	XX	XX	XX	XXX	XXX	XXX
	2	X				X							X		
	3		X			X	X	XX			X	X	X	X	
	4										X	X	X		
	5										X	X	X	X	X
	6			X						X			X		

A média da diferença entre o peso final (P_f) e peso inicial (P_i) dos animais dos tratamentos AQ e C.A foi significativamente menor que o grupo CTR (Figura 7).

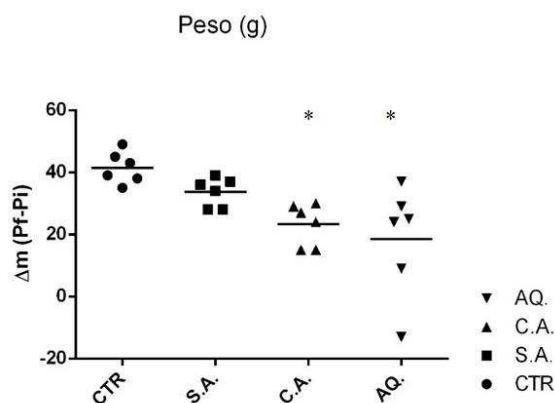


Figura 7. Média da diferença entre os pesos final e inicial dos animais alimentados com o biossurfactante PhaP. $\Delta_m (P_f - P_i)$ representa média da diferença entre os valores finais e iniciais dos pesos de cada animal usado no experimento. O (*) nos grupos C.A e AQ indica diferença em relação ao grupo CTR (ANOVA seguida de Teste de Tukey). CTR = grupo controle; AQ = aquecimento; S.A = Sulfato de amônio; C.A = cromatografia de afinidade.

5.2.1 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Tanto a série branca quanto a série vermelha se mantiveram inalteradas em relação à quantidade e morfologia nos diferentes tratamentos (Quadro 3 e Anexo 2). Também não foi observada diferença nos níveis de creatinina, ureia e no perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, HDL, VLDL e LDL) dos animais (Quadro 4 e Anexo 2).

Quadro 3. Hemograma completo dos animais alimentados com a proteína PhaP durante 14 dias.

Parâmetro	CTR	S.A.	C.A.	AQ.
WBC	9,4 ± 2,6	8,1 ± 5,2	12,0 ± 3,3	10,8 ± 2,5
LYM	7,2 ± 1,8	6,2 ± 4,3	9,2 ± 2,7	8,4 ± 1,9
MID	0,5 ± 0,6	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2
GRA	1,8 ± 0,3	1,5 ± 1,0	2,4 ± 0,7	2,1 ± 0,7
RBC	8,1 ± 0,6	7,0 ± 3,0	9,1 ± 0,4	9,0 ± 0,4
HGB	15,8 ± 0,6	12,9 ± 0,6	16,6 ± 0,5	16,4 ± 0,8
HCT	48,4 ± 3,4	41,0 ± 17,6	53,0 ± 2,2	53,1 ± 2,4
MCV	60,2 ± 2,2	58,5 ± 2,6	58,3 ± 1,8	59,3 ± 2,7
MCH	19,6 ± 1,0	18,0 ± 1,7	18,3 ± 0,5	18,2 ± 1,0
MCHC	32,6 ± 1,6	30,7 ± 2,8	31,3 ± 0,5	32,9 ± 0,5
RDW	16,3 ± 0,7	15,4 ± 0,3	15,6 ± 0,8	16,0 ± 0,8

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros do hemograma (ANOVA seguida de Teste de Tukey). CTR = grupo controle; AQ = aquecimento; S.A = Sulfato de amônio; C.A = cromatografia de afinidade.

Quadro 4. Parâmetros bioquímicos analisados no soro dos animais alimentados com PhaP durante 14 dias.

Parâmetro	CTR	S.A.	C.A.	AQ.
Creatinina	0,1 ± 0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Uréia	49,5 ± 14,6	40,8 ± 5,1	42,9 ± 16,6	39,5 ± 4
Colesterol	104,6 ± 7,8	102,6 ± 7,10	101,8 ± 16,8	102,3 ± 5,10
Triglicérides	97,5 ± 4,7	96,3 ± 14,3	90,8 ± 20,0	99,2 ± 17,6
HDL	54,5 ± 4,1	60,5 ± 9,4	55,5 ± 6,4	49,7 ± 11,4
LDL	30,3 ± 8,7	23,4 ± 14,3	27,6 ± 20,8	33,1 ± 13,0
VLDL	19,8 ± 3,6	18,7 ± 4,1	18,0 ± 2,9	19,5 ± 0,10

CTR = grupo controle; AQ = aquecimento; S.A = Sulfato de amônio; C.A = cromatografia de afinidade; AST = aspartato aminotransferase, ALT= alanina aminotransferase, HDL = high density lipoprotein, VLDL = very low density lipoprotein, LDL = low density lipoprotein. Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (ANOVA seguida de Teste de Tukey) ao nível de $p < 0.05$.

Todos os tratamentos apresentaram quantidade semelhante de albumina em relação ao grupo CTR, embora tenha ocorrido aumento significativo nos valores do grupo C.A em relação ao grupo S.A. (Figura 8). Os animais do grupo AQ apresentaram níveis elevados da enzima ALT em relação aos grupos C.A e S.A (Figura 9) e da enzima AST em relação aos grupos C.A, S.A e CTR (Figura 10).

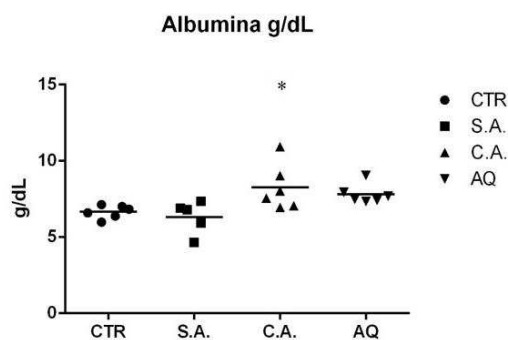


Figura 8. Valores da albumina durante o tratamento com a proteína por 14 dias. O (*) no grupo C.A indica aumento em relação ao grupo S.A (ANOVA seguida de Teste de Tukey). CTR = grupo controle; AQ = aquecimento; S.A = Sulfato de amônio; C.A = cromatografia

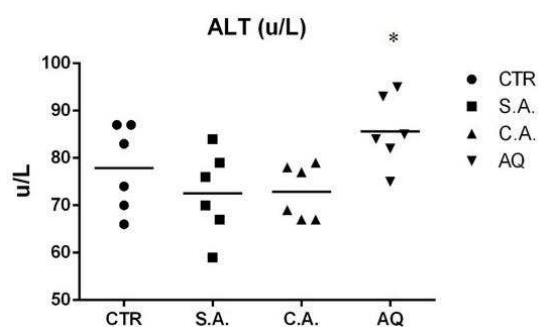


Figura 9. Valores da ALT durante o tratamento com a proteína por 14 dias. O (*) no grupo AQ indica aumento em relação aos grupos C.A e S.A (ANOVA seguida de Teste de Tukey). CTR = grupo controle; AQ = aquecimento; S.A= Sulfato de amônio; C.A = cromatografia

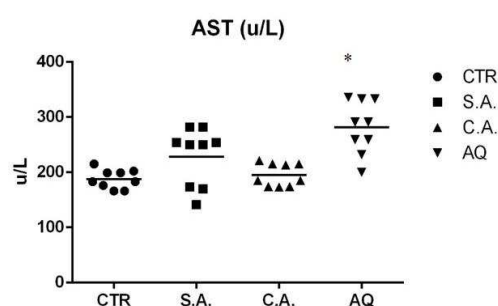


Figura 10. Valores da AST durante o tratamento de 14 dias. O (*) no grupo AQ indica aumento em relação aos grupos CTR, C.A e S.A (ANOVA seguida de Teste de Tukey). CTR = grupo controle; AQ = aquecimento; S.A = Sulfato de amônio; C.A = cromatografia

5.2.2 Análise histológica qualitativa

A análise qualitativa das lâminas foi feita pela descrição de possíveis alterações na homogeneidade dos tecidos, corados com hematoxilina e eosina, observando alterações nas estruturas e coloração das células, assim como presença de infiltrados leucocitários ou pontos de necrose (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Não foram observadas diferenças estatísticas, em relação ao grupo controle, na morfologia dos órgãos dos animais alimentados com a proteína durante os 14 dias (Figura 11).

O fígado apresentou estruturas como a veia central (VC), os espaços-porta (EP), contendo ramo da veia porta, artéria hepática e ductos biliares e os hepatócitos com características normais em todos os animais de cada grupo. Nos rins foram observadas as

regiões medular (ME) e cortical (CO), com destaque para os glomérulos e, todas as estruturas apresentaram aparência homogênea. No intestino delgado foi observado as vilosidades, glândulas intestinais e camada muscular e, todas as estruturas apresentaram características normais. No estômago foram observadas as células mucosas de revestimento e as glândulas, todas com aparência normal.

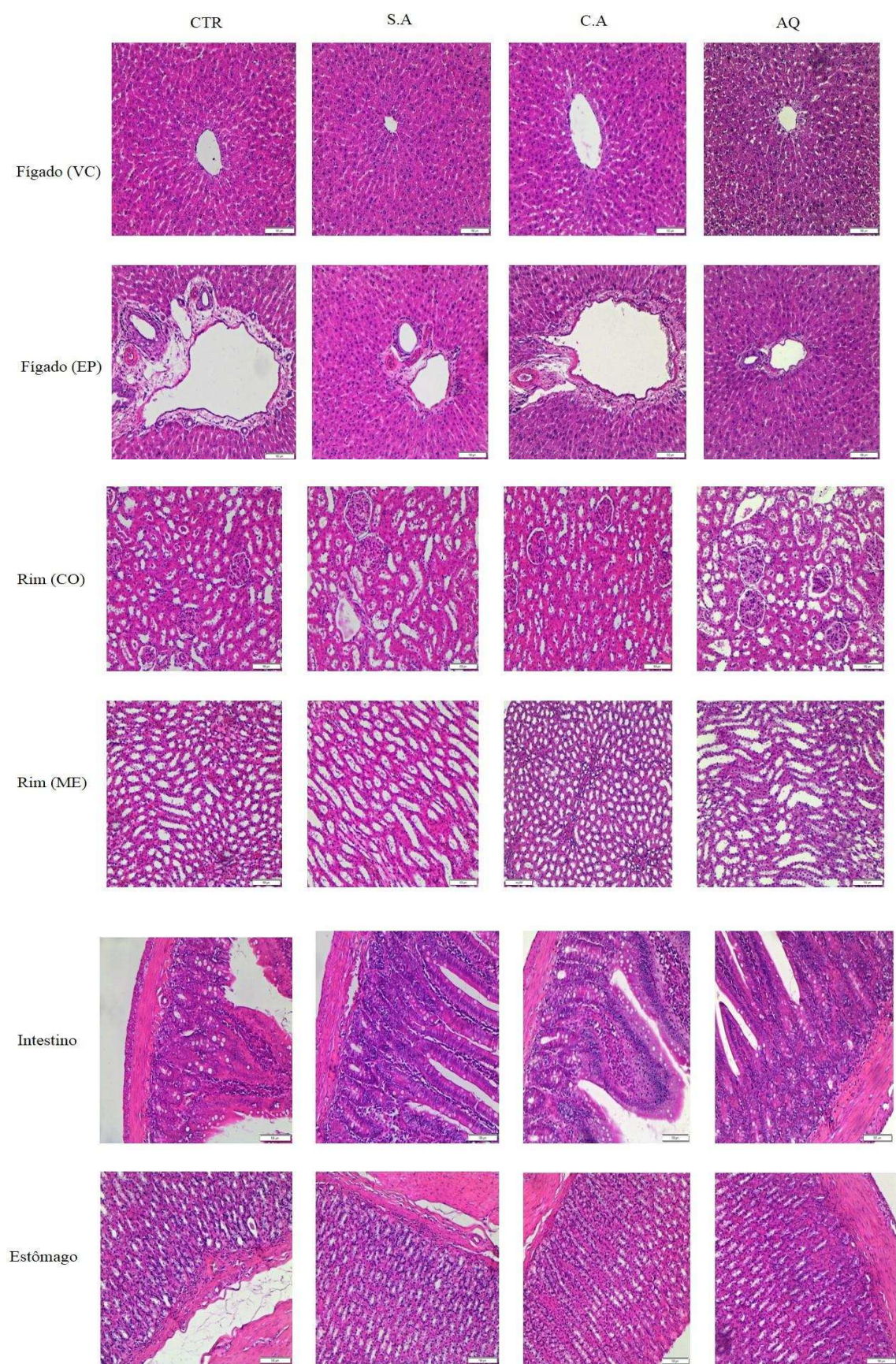


Figura 11. Fotomicrografia representativa do fígado, rim, intestino e estômago de cada grupo do tratamento com a PhaP. As regiões fotografadas estão descritas no texto.

6. DISCUSSÃO

O uso de biossurfactantes na indústria, apesar do vasto campo de aplicações, ainda é limitado pois a produção e recuperação é muitas vezes onerosa, o que inviabiliza o seu uso comercial (SALGADO, 2015). A purificação da proteína PhaP por aquecimento consiste numa metodologia de baixo custo para obtenção desse surfactante, o que poderia viabilizar seu uso mesmo para produtos de baixo valor agregado. Essa metodologia levou ao maior rendimento de recuperação dessa proteína, embora não tenha levado a um alto grau de pureza quando comparada a purificação por cromatografia de afinidade. A purificação da proteína PhaP por cromatografia, apesar de consistir em uma metodologia de alto custo quando comparado às outras metodologias testadas neste trabalho, foi o que levou ao maior grau de pureza em relação a outros contaminantes proteicos originalmente presentes.

A purificação da PhaP por precipitação fracionada gerou uma fração com o menor grau de pureza em relação às outras duas metodologias. Esse fato pode ser reflexo da alta estabilidade térmica e capacidade de solubilização dessa proteína, além da presença da cauda de histidina, que favorecem a purificação da PhaP por aquecimento e cromatografia de afinidade, respectivamente (SALGADO, 2015). O grau de pureza necessário para a proteína dependerá da sua aplicação, assim como deverão ser verificadas as quantidades de LPS nas frações.

A microbiota intestinal desempenha um papel central no desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias crônicas (CHASSAING et al., 2017) e a administração de substâncias que alteram a composição dessa microbiota pode levar ao desenvolvimento de sintomas como diarreia, prostração e pelos eriçados, característicos de animais com inflamação intestinal (CHASSAING et al., 2015). Quadros de inflamação intestinal podem estar associados ao consumo de fármacos (FINER et al., 2000; HALPERN et al., 2000), lipopolissacarídeo (DANESHIAN et al., 2006) e emulsificantes (CASTRO et al., 2012; CHASSAING et al., 2015).

Um modelo característico de quadros inflamação intestinal é a indução da colite pelo uso do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS). Estudos realizados por Renes et al., 2002, com o SDS, permitiram compreender o processo da doença em diferentes regiões do cólon, além das alterações clínicas e histopatológicas. Neste estudo foi

constatado que o uso consecutivo de SDS por 7 dias é capaz de provocar alterações histológicas intestinais como ulcerações, perda de células do cálice e da cripta (RENES et al., 2002).

O fármaco Orlistate, aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA e pelo Food and Drug Administration - FDA, é um inibidor de lipases gastrointestinais e pancreáticas com ação laxante. Ele é o medicamento deste tipo mais utilizado no tratamento de obesidade e o seu mecanismo de ação se restringe ao trato gastrointestinal, não possuindo efeito direto sobre a absorção do colesterol ou sobre sua biossíntese (HALPERN et al., 2000). Lopes, 2012 demonstrou que o fármaco Orlistate pode alterar o perfil de ácidos graxos do organismo humano, além de reduzir significativamente o teor de colesterol presente na membrana dos eritrócitos e que, em longo prazo, pode levar a uma síndrome caracterizada por esta deficiência (LOPES, 2012).

Foram realizados por Chassaing et al., 2015 estudos avaliando as possíveis alterações na microbiota intestinal decorrentes do consumo de emulsificantes sintéticos adicionados a alimentos processados para melhorar sua textura e prolongar sua vida útil. Foi observado que a administração de concentrações relativamente baixas de carboximetilcelulose (CMC) e polisorbato 80 (P80), em camundongos, por 12 semanas, promoveu colite robusta no animais predispostos a este transtorno (CHASSAING et al., 2015). Em 2017, pelo mesmo grupo de pesquisa, foi observado que a administração de CMC e P80, por 11 semanas, em ratos, resultaram em alterações na composição da microbiota, incluindo um aumento de bactérias produtoras de flagelina pró-inflamatória e lipopolissacarídeo (LPS), além de desenvolvimento de inflamação crônica (CHASSAING et al., 2017).

Sugere-se em nosso estudo que o desenvolvimento das manifestações clínicas observadas nos animais a partir do 4º dia de administrações do liofilizado proteico, que levou também ao menor ganho de peso dos animais dos grupos AQ e C.A, provavelmente foi decorrente da característica surfactante da proteína, como observado em outros estudos já relatados, associado a uma possível manutenção das moléculas de LPS nessas frações, os quais podem ativar a expressão de genes inflamatórios pelo sistema imune (ZAVARIZ, 2006). A eliminação de LPS pelo método de aquecimento é dificultada pois as endotoxinas são estáveis à temperatura e não são destruídas em processos de

esterilização, sendo necessária uma temperatura de 250 °C por mais que 30 min ou 180 °C por mais de 3 h para sua inativação (ALMEIDA, 2016). A presença de íons de níquel (Ni^{2+}) imobilizados na matriz da coluna cromatográfica utilizada também pode ter sido determinante para a manutenção de moléculas de LPS nas frações eluídas, uma vez que a molécula de LPS possui afinidade a cátions bivalentes, como descritos por Junior, 2013, sendo dessa forma retido na coluna juntamente com a PhaP (CLIFTON et al., 2015; JUNIOR et al., 2013).

O sistema hemopoiético, renal e hepático são importantes alvos de substâncias químicas tóxicas e são muito sensíveis às condições patológicas tanto em humanos quanto em animais (RAMASWAMY et al., 2012). Alterações na quantidade ou morfologia da série vermelha pode ser associada a quadros de anemias e hemólises (EDLA et al., 2016) e, nos quadros prolongados de sepse, a produção e a sobrevivência dos eritrócitos estão diminuídas (ZAVARIZ, 2006). Alterações na série branca podem estar associadas a quadros de infecções e alergias (EDLA et al., 2016) e, nos quadros de sepse, geralmente encontra-se quadros de leucocitose (ZAVARIZ, 2006). O sistema renal exerce papel fundamental na regulação dos líquidos e eletrólitos e na eliminação dos resíduos metabólicos, tornando-se essenciais à homeostase corpórea (MOTTA, 2009), sendo que a ureia e a creatina são consideradas marcadores no prognóstico da disfunção e insuficiência renal para quaisquer compostos tóxicos (DABLA, 2010). O fígado é o principal órgão de síntese de compostos como carboidratos e proteínas, por exemplo, a síntese das lipoproteínas plasmáticas VLDL e HDL; das proteínas plasmáticas como albumina e a pré-albumina; além de também ocorrer nesse órgão, a conversão da acetil-CoA em ácidos graxos, triglicerídios e colesterol (MOTTA, 2009).

Foi descrito por Castro e colaboradores, 2012 que o surfactante tyloxapol, um detergente não-iônico com a capacidade de inibir a lipase lipoproteica, induzir o aumento do colesterol e de triacilglicerídeos séricos, tem sido amplamente utilizado para induzir a hiperlipidemia aguda em diversos animais (CASTRO et al., 2012). Em nosso estudo, os parâmetros hematológicos do sangue dos ratos não foram alterados com a administração das diferentes frações de PhaP, indicando que tanto a dosagem do biosurfactante quanto a quantidade de LPS nas soluções utilizadas não foram capazes de afetar as células do sangue e a sua produção, assim como não foram capazes de gerar um quadro de sepse (ZAVARIZ, 2006), apesar de ter gerado os sintomas de diarreia. Da mesma forma, a concentração de ureia, creatinina e o perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, HDL,

VLDL e LDL) dos animais se mantiveram inalterados após administração de repetidas doses subagudas dessa proteína. Em conjunto, esses dados confirmam não haver danos renais e hepáticos, assim como alterações metabólicas na síntese desses compostos associados à administração dessa proteína em ratos.

A albumina é a mais abundante proteína plasmática, totalizando 50% das proteínas do soro humano. Devido ao seu peso molecular relativamente baixo e sua alta concentração, uma das mais importantes funções da albumina é a manutenção do volume plasmático circulante, além de desempenhar também papel na manutenção do equilíbrio ácido-básico e no transporte de uma variedade de substâncias fisiológicas (PAIVA; DAVID; DOMONT, 2010). A diminuição da concentração de albumina está relacionada a quadros de danos hepáticos causados normalmente por ingestão de drogas e quadros de sepse (PAIVA; DAVID; DOMONT, 2010). O aumento nas concentrações séricas dessa proteína são pouco frequentes e ocorrem em casos de desidratação aguda, associada ao aumento nos valores da hemoglobina e do hematócrito, à medida em que a fase líquida do plasma sofre retração (RAMALHO et al., 2014). O aumento nas concentrações de albumina nos animais do grupo C.A em relação ao grupo S.A poderia portanto estar associado a um possível quadro de desidratação (RAMALHO et al., 2014) decorrente da diarreia apresentada pelos animais desse grupo, embora não explique os resultados obtidos para os animais do grupo S.A e AQ, os quais mesmo tendo apresentado quadros de diarreia, não tiveram os níveis de albumina alterados em relação ao grupo CTR.

As transaminases (aminotransferases) correspondem a um importante grupo de enzimas que catalisam a transferência de um grupo amino de um aminoácido para um cetoácido. Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são as transaminases mais importantes no diagnóstico clínico de diversas alterações metabólicas, como descrito por Marshall, 2016. A ALT é encontrada no plasma e em vários tecidos corpóreos, mas a alteração em sua concentração é geralmente associada a distúrbios do fígado. A AST é encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias de muitas células, entre elas, células de fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e hemácias (MARSHALL, 2016). No fígado, essas enzimas desempenham um importante papel no metabolismo de aminoácidos, são as principais indicadoras da função hepática e biomarcadores para prever a toxicidade de substâncias/drogas tóxicas (MONDAL; YEASMIN, 2016). Em nosso estudo, é improvável que o aumento na concentração dessas enzimas nos animais do grupo AQ seja devido ao consumo do surfactante PhaP,

uma vez que os animais dos tratamentos C.A e S.A não apresentaram alterações. O aumento na concentração dessas enzimas nos animais do grupo AQ pode indicar a ocorrência de danos nas células do parênquima hepático causados pelo LPS presente nessas frações (ADELBERG, 2014; PATTARAYAN; BANUMATHY, 2016). Entretanto, as observações histológicas qualitativas, com foco na extensão de infiltrados e depleção de leucócitos, (RODEWOHL et al., 2017) não evidenciaram infiltrados inflamatórios assim como danos histológicos no fígado, rins, intestino e estômago desses animais.

Mondal e colaboradores, 2016 realizaram um estudo utilizando o surfactante CMC por um período de 3 meses, com doses diárias variando de 5 a 20 mg de CMC/ g de peso corporal os animais/ dia e não observaram nenhuma alteração nos parâmetros hematológicos e bioquímicos relacionada ao tratamento, além de nenhuma alteração histopatológica do fígado, coração, pulmão e rim. Esses dados indicaram que o CMC não teve efeito tóxico em diferentes doses na estrutura celular (MONDAL; YEASMIN, 2016) e suportam a conclusão de segurança no uso da PhaP como aditivo alimentar.

Os dados hematológicos, de bioquímica clínica e a histologia apresentam importante papel na determinação de toxicidade induzida por drogas (RAMASWAMY et al., 2012). Em conjunto, a associação desses resultados clínicos evidenciam que é improvável que as alterações clínicas pontuais observadas no animais, especialmente nos tratamentos AQ e C.A., sejam devidos a uma possível toxicidade da PhaP, uma vez que, apesar dos quadros de diarreia, os animais do tratamento S.A não apresentaram alterações em nenhum dos parâmetros avaliados, seja hematológico, bioquímico ou histológico, quando comparados aos animais do grupo CTR, o que indica que tanto a PhaP como os contaminantes proteicos presentes no liofilizado não são tóxicos aos animais.

7. CONCLUSÃO

O potencial uso da proteína PhaP em alimentos foi comprovado pelo fato de a administração da proteína em si não ter causado alterações toxicológicas nos ratos, mesmo em concentrações muito superiores ao que seria consumido, embora seja necessário a realização de estudos de toxicidade crônica para possível regulamentação pela ANVISA. A proteína PhaP é um biossurfactante com características que a tornam

um excelente alvo para uso em indústrias pois pode ser produzida em sistemas escalonados, apresenta metodologias de baixo custo de obtenção e recuperação como o aquecimento e a precipitação, além de apresentar alta resistência a uma ampla faixa de condições de armazenamento e processamento e, a proteína pode ser obtida e purificada por qualquer uma das metodologias pré-determinadas, ou associações, dependendo do grau de pureza necessário para a sua utilização.

8. REFERÊNCIAS

ADELBERG, J. M. **Microbiologia Médica**.

ALMEIDA, DE A. et al. Unexpected stress-Reducing effect of PhaP, a poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated protein, in Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6622–6629, 2011.

ALMEIDA, K. M. DE. Membrane adsorber for endotoxin removal. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 172–177, 2016.

ANKLESARIA, J. H. et al. Purification and characterization of CRISP-3 from human seminal plasma and its real-time binding kinetics with PSP94. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1039, p. 59–65, 2016.

ANSPACH, F. B. Endotoxin removal by affinity sorbents. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1–3, p. 665–681, 2001.

ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**.

ATWOOD, D. Surfactant Systems Their chemistry, pharmacy and biology. p. 471–479.

AZZAM, M. O. J.; AL-MALAH, K. I.; OMARI, R. M. Jojoba Oil/Water Emulsions Stabilized by BSA and Egg Proteins: A Study Using Conductivity Technique. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 33, p. 1000–1005, 2012.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411–421, 1999.

BECHER, P. **Emulsions, Theory and Practice**.

BENNETT, B. et al. Designing Signal Peptides for Efficient Periplasmic Expression of Human Growth Hormone in Escherichia coli. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 1–27, 2017.

BOUYER, E. et al. Proteins , polysaccharides , and their complexes used as stabilizers for emulsions : Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 359–378, 2012.

BURGOS-MÁRMOL, J. J.; SOLANS, C.; PATTI, A. Effective short-range Coulomb correction to model the aggregation behavior of ionic surfactants. **The Journal of chemical physics**, v. 234904, 2016.

CAI, S. et al. Identification of the Haloarchaeal Phasin (PhaP) That Functions in Polyhydroxyalkanoate Accumulation and Granule Formation in Haloferax mediterranei. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1946–1952, 2012.

CAPITANI, C. D. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesq. agropec. bras**, v. 40, n. 11, p. 123–1128, 2005.

CARREIRA, R. L. Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (tca) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. **Ciênc. agrotec**, v. 27, n. 2, p. 414–421, 2003.

CASTRO, K. F.; ARTONI, S. M. B.; PACHECO, M. R. Perfil lipídico sérico de ratos tratados com surfactante. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, v. 49, n. 3, p. 193–201, 2012.

CENTENO-LEIJA, S. et al. Improving poly-3-hydroxybutyrate production in Escherichia coli by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 4, p. 687–96, abr. 2014.

CHASSAING, B. et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 519, n. 7541, p. 92–96, 2015.

CHASSAING, B. et al. Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression ex vivo potentiating intestinal inflammation. **Gut**, v. 66, n. 8, p. 1414–1427, 2017.

CLIFTON, L. A. et al. Effect of Divalent Cation Removal on the Structure of Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Models. **Langmuir**, v. 31, p. 404–412, 2015.

CRUZ-MACHADO, S. D. S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da

transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2010.

DABLA, P. K. Renal function in diabetic nephropathy. **World Journal of Diabetes**, v. 1, n. 2, p. 48, 2010.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**.

DAMODARAN, S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. **Food Science**, v. 70, p. 54–66, 2005.

DANESHIAN, M. et al. In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs. **Journal of Immunological Methods**, v. 313, n. 1–2, p. 169–175, 2006.

DEUTSCHER, M. P. Proteins Determination by UV Absorption. In: **The Protein Protocols Handbook**. p. 967.

DICKINSON, E. Food Emulsions and Foams. **Elsevier Applied Science Publishers**, v. 1st ed, 1897.

DONG Y, LI P, CHEN CB, WANG ZH, MA P, C. G. The improvement of fibroblast growth on hydrophobic biopolyesters by coating with polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with cell adhesion motif RGD. **Biomaterials**, v. 31, p. 8921–8930, 2010.

EINSFELDT, K. Desenvolvimento de uma nova l-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* para aplicação como biofármaco.

FILHO, G. G. Manual de técnica histológica. **Instituto Oswaldo Cruz**, p. 287, 1981.

FINER N., JAMES, W.P., KOPELMAN, P. G. One-year treatment of obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of orlistat, a gastrointestinal lipase inhibitor. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 24, n. 3, p. 306–313, 2000.

GALÁN, B. et al. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. **Molecular microbiology**, v. 79, n. 2, p. 402–18, jan. 2011.

GOYON, A. et al. Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. I – Non-denaturing chromatographic techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 1058, n. February, p. 73–84, 2017.

HALPERN, A. et al. Experiência clínica com o uso conjunto de sibutramina e orlistat em pacientes obesos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 1, p. 103–105, 2000.

HANISCH J, WALTERMANN M, ROBENEK H, S. A. The Ralstonia eutropha H16 phasin PhaP1 is targeted to intracellular triacylglycerol inclusions in Rhodococcus opacus PD630 and Mycobacterium smegmatis mc2155, and provides an anchor to target other proteins. **Microbiology**, v. 152, p. 3271–3280, 2006.

HUCK-IRIART, C. ET AL. Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, p. 412–420, 2011.

JEONG, H.; KIM, H. J.; LEE, S. . Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21. **Genome Announc**, v. 3, 2015.

JUNIOR, A. J. N.; PONTES, F.; LINS, R. D. Hydration, ionic valence and cross-linking propensities of cations determine the stability of lipopolysaccharide (LPS) membranes. **Chem. Commun**, v. 50, p. 231–233, 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**.

KACI, M., ARAB-TEHRANY, E., DOSTERT, G., DESJARDINS, I., VELOT, E., DESOBRY, S. Efficiency of emulsifier-free emulsions and emulsions containing rapeseed lecithin as delivery systems for vectorization and release of coenzyme Q10: physico-chemical properties and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 147, p. 142–150, 2016.

KAPPELI, O.; FINNERTY, W. R. . **J. Bacteriol.**

KOTSMAR, C. ET AL. Equilibrium of adsorption of mixed milk protein/surfactant solutions at the water/air interface. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 24, p. 13977–84., 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LARENTIS, A.L., ARGONDIZZO A.P.C., E. G. S. ET AL. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in Escherichia coli and recombinant protein stability during long-term storage. **Protein Expression and Purification**, v. 78, p. 38–47, 2011.

- LOPES, A. M.; ELBINUMA, C. C. S.; MAZZOLA, P. O. Remoção de endotoxinas bacterianas: Um desafio na indústria biotecnológica. **Ciência in Foco**, n. January, p. 24–34, 2012.
- LOPES, T. I. B. Avaliação do perfil de ácidos graxos em pacientes com sobrepeso tratados com orlistate usando GC-EM e avaliação do perfil metabólico de plasma por RMN de ¹H, 2012.
- MA, H.-K. et al. Application of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis regulatory protein PhaR as a bio-surfactant and bactericidal agent. **Journal of biotechnology**, v. 166, n. 1–2, p. 34–41, jun. 2013a.
- MA, H. K. et al. Application of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis regulatory protein PhaR as a bio-surfactant and bactericidal agent. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 1–2, p. 34–41, 2013b.
- MANSILLA, F. C. et al. The immune enhancement of a novel soy lecithin/ β -glucans based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 6, p. 1124–31, fev. 2012.
- MATSUMOTO K, MATSUSAKI H, TAGUCHI K, SEKI M, D. Y. Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 787–792, 2002.
- MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 2, p. 585–92, jan. 1999.
- MOTTA, V. T. Rim e Função Renal. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**, v. 16, p. 246–271, 2009.
- NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. In: [s.l: s.n.]. p. 89–95.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. BIOSURFACTANTES: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- OGIKUBO, Y. Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines. **Biologicals**, v. 32, n. 2, p. 88–93, 2004.
- OLIVEIRA, L. DE; DIAS, S. DE C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes : vantagens

e desvantagens. **Quím. nova esc**, v. 39, n. 3, p. 228–236, 2017.

OLIVIERI, L. ET AL. Study of the breakup under shear of a new thermally reversible water-in-oil-in-water (W/O/W) multiple emulsion. **Pharmaceutical research**, v. 18, p. Pharmaceutical research, 2001.

OSMAR DAMIAN PRESTES, MARTHA BOHRER ADAIME, R. Z. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51–64, 2011.

PASTORE, A. D. E G. OBTENÇÃO DE VANILINA: OPORTUNIDADE BIOTECNOLÓGICA. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 642–645, 2005.

PERALTA-GIL, M. et al. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5672–7, out. 2002.

PEREIRA, L. J. B. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 155–162, 2015.

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Localization of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 21, p. 5909–21, nov. 2012.

POKORNI, E. H.; DEKEGEL, D. .; DEPUYDT, F. Macromolecular Structure of Lipopolysaccharides from Gram- Negative Bacteria. **European Journal of Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 6–13, 1973.

PÖTTER, M. et al. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 150, n. Pt 7, p. 2301–11, jul. 2004.

PROMEGA. **Bacterial Strains for Protein Expression**, 2013. Disponível em: <https://www.promega.com/~media/files/resources/product_guides/proteomics/bacterial_strains_for_protein_expression.pdf?la=en>

REDDY, S. R. Emulsion stability of acoustically formed emulsions. **J. Phys. Chem.**, v. 84, p. 1570–1575, 1980.

RENES, I. B. et al. Alterations in Muc2 biosynthesis and secretion during dextran sulfate sodium-induced colitis. **American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology**, v. 282, p. G382–G389, 2002.

ROSEN, M. J. **Surfactants and Interfacial Phenomena**.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, p. 1005–16, 2013.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005–16, fev. 2013.

SALGADO, R. L. Desenho e produção de proteínas recombinantes baseadas na proteína associada a grânulos de *Azotobacter* sp. Fa8 (azPhap) e seu uso como biossurfactante.

SANTOS, L. A. DOS. **Propriedades e aplicações dos biossurfactantes**.

SCHMALENBERG, K. **Restoring dry, damaged hair with a novel natural wheat protein and wheat germ oil– containing shampoo and conditioner line**. v. 62

SCHMITT, T. M. **ANALYSIS OF SURFACTANTS**.

SONG, F. et al. Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 10, p. 3369–80, out. 2011.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis and Composition of Gram-Negative Bacterial Extracellular and Wall Polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 243–270, 1985.

TABATA, T. et al. Bioethanol production from steam-exploded rice husk by recombinant *Escherichia coli* KO11. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 1–7, 2017.

TAKAGI, M. os LPS devem ser completamente removidos de amostras utilizadas para consumo humano, o que é feito por meio de processos de purificação ou inativação da endotoxina. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 110, p. 91–100, 2003.

TCHOLAKOVA, S. ET AL. Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. **Advances in colloid and interface science**, v. 123–126, p. 259–93, 2006.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**.

URTUVIA, V. ET AL. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p.

208–13, 2014.

VEGA-CASTRO, O. et al. Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. 232–238, 2016.

WANG, X.; QUINN, P. J. **Endotoxins: Structure, Function and Recognition**. [s.l: s.n.].

WANG, Z. et al. A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic polyhydroxyalkanoate nanoparticles. **Lab on a chip**, v. 8, n. 11, p. 1957–62, nov. 2008.

WEI, D. et al. Application of polyhydroxyalkanoate binding protein PhaP as a bio-surfactant. v. 91, p. 1037–1047, 2011.

WIECZOREK, R. et al. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2425–35, maio 1995.

XU, F. et al. Modified human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) produced in *E. coli* has a long-acting therapeutic effect in type 2 diabetic mice. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–14, 2017.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZIMMER, K. R., BORRÉ, G. L., TRENTIN, D. S., JÚNIOR, C. W., FRASSON, A. P., GRAEFF, A. A., GOMES, P., MACEDO, A. . Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. January, p. 123–137, 2009.

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 87/2016, intitulado **"Atributos de segurança do emulsificante proteico PhaP de *Azotobacter* sp. FA08 expresso em sistema heterólogo bacteriano"**, coordenado pela professora Monique Renon Eller do Departamento de Tecnologia de Alimentos, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 29/05/2017, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 87/2016, named **"Safety attributes of the proteic emulsifier PhaP from *Azotobacter* sp. FA08 expressed in a bacterial heterologist system"**, is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on May 29, 2017 valid for 12 months.



Prof. Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFV

ANEXO 2

