

Archaea: Potencial Biotecnológico

Utilização e aplicação de arqueas na biotecnologia

Alexander Machado Cardoso

Departamento de Bioquímica Médica,
Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.
amcardoso@bioqmed.ufrj.br

Maysa B. Mandetta Clementino

Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional
de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ.
maysa@incqs.fiocruz.br

Orlando Bonifácio Martins

Departamento de Bioquímica Médica,
Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.
omartins@bioqmed.ufrj.br

Ricardo Pilz Vieira

Departamento de Biologia Marinha,
Instituto de Biologia, UFRJ.
pilz@bioqmed.ufrj.br

Rodrigo Volcan Almeida

Programa de Engenharia Química,
COPPE, UFRJ.
volcan@peq.coppe.ufrj.br

Sylvia M. Campbell Alqueres

Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de
Ciências Biomédicas, UFRJ.
alqueres@bioqmed.ufrj.br

Welington Inácio de Almeida

Departamento de Bioquímica Médica,
Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.
welington@bioqmed.ufrj.br

Ilustrações cedidas pelos autores

1. Introdução

O domínio *Archaea* é formado principalmente por organismos extremofílicos, isto é, microrganismos que não apenas toleram, mas crescem otimamente em ambientes normalmente considerados inóspitos para a vida, como fontes termais, águas extremamente salgadas, temperaturas baixas e condições extremas de pH. Pode-se dizer que certas espécies de arqueas definem claramente os limites de tolerância biológica nos extremos físicos e químicos da vida. O estudo dos microrganismos provenientes desses ambientes extremos pode nos fornecer informações valiosas acerca da origem da vida na Terra, bem como das estratégias adaptativas aos ambientes onde esta prosperou (Woese, 1998).

A adaptação de organismos a esses ambientes obrigou-os a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas para sua sobrevivência. Por outro lado, devido às características "exóticas" que têm, e às suas propriedades únicas, esses microrganismos geram bioprodutos que podem ser empregados em condições drásticas, que freqüentemente ocorrem em processos industriais. Os componentes moleculares deles retirados possuem muitas vezes propriedades que os tornam especialmente adequados para serem utilizados nesses processos. Nesse contexto, é hoje geralmente aceito que esses microrganismos constituem um precioso repositório de moléculas de interesse industrial e um excelente recurso para o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas.

Os benefícios científicos esperados de um conhecimento maior da biologia das arqueas incluem, entre outros, a compreensão das funções exercidas por esses organismos nos ambientes aquáticos e terrestres, bem como suas interações com outros componentes da biodiversidade. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para obtenção de agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, biorremediação e biolixiviação de poluentes e recuperação de minérios. Outros benefícios incluem a otimização da capacidade microbiana para processamento de alimentos, tratamento e/ou remediação de resíduos (esgoto doméstico e lixo). Embora ainda não sejam totalmente conhecidas as estratégias moleculares para sua sobrevivência em tais ambientes inóspitos, sabe-se que esses organismos possuem enzimas adaptadas a tais ambientes, e isso desperta o interesse tanto acadêmico quanto industrial.

2. Filogenia e Fisiologia

Há cerca de vinte anos, Carl Woese e colaboradores sugeriram que os organismos vivos fossem classificados em três grupos principais: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*, com base no estudo das seqüências das moléculas do gene 16S do RNA ribossomal (16S rRNA). Esses grupos são chamados de domínios e acredita-se que surgiram através de

Tabela 1: Diferenças fundamentais entre os três domínios.

Características	Bactéria	Archaea	Eucarya
Membrana nuclear	Ausente	Ausente	Presente
Número de cromossomos	1	1	>1
Parede Celular	Peptideoglicano	Pseudo-peptideoglicano, glicoproteínas e outros	Celulose em plantas, quitina em fungos e nenhuma em animais
Mureína na parede celular	Sim	Não	Não
Lipídeos da membrana celular	Glicerídeos ligados a éster, não ramificado; saturado ou mono-insaturado	Isoprenóide; glicerol diéter ou di-glicerol tetraéter	Glicerídeos ligados a éster; não ramificado; poli-insaturado
Organelas (mitocôndria e cloroplastos)	Ausente	Ausente	Presente
Ribossomo	70S	70S	80S
Síntese de proteínas inibida por cloranfenicol e estreptomicina	Sim	Não	Não
Síntese de proteínas inibida pela toxina da difteria	Não	Sim	Sim

vias evolutivas distintas a partir de um ancestral comum. A noção de dicotomia da vida entre eucariontes e procariontes, que ainda domina a biologia e influencia, em particular, a percepção sobre o domínio *Archaea*, está sendo lentamente revista por grupos atuantes em microbiologia. A diversidade e a biologia das arqueas representam uma enorme contribuição à compreensão da Ecologia Microbiana (Woese *et al.*, 1990).

O domínio *Archaea* consiste de três divisões: *Crenarchaeota*, que contém as arqueas hipertermofílicas redutoras de enxofre; *Euryarchaeota*, que compreende uma grande diversidade de organismos, incluídas as espécies metanogênicas, as halofílicas extremas e algumas espécies hipertermofílicas; e *Korarchaeota*, uma divisão descrita mais recentemente, que engloba organismos hipertermofílicos pouco conhecidos, identificados a partir de seqüências do gene 16S do rRNA isolados de fontes termais terrestres, porém ainda não cultivados em laboratório.

Após serem divididos os três grandes domínios a partir do seqüenciamento do 16S rRNA, estudos subsequentes mostraram que cada domínio está associado a uma série de fenótipos. Alguns desses fenótipos

são únicos de cada domínio, enquanto outros são compartilhados entre dois ou até entre todos os três domínios, como pode ser observado na Tabela 1.

3. Ambientes extremos

Os primeiros organismos identificados pertencentes ao domínio *Archaea* viviam em ambientes extremos de temperatura, salinidade ou acidez, sugerindo que a preferência por tais habitats, era um traço característico do grupo. Estudos mais recentes mostraram várias eubactérias e organismos eucarióticos que sobrevivem também em ambientes extremos, como observaram igualmente a presença de arqueas em ambientes mais amenos, demonstrando, dessa forma, a contribuição desse grupo na biomassa global (Forterre, 1997). Entretanto, as arqueas parecem ser os únicos organismos descobertos até o presente momento que podem sobreviver a temperaturas acima de 95°C, e o fenótipo hipertermofílico só é encontrado nesse domínio da vida. Uma outra característica exclusiva de *Archaea* é o metabolismo metanogênico: não se conhecem eubactérias nem eucariotos capazes de produzir metano como resíduo de seu metabolismo.

O habitat das arqueas halofílicas extremas é hipersalino e as espécies em cultivo laboratorial requerem para o crescimento, entre 1,5 a 4 M de NaCl, o que significa um ambiente com cerca de 10 vezes a salinidade encontrada na água do mar. As metanogênicas são organismos obrigatoriamente anaeróbios e liberam gás metano (CH₄) como resíduo metabólico. São encontradas em ambientes com ausência de oxigênio e abundância de matéria orgânica, como pântanos, açudes, lagos, sedimentos marinhos e rúmen de bovinos. Elas retiram hidrogênio e gás carbônico desses ambientes e os utilizam em seu metabolismo. Vivem como simbioses de uma grande variedade de protozoários também anaeróbios, convertendo produtos finais de fermentação em gás metano. São de grande importância ao ambiente em que vivem pela alta eficiência de sua enzima hidrogenase que, mantendo uma baixa pressão parcial de H₂ para que a metanogênese ocorra, permite que os demais organismos fermentadores façam reoxidação do NADH, o que corresponde a um maior rendimento de ATP e um aumento da biomassa (Brock *et al.*, 1994).

As arqueas termoacidófilas compõem um grupo heterogêneo, defini-

Tabela 2: Estratégias de adaptação das arqueas aos ambientes extremos.

Ambiente	Problemas	Mecanismos de adaptação
Hipersalino	Lise celular por diferença de pressão osmótica	Mantém altas concentrações de K ⁺ intracelularmente A parede celular é composta por glicoproteínas que tem uma maior porcentagem de aminoácidos ácidos que atraem os íons Na ⁺ para o redor da célula. A ligação dos íons com a parede celular estabiliza esta, impedindo a lise
	Desnaturação das proteínas	Essas proteínas expõem aminoácidos de carga negativa, de maneira que, quando os íons positivos entram em contato com a proteína, esta é estabilizada
Altas temperaturas	Lise celular	Maior rigidez da parede celular
	Desnaturação do DNA	Maior quantidade de histonas Maior empacotamento do DNA
	Desnaturação das proteínas	Aumento do número de pontes de hidrogênio Aumento das interações hidrofóbicas Menor porcentagem de aminoácidos termolábeis
Baixas temperaturas	Inativação das proteínas	Menor quantidade de pontes de hidrogênio, dissulfeto e interações hidrofóbicas, o que aumenta a flexibilidade da proteína

do pela capacidade dos organismos de crescerem em altas temperaturas que vão de 55°C a 85°C, com pH que varia de 1,0 até 6,0. O gênero *Sulfolobus* apresenta parede celular composta principalmente por lipoproteína e carboidratos; oxidam H₂S, mas o princípio para essa oxidação ainda não foi esclarecido. Os principais substratos de crescimento parecem ser fontes quentes e também solos quentes que contenham enxofre, e que, então, oxidam tal elemento em ácido sulfúrico, responsável pela acidez desses habitats. O grupo dos termoplasmas é caracterizado pela ausência de parede celular e é encontrado em minas de carvão, com quantidades substanciais de sulfeto ferroso.

Uma das perguntas que mais intrigam os pesquisadores é como esses incríveis organismos conseguem viver em tais ambientes? Deixam constantemente uma interrogação sobre qual será o limite para o desenvolvimento da vida. Embora muitas dúvidas ainda parem sobre os mecanismos de adaptação a tais ambientes hostis, muitos fatores já são apontados como os responsáveis pela resistência desses organismos. A Tabela 2 reúne os principais mecanismos de adaptação aos problemas causados pelos ambientes extremos.



Meios de Cultivo para Arqueas Termofílicas

A pesquisa envolvendo esses organismos tem sido intensificada nas duas últimas décadas por duas razões principais: pelo conhecimento das condições sob as quais a vida pode existir através do estudo de muitos habitats nunca antes explorados e pelo atual reconhecimento do potencial biotecnológico desses organismos, bem como de seus produtos.

4. Aplicações Biotecnológicas

A tecnologia enzimática experimentou um grande avanço quando as enzimas microbianas passaram a ser utilizadas, principalmente por causa da grande variedade de reações que essas enzimas são capazes de catalisar. Com o descobrimento dos microrganismos extremófilos (em sua maioria arqueas), o que ampliou ainda mais a

diversidade microbiana, a potencial faixa de processos para utilização de enzimas também se ampliou, principalmente porque as extremozimas (enzimas provenientes de microrganismos extremófilos) sendo naturalmente estáveis em ambientes extremos, vieram suprir a demanda industrial, para a qual, de certa forma, sempre estiveram em desvantagem as enzimas tradicionais. Um problema inerente às extremozimas é a dificuldade de produzi-las utilizando microrganismos selvagens, já que estes, em geral, necessitam de condições especiais para se reproduzirem, como ambientes anaeróbios estritos, altas temperaturas, meios definidos, etc. Contudo esse problema pode ser contornado expressando essas enzimas em outros organismos de mais fácil manipulação, já que existem vários exemplos em que essas enzimas, quando expressas em microrganismos heterólogos, mantêm suas características originais (Eichler, 2001).

Dentre as enzimas de arqueas de grande potencial para a aplicação biotecnológica, destacam-se as hipertermofílicas, psicrófilas, alcalofílicas, halofílicas e barofílicas.

Entre as enzimas de arqueas que têm recebido maior atenção, estão as termozimas, sendo que os principais processos de potencial utilização

dessas enzimas são o beneficiamento do amido, a manufatura e o branqueamento da polpa para produção de papel e a bem estabelecida prática laboratorial da reação em cadeia da polimerase (PCR), entre outras.

4.1. Processamento do Amido

O amido é um dos polímeros mais abundantes na natureza, estando presente principalmente nos vegetais, onde ele é utilizado para o armazenamento de energia na forma de grânulos insolúveis, compostos basicamente de amilose e amilopectina, que são diferentes polímeros de glicose. Além de servir diretamente como alimento na dieta animal, o amido presente nos vegetais pode ser hidrolisado, gerando glicose, maltose e xarope de oligossacarídeos, que, por sua vez, são utilizados para produção de outros químicos ou como substratos em fermentações (Bentley e Willians, 1996; Vieille e Zeikus, 2001).

De uma forma geral, o processo de hidrólise do amido envolve a liquefação e a sacarificação, as quais ocorrem em altas temperaturas. Durante a liquefação, os grãos de amido são gelatinizados em soluções aquosas entre 105°C e 110°C, num pH entre 5,8 a 6,5, quando então, são utilizadas α -amilases termoestáveis a 95°C, que hidrolisam parcialmente as ligações α -1,4. Nesse processo, o controle de temperatura e pH é muito importante pois, se a temperatura estiver abaixo de 105°C, a gelatinização ocorre parcialmente, e se aumentar muito, há a inativação das α -amilases; se o pH estiver mais ácido que 5,5 também ocorre a inativação dessas enzimas, mas, se vai acima de 6,5 são gerados muitos subprodutos. Após a liquefação, o produto é con-

vertido a sacarídeos de baixo peso molecular e, posteriormente, em glicose, utilizando-se pululanase e glicoamilase, e em maltose, utilizando-se pululanase e β -amilase.

Nesse processo, potencialmente poderiam ser feitas duas melhorias com a utilização de extremozimas: a primeira seria a utilização de α -amilases hipertermofílicas com maior tempo de resistência, de forma que não se necessitasse gastar energia com o resfriamento de 105°C para 95°C, da gelatinização para a liquefação. A segunda seria a em que o pH natural de soluções de amidos gelatinizados, que é de, aproximadamente, 4,5 e que força o ajuste para 5,8 na liquefação, e, posteriormente, redução para 4,2; na sacarificação, de maneira que uma α -amilase apta a trabalhar em pHs mais baixos reduziria, em muito, os custos do processo.

A Tabela 3 mostra algumas enzimas isoladas de arqueas com grande potencial de aplicação na indústria de processamento de amido. Embora nenhuma dessas reúna todas as características necessárias apontadas acima, elas indicam, no entanto, que com técnicas de engenharia de proteínas, esses catalisadores poderiam ser aperfeiçoados.

4.2. Manufatura do Papel

O processo de manufatura do papel envolve, de uma maneira geral, dois estágios: o polpeamento e o branqueamento. O polpeamento é o estágio no qual a estrutura macroscópica da fibra da madeira é quebrada, removendo-se dela a lignina, gerando daí uma fibra mais maleável e com características próprias para a produção do papel (Tolan, 1996; Vieille e Zeikus, 2001). Esse processo é conduzido mecânica ou quimicamente por adição de

ácidos (processo Sulfite) ou bases (processo Kraft) em altas temperaturas. Os processos de polpeamento, por envolverem condições muito drásticas (160°C-190°C em concentrações elevadas de álcalis ou ácidos), são potencialmente próprios para utilização de enzimas extremofílicas. Embora as celulases sejam bem distribuídas entre os domínios *Eukarya* e *Bacteria*, somente uma celulase de *Archaea* é relatada, a endoglicanase de *Pyrococcus furiosus*, que é capaz de hidrolisar ligações β ,1-4 com uma atividade ótima ocorrendo em 100°C e pH 6,0 (Bauer e Kelly, 1998). Contudo, segundo Eichler (2001), várias arqueas termo e hipertermofílicas possuem enzimas β -glicosídicas.

A polpa resultante de um dos processos acima é levada ao branqueamento, que ocorrerá em menor ou maior grau dependendo da utilização do papel. Nesse processo, a quantidade remanescente de lignina do polpeamento é retirada com a utilização, dependendo do processo, de: cloro, dióxido de cloro, ozônio, peróxido de hidrogênio e altas temperaturas. A utilização desses agentes oxidantes acaba gerando uma quantidade muito grande de poluentes, e, por isso, vem sofrendo sanções das agências ambientais. Uma das alternativas pesquisadas para reduzir esses compostos, principalmente os derivados de cloro, é a utilização de enzimas. Entre as enzimas pesquisadas, as xilanasas, segundo Tolan (1996), são as que possuem uma boa aceitação industrial e têm sido utilizadas em indústrias onde está havendo um decréscimo na utilização dos oxidantes, da ordem de 10% a 15%. Ainda segundo esse autor, as características ótimas para uma xilanase seriam sua ação em temperaturas por volta de 70°C e pH entre 10-12, o que abre uma excelente

Tabela 3. Enzimas com potencial de aplicação na indústria de processamento do amido.

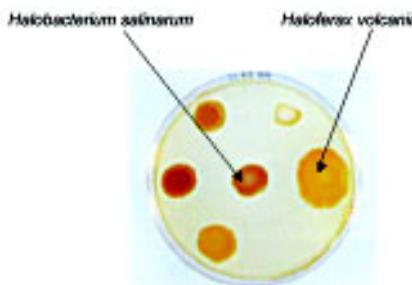
Enzima	Origem	Temperatura	pH	Referência
α -amilase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100°C	5,5-6,0	Dong <i>et al.</i> , 1997
	<i>Pyrococcus woesei</i>	100°C	5,5	Koch <i>et al.</i> , 1997
	<i>Pyrodictium abyssi</i>	100°C	5,0	Niehaus <i>et al.</i> , 1999
Pululanase	<i>Thermus caldophilus</i>	75°C	5,5	Kim <i>et al.</i> , 1996
Glicoamilase	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	50 a 60°C	4,0-5,5	Ganghofner <i>et al.</i> , 1998
Amilopululanases	<i>Pyrococcus furiosus</i>	105°C	6,0	Dong <i>et al.</i> , 1997

oportunidade para a exploração de xilanases de arqueas extremofílicas como as de *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus* sp. e *Thermococcus zilligii* (Eichler, 2001).

Um outro problema na fabricação de papel, principalmente pelo polpeamento mecânico, é a deposição do “pitch”, denominação atribuída ao conjunto de substâncias hidrofóbicas da madeira, principalmente triglicerídeos e graxas, que causam muitos problemas na manufatura da polpa e do papel (Jaeger e Reetz, 1998). As lipases já vêm sendo utilizadas na remoção dessas substâncias. Gutierrez *et al.* (2001) comentam que muitos estudos estão sendo realizados, por meio de técnicas de engenharia de proteínas, no intuito de aumentar a amplitude de substratos hidrolisáveis, atividade e estabilidade em pH e temperatura elevados, sendo importante que a enzima esteja ativa a altas temperaturas, uma vez que para um desempenho ótimo, a lipase deveria ser adicionada à polpa a uma temperatura de, aproximadamente, 85°C. Nosso laboratório vem trabalhando no isolamento, clonagem, expressão e caracterização de uma enzima lipolítica de arquea cuja atividade já foi testada a 80°C (manuscrito em preparação).

4.3. Utilização de Polimerases

A reação em cadeia da polimerase (PCR) revolucionou a prática da biologia molecular, ou seja, a surpreendente replicação *in vitro* de seqüências específicas de DNA possibilitou que o isolamento de genes, seu seqüenciamento e mutações específicas, antes uma prática laboriosa, se tornasse uma atividade cotidiana de qualquer laboratório de engenharia genética. O método da reação em cadeia da polimerase, por sua vez, foi extremamente simplificado com a utilização de enzimas hipertermofílicas. Embora a principal DNA polimerase termofílica utilizada seja a de uma bactéria (*Thermus aquaticus*), as DNA polimerases de arqueas, como as de *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* e outras, apresentam uma vantagem sobre a *Taq* polimerase, pois elas possuem



Pyrodictium abyssi

uma maior capacidade de correção de pareamentos errôneos, diminuindo a freqüência de erros na replicação *in vitro* (Lundberg *et al.*, 1991).

Não somente as enzimas adaptadas às altas temperaturas têm potencialidades biotecnológicas. As enzimas de organismos que crescem entre 5°C e 25°C (Psicrofílicos) podem ser empregadas em vários processos e produtos, como proteases, lipases, amilases, b-glicanases em detergentes, pectinases em sucos de frutas, b-galactosidases para produção de leite deslactosado, lipases para maturação de queijos (Herbert, 1992; Eichler, 2001).

4.4. Arqueossomos

As aplicações biotecnológicas das arqueas não se restringem a produção, expressão heteróloga e purificação de extremozimas. Pelo menos uma outra potencialidade biotecnológica deve ser ressaltada. A utilização dos arqueossomos (preparação de lipídeos de membrana arqueana), como coadjuvantes em formulações

de vacinas, proporciona captação 3 a 50 vezes maior pelas células fagocíticas do sistema imune quando comparadas com formulações de lipossomos convencionais, além de geração de resposta imune prolongada (Tolson *et al.*, 1996; Sprott *et al.*, 1997; Krishnan *et al.*, 2000). Todos os estudos realizados *in vitro* e *in vivo* indicam que os arqueossomos são moléculas seguras e não invocam nenhuma toxicidade em ratos. Em geral, os arqueossomos demonstram alta estabilidade ao estresse oxidativo, à alta temperatura, ao pH alcalino, à ação de fosfolipases, de sais biliares e de proteínas do soro. Algumas formulações podem ser esterilizadas em autoclave, sem problemas como fusão ou agregação das vesículas (Patel e Sprott, 1999).

5. Genômica

Uma nova era sobre o conhecimento das arqueas começou em 1996 em decorrência do seqüenciamento completo do primeiro genoma de arquea (Bult *et al.*, 1996). Com o subsequente desenvolvimento de novos projetos de seqüenciamento de outros organismos pertencentes ao domínio *Archaea*, foi produzida uma rica amostragem de genomas desse grupo taxonomicamente bastante diversos. Esse repertório de genomas completamente seqüenciados inclui múltiplos representantes das duas maiores divisões de arqueas estabelecidas pela análise filogenética dos genes de rRNA: a *Euryarchaeotae Crenarchaeota*, bem como as principais variantes ecológicas de arquea: os hipertermofílicos, termofílicos moderados e mesofílicos, assim como halofílicos e metanogênicos, formas autotróficas e heterotróficas, e múltiplas espécies que representam organismos anaeróbios e aeróbios. Infelizmente os bancos de dados ainda não contam com seqüências genômicas de alguns organismos pertencentes a ramos de arquea potencialmente importantes, como as misteriosas *Korarchaeota*, que devem ter divergido das demais arqueas nos primórdios da evolução, e a igualmente intrigante nanoarchaea, que parece ter o menor genoma entre todos os organismos de vida livre já descritos (Huber *et al.*, 2002)



Métodos de Preservação de Arqueas

A comparação dos genomas já seqüenciados de arqueas e bactérias permite concluir que a diferença mais marcante entre os domínios *Archaea* e *Bacteria* está na organização de seus sistemas de processamento de informações. A estrutura dos ribossomos e da cromatina, a presença de histonas, assim como a similaridade entre seqüências das proteínas envolvidas na tradução, transcrição, replicação e reparo do DNA; todos esses pontos apontam para uma maior proximidade entre arqueas e eucariotos. Por outro lado, alguns componentes-chaves da maquinaria de replicação de DNA não são homólogos nos eucariotos nem nas bactérias. Essa observação permite sugerir a hipótese de que a replicação da dupla fita de DNA como principal forma de replicação do material genético dos seres vivos pode ter, na sua evolução, surgido, independentemente, duas vezes: uma nas bactérias e uma outra no ancestral de arqueas e eucariotos. No entanto, muitas, mas não todas as rotas metabólicas de *Archaea*, são mais parecidas com as de bactérias que as de eucariotos. Esses estudos são concordes quanto ao posicionamento das arqueas como um domínio distinto da vida, com conexões específicas com os eucariotos, e enfatizam a natureza misteriosa e única dos genomas das arqueas (Gaasterland, 1999).

Quando analisamos os 18 genomas de arqueas seqüenciados totalmente até hoje, podemos concluir que 16 proteínas são exclusivas de arqueas, enquanto 61 são exclusivas de arquea-eucariotos. Interessantemente, desses 61 genes, apenas 2 não pertencem à maquinaria do processamento de informação. Portanto, a análise genômica das arqueas já

seqüenciadas corrobora a identificação destas como um grupo de organismos que têm uma base sólida e estável de genes, os quais, primariamente, codificam proteínas envolvidas na replicação e expressão do genoma. Além desses, existe um segundo grupo de genes que é compartilhado pelas arqueas e eucariotos, genes que são claramente associados ao processamento da informação. O fato da afinidade arquea-eucariótica ser quantitativamente pequena, demonstra, no entanto, que o processo de evolução tem sido mais complexo que a simples herança vertical, e tem envolvido uma extensiva transferência lateral de genes entre *Archaea* e *Bacteria*. Após a divergência evolutiva entre as linhagens de arqueas e bactérias, vem ocorrendo uma grande mistura de genes codificantes para enzimas metabólicas, componentes estruturais da célula e outras proteínas que não participam da maquinaria central de processamento da informação (Nelson *et al.*, 1999).

Além dos estudos funcionais, a genômica de *Archaea* é fundamental para o conhecimento que temos de duas transições cruciais na evolução da vida: a primeira é a divergência entre as linhagens de bactérias e as de arquea-eucarióticas, que pode ter envolvido a origem da maquinaria de replicação de DNA. A segunda é a origem dos eucariotos. Em relação a esse ponto, a arquea é uma fonte fantástica de informação, particularmente porque, em muitas situações, ela tem retido as características primitivas, enquanto os eucariotos têm sofrido modificações muito maiores. Um exemplo característico é a subunidade menor da DNA polimerase, que possui todas as marcas de uma fosfatase ativa em arqueas, mas não em eucariotos, onde a atividade fosfatásica está provavelmente inativada. Sem sombra de dúvidas, arquea representa um ancestral comum das linhagens arquea-eucarióticas descendentes. Portanto, a genômica de arquea é a nossa melhor oportunidade de reconstruir essa fase intermediária crítica da evolução da vida (Makarova e Koonin, 2003).

6. Considerações Finais

Estudos que envolvem o domínio *Archaea* vêm confirmando as duas hipóteses iniciais de Woese e Fox (1977), isto é, que as arqueas exibem uma diversidade fenotípica no mínimo comparável àquela apresentada pelo domínio *Bacteria* e que os organismos do domínio *Archaea* serão caracterizados por aspectos únicos em âmbito molecular. Outrossim, o fato de *Archaea* exibir um mosaico contendo características dos dois outros domínios continua a estimular discussões entre os evolucionistas (Forterre *et al.*, 2002).

No contexto de extremofilia, a descoberta contemporânea mais surpreendente foi, sem dúvida, a dos organismos hipertermófilos, que estendeu a sobrevivência desse organismo para cerca de 121°C de temperatura em que células vivas proliferam eficientemente. Essa característica notável implica na estabilização de todos os componentes celulares, de modo que a sua funcionalidade seja mantida em condições de temperatura que seriam danosas para a maioria das biomoléculas dos organismos mesófilos. A elucidação das estratégias usadas na estabilização de componentes celulares e, em especial, de proteínas, representa um desafio fascinante para a biologia atual (Kashe e Lovley, 2003).

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e decisivas na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura é derivada das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos.

Considerando que o Brasil possui uma grande extensão territorial com inúmeros e variados ambientes extremos, como: águas termais, salinas, inúmeras estações de tratamento de esgoto, rejeitos industriais, entre outros. A biodiversidade microbiana brasileira, ainda não explorada, pode-se tornar uma fonte para o desenvolvimento biotecnológico do país.

Estamos em plena era biotecnológica, quando os processos bioquímicos são cada vez mais utilizados para a produção de agentes terapêuticos, produtos químicos e biocatalisadores. O grande desafio será incorporar a informação decorrente do estudo desses organismos extremofílicos em novas tecnologias, utilizando o enorme potencial de suas enzimas e biomoléculas.

7. Referências Bibliográficas

- Bauer, M. W., Kelly, R. M. (1998). The family *b*-glucosidases from *Pyrococcus furiosus* and *Agrobacterium faecalis* share a common catalytic mechanism. *Biochem.* **37**:17170-17178.
- Bentley, I. S., Williams, E. C. (1996). Starch conversion. *Ind. Enzymol.* **2**:339-357.
- Björkling, F., Godtfredsen, S. E., Kirk, O. (1991). The Future Impact of Industrial Lipases. *Trends Biotechnol.* **9**:360-363.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (1994). *Biology of Microorganisms*. 7ed. Prentice Hall: New Jersey, 909p.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D. *et al.* (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science.* **273**:1058-1073.
- Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A., Zeikus, J. G. (1997). Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3569-3576.
- Eichler, J. (2001). Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol. Adv.* **19**:261-278.
- Forterre, P. (1997). Archaea: what can we learn from their sequences? *Curr. Opin. Gen. Devel.* **7**:764-770.
- Forterre, P., Brochier C., Philippe, H. (2002). Evolution of the Archaea. *Theor. Popul. Biol.* **4**:409-422.
- Gaasterland, T. (1999). Archaeal genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:542-547.
- Ganghofner, D., Kellermann, J., Staudenbauer, W.L., Bronnenmeier, K. (1998). Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and an α -glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**:302-308.
- Gutierrez, A., Del Rio, J., Martinez, M. J. (2001). The Biotechnology Control of Pitch in Paper Pulp Manufacturing. *Trends Biotechnol.* **19**:340-348.
- Herbert, R. A. (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol.* **10**:395-402.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., Stetter, K. O. (2002). A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature.* **417**:63-67.
- Jaeger, K. E., Reetz, M. T. (1998). Microbial Lipases from Vestibule Tools for Biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**:396-402.
- Kashe, K., Lovley, D. R. (2003). Extending the Upper Temperature Limit for Life. *Science.* **301**:934
- Kim, C.-H., Nashiru, O., Ko, J. H. (1996). Purification and biochemical characterization of pullulanase type I from *Thermus caldophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**:147-152.
- Koch, R., Canganella, F., Hippe, H., Jahnke, K. D., Antranikian, G. (1997). Purification and properties of a thermostable pullulanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium *Fervidobacterium pennavorans* ven5. *Appl. Microbiol.* **63**:1088-1094.
- Krishnan, L., Dicaire, C. J., Patel, G. B., Sprott, G. D. (2000). Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: comparison to conventional liposomes and alum. *Infect Immun.* **68**: 54-63.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A., Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene.* **108**:1-6.
- Makarova, K. S., Koonin, E. V. (2003). Comparative genomics of archaea: how much have we learned in six years, and what's next? *Gen. Biol.* **4**:115-128.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J. *et al.* (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature.* **399**:323-329.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:711-729.
- Patel, G. B., Sprott, G. D. (1999). Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**:317-57.
- Santos, H., Lamosa, P., da Costa, M. S. (2001). Extremófilos: microrganismos à prova de agressões ambientais extremas. *Bol. Biotec.* **69**:2-10.
- Schiraldi, C., De Rosa, M. (2002). The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol.* **20**:515-521.
- Sprott, G. D., Tolson, D. L., Patel, G. B. (1997). Archaeosomes as novel antigen delivery systems. *FEMS Microb. Lett.* **154**: 17-22.
- Tolan, J. S. (1996). Pulp and Paper. *Ind. Enzymol.* **2**:327-338.
- Tolson, D. L., Latta, R. K., Patel, G. B. and Sprott, G. D. (1996) Uptake of archaeobacterial and conventional liposomes by phagocytic cells. *J. Liposome Res.* **6**, 755-776.
- Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:1-43.
- Woese, C. R. (1998). The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:6854-6859.
- Woese, C. R., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**:5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:4576-4579. †