



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

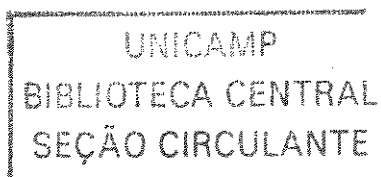
**ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DA ENZIMA G6PDH,
EM COLUNAS DE CAMPÂNULAS
PULSANTES ,COM O USO DE MICELAS REVERSAS**

Orientada PATRÍCIA BERNARDI LEITE

Orientador: PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI

CAMPINAS – SÃO PAULO - BRASIL

FEVEREIRO / 2005



UNIDADE	B.C.
Nº CHAMADA	L536e
V	EX
TOMBO BC	63930
PROC.	16-4-00066-05
C	☐ D ☒ A
PREÇO	M 00
DATA	17/05/05
Nº CPD	

bib-id 350461

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

L536e Leite, Patrícia Bernardi
Estudo da recuperação da enzima G6PDH, em colunas de câmpulas pulsantes, com o uso de micelas reversas / Patrícia Bernardi Leite.--Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biotecnologia. 2. Micelas. 3. Equilíbrio líquido-líquido. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Studies of recovery of G6PDH enzyme, in pulsed caps columns, using reversed micelles .

Palavras-chave em Inglês: Micellars, Biotechnology, Liquid-liquid equilibrium.

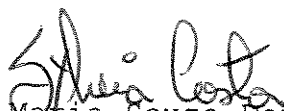
Área de concentração: Sistema de processos químicos e informática.

Titulação: Doutorado

Banca examinadora: Sylvia Maria Souza Pereira da Costa, Gilsinei Marques Campese, Maria Elizabeth Broto e Lucia Helena Innocentini Mei

Data da defesa: 28 de fevereiro de 2004

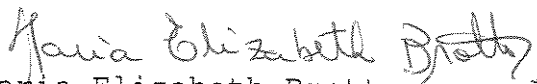
Tese de Doutorado defendida por Patricia Bernardi Leite ,em 28 de fevereiro de 2005 , e aprovada pela banca constituída pelos seguintes doutores:



Sylvia Maria Souza Pereira da Costa



Gilsinei Marques Campese



Maria Elizabeth Brotto



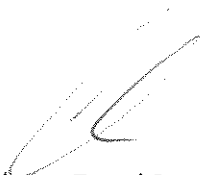
Lucia Helena Innocentini Mei



Elias Basile Tambourgi

200509899

Versao final da tese de Doutorado defendida por
Patricia Bernardi Leite ,em 28 de fevereiro de 2005

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'E. Tambourgi', is written over the text of the supervisor's name.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi
orientador

Dedico:

A pessoa que foi essencial à minha vida profissional

Oswaldo Cezário Leite – Meu pai

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido concluir mais uma etapa em minha vida.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, pela orientação, amizade e confiança que estiveram sempre presentes durante o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Ao meu pai Osvaldo Cezário Leite que, em vida, me incentivou na minha realização profissional.

A minha mãe Maria Niderce Bernardi Leite e meu irmão Paulo Roberto Bernardi Leite que com muita paciência e incentivo tornaram minha tarefa possível e prazerosa.

Ao meu marido André Luís Canhassi da Silva pelo incentivo, apoio, amizade e paciência que foram a mim dedicados.

A todos os amigos da Pós-Graduação que compartilharam durante este período momentos de companheirismo, amizade e apoio.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	x
--------------------------	----------

ÍNDICE DE TABELAS	xiv
--------------------------	------------

LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
------------------------------	------------

RESUMO	xxiii
---------------	--------------

ABSTRACT	xxv
-----------------	------------

1.INTRODUÇÃO	1
---------------------	----------

2. REVISÃO DA LITERATURA	3
---------------------------------	----------

2.1 - Micelas Reversas	03
-------------------------------	-----------

2.2 - Tensoativos	05
--------------------------	-----------

2.2.1 - Tensoativos Aniônicos	09
-------------------------------	----

2.2.2 - Tensoativos Catiônicos	10
--------------------------------	----

2.2.3 - Tensoativos Neutros e Zwitteriônicos	10
--	----

2.3 - Microambiente Micelar Reverso	12
--	-----------

2.3.1 - Métodos de Microencapsulação de Biomoléculas	12
--	----

2.3.2 - Modelos de Microencapsulação e Localização de Biomoléculas	13
--	----

2.3.3 - Extração de Biomoléculas por Micelas Reversas	14
2.3.4 - Fatores Determinantes na Extração de Biomoléculas por Micelas Reversas	20
2.4 - A Enzima Alvo: Glicose-6-Fosfato Desidrogenase	32
2.4.1 - Principais Aplicações da G6PDH	32
2.4.1.1 - Aplicações Clínicas	32
2.4.1.2 - Aplicações Analíticas	35
2.4.1.3 - Aplicações na Construção de Biossensores	36
2.4.2 - Preços Praticados pelo Mercado	36
2.4.3 - Características Gerais da G6PDH	37
2.5 - Perspectivas e Novas Tendências	39
2.6 - Equipamentos Utilizados na Extração Líquido-Líquido	41
2.7 - Processamento Contínuo	49
2.8 - Extração Contínua em Colunas de Campânulas Pulsadas	51
2.9 - Transferência de Massa em Sistemas Bifásicos Aquosos	52
3. OBJETIVOS	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1 - Microorganismo	57
4.2 - Extrato Bruto	57
4.3 - Extração de G6PDH por Micela Reversa	57
4.3.1 – Preparo das Soluções Micelares	57
4.4 – Coluna Agitada por Campânulas Pulsantes	58

4.5 - Avaliação da Atividade Enzimática	60
4.6 - Avaliação do Processo de Extração	61
4.7 – Planejamento Fatorial	62
<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</u>	<u>64</u>
5.1 – Tensoativos Aniônicos	64
5.2 - Tensoativos Catiônicos	66
5.2.1 - Extração da Enzima G6PDH por Sistema de Micelas Reversas formadas a partir do Agente Tensoativo Catiônico CTAB	66
5.3 - Resultados Preliminares: Extração Contínua em colunas pulsadas	73
5.3.1 - Extração da G6PDH por Micela Reversa em Processo Contínuo utilizando o Agente Tensoativo Aniônico AOT	77
5.4 - Otimização da Enzima G6PDH por Micela Reversa Utilizando uma Microcoluna com Campânulas Pulsadas e a Enzima Pura	77
5.5 - Estudos Experimentais da Extração de G6PDH por Micela Reversa em Processo Contínuo	82
<u>6. CONCLUSÕES</u>	<u>89</u>
<u>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</u>	<u>90</u>
<u>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>91</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 01	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UMA MICELA E DE UMA MICELA REVERSA (ADAPTADO DE www.chic.ac.uk).	05
FIGURA 02	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MICELAS DOS TIPOS ESFÉRICAS, CILÍNDRICAS E DISCÓTICAS (BRANDÃO, 1999).	06
FIGURA 03	REPRESENTAÇÃO DAS FORMAS DE EMPACOTAMENTO CRÍTICO E ESTRUTURAS FORMADAS PARA DIFERENTES TENSOATIVOS (BRANDÃO, 1999).	08
FIGURA 04	MODELOS PARA MICROENCAPSULAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM MICELAS REVERSAS: 1, “WATER-SHELL”; 2, “INDUCED-FIT”; 3, “FIXED-SIZE” (ADAPTADO DE MARTINEK <i>et al.</i> , 1986).	14
FIGURA 05	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO EM SISTEMAS MICELARES REVERSOS.	16

FIGURA 06	MECANISMO DE FORMAÇÃO DE MICELAS REVERSAS (ADAPTADO DE DUNGAN <i>et al.</i> , 1991).	18
FIGURA 07	TIPOS ENGLOBAMENTO DE PROTEÍNAS POR MICELAS REVERSAS (LUISI <i>et al.</i> , 1988).	19
FIGURA 08	COMPOSIÇÃO DE UMA MICELA REVERSA (ADAPTADO DE SEOUD <i>et al.</i> , 1999).	21
FIGURA 09	EFEITO NO AUMENTO DA QUANTIDADE DE ÁGUA EM MICELAS REVERSAS DO AGENTE TENSOATIVO ANIÔNICO AOT, ONDE: ÁGUA IMOBILIZADA ■; ÁGUA DE HIDRATAÇÃO ● E ÁGUA LIVRE ○. (ADAPTADO DE GOTO, <i>et al.</i> (1995)).	23
FIGURA 10	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGUA E TENSOATIVO EM SISTEMAS MICELARES REVERSOS.	24
FIGURA 11	PRIMEIRA ETAPA DA VIA DAS PENTOSE.	32

FIGURA 12	REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉLULAS DE <i>L. mesenteroides</i> (DÍMERO). O SUBSTRATO E A COENZIMA NADP ⁺ APARECEM LIGADOS AOS RESPECTIVOS SÍTIOS CATALÍTICOS (VOUGHT <i>et al.</i> , 2000).	39
FIGURA 13	EXEMPLO DE UM EXTRATOR EM ESTÁGIOS DISCRETOS.	44
FIGURA 14	EXEMPLOS DE COLUNAS QUE ATUAM SOB A FORÇA DA GRAVIDADE. (A) COLUNA DE PRATOS FIXOS PERFURADOS; (B) COLUNA RECHEADA; (C) COLUNA SPRAY.	45
FIGURA 15	EXEMPLOS DE COLUNAS QUE ATUAM SOB A FORÇA DA GRAVIDADE. (A) COLUNA DE FLUXO PULSADO; (B) COLUNA DE PRATOS PULSADOS; (C) COLUNA DE DISCOS ROTATIVOS.	48
FIGURA 16	MICRO-COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSANTES.	59
FIGURA 17	CAMPÂNULAS SOLDADAS À HASTE. FORMANDO O DISPOSITIVO DE AGITAÇÃO DA MICRO-COLUNA.	60

FIGURA 18 RECUPERAÇÃO DE G6PDH POR MICELAS REVERSAS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE BUTANOL. 72

FIGURA 19 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVAS DE NÍVEL DESCRITO PELO MODELO DA EQUAÇÃO 09, QUE REPRESENTA A EXTRAÇÃO DE G6PDH POR MICELA REVERSA UTILIZANDO UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS E A ENZIMA PURA. 82

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 01	MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS UTILIZADAS EM KITS DE DIAGNÓSTICOS.	33
TABELA 02	MASSA MOLAR DE G6PDH DE FONTES DIFERENTES.	38
TABELA 03	CLASSIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS DE EXTRAÇÃO SEGUNDO HANSON (1971).	47
TABELA 04	COMPOSIÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DE G6PDH.	61
TABELA 05	PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 COM 03 REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO pH, CONCENTRAÇÃO DE AOT E TEMPERATURA NA RECUPERAÇÃO DE G6PDH POR MICELAS REVERSAS.	64

TABELA 06	ESTIMATIVA DOS EFEITOS, ERROS-PADRÃO E TESTE <i>t</i> (STUDENT) PARA OS PARÂMETROS ESTUDADOS NA RECUPERAÇÃO DA G6PDH POR MICELAS REVERSAS DE AOT.	65
TABELA 07	MATRIZ PARA PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 ⁵ COM 03 (TRÊS) REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS: pH, CONCENTRAÇÃO DE CTAB, CONCENTRAÇÃO DE BUTANOL (%) E TEMPERATURA, NA RECUPERAÇÃO DE G6PDH POR MICELAS REVERSAS.	67
TABELA 08	ESTIMATIVA DOS EFEITOS, ERROS-PADRÃO E TESTE <i>t</i> (STUDENT) PARA OS PARÂMETROS ESTUDADOS NA RECUPERAÇÃO DE G6PDH POR MICELAS REVERSAS DE CTAB.	70
TABELA 09	PARÂMETROS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS FATORES SIGNIFICATIVOS.	71

TABELA 10	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE REGRESSÃO PARA O MODELO REPRESENTATIVO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA G6PDH POR MICELAS REVERSAS DE CTAB.	72
TABELA 11	BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DA G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.	74
TABELA 12	BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.	74
TABELA 13	BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DA G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.	75
TABELA 14	BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.	76

TABELA 15	BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DA G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.	76
TABELA 16	BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.	77
TABELA 17	ESQUEMA DA MATRIZ UTILIZADA NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 COM 02 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.	78
TABELA 18	EFEITOS ESTIMADOS, VALORES DO TESTE t DE "STUDENT" E ERROS-PADRÃO OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 COM 02 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.	79
TABELA 19	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE G6PDH NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 COM 02 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.	80

TABELA 20	COEFICIENTE DE REGRESSÃO, ERROS-PADRÃO, TESTE <i>t</i> DE "STUDENT" E NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA O MODELO QUE REPRESENTA O PROCESSO CONTÍNUO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO DE G6PDH POR MICELA REVERSA, UTILIZANDO UM PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² COM FACE CENTRADA.	80
TABELA 21(A)	COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33 PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 1. CONDUTIVIDADE: 10 mS/cm.	84
TABELA 21 (B)	COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33 PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 1. CONDUTIVIDADE: 15 mS/cm.	85

TABELA 22(A) COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE
AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO
DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA.
CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,13
PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 2.
CONDUTIVIDADE: 10 mS/cm. 85

TABELA 22 (B) COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE
AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO
DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA.
CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,13
PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 2.
CONDUTIVIDADE: 15 mS/cm. 86

TABELA 23(A) COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE
AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO
DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA.
CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33
PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 0,5.
CONDUTIVIDADE: 12,5 mS/cm. 86

TABELA 23 (B) COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE
AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO
DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA.
CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33
PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 1,5.
CONDUTIVIDADE: 15 mS/cm. 87

TABELA 24(A) COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE
AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO
DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA.
CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,5
PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 0,5.
CONDUTIVIDADE: 10 mS/cm. 87

TABELA 24 (B) COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE
AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO
DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA.
CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,5
PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 1,5.
CONDUTIVIDADE: 10 mS/cm. 88

LISTA DE ABREVIATURAS

AOT	Bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sódio
BDBAC	Cloreto de benzil dodecil bis(hidroxietyl) amônio
brij 35	Dodecanol
BSA	“Bovine serum albumine”; albumina de soro bovino
C	Concentração da proteína na fase dispersa
C*	Concentração da proteína na interface em equilíbrio com a fase contínua
C_{ent}	Concentração de soluto na corrente de entrada de fase dispersa
C_{sai}	Concentração de soluto na corrente de saída de fase dispersa
C_f	Fração mássica de soluto na alimentação
C_r	Fração mássica de soluto no refinado
C_{fc}	Valor médio entre a concentração final da fase contínua e o valor inicial da mesma fase
CICP	Cloreto de cetilpiridino
CMC	Concentração micelar crítica, concentração mínima de tensoativo necessária para a formação de micelas
CTAB	Brometo de cetiltrimetil amônio
DHF	Dihexadecil fosfato
DTAB	Brometo de dodeciltrimetil amônio
E_k	Índice de recuperação do soluto
K	Coefficiente de partição

K_{da}	Coeficiente de transferência de massa
N	Fluxo de proteína para a fase dispersa
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP(H)	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato desidrogenase
pI	Ponto isoelétrico
Q	Velocidade de fluxo da fase dispersa
SDS	Lauril Sulfato de sódio
TOMAC	Cloreto de trioctilmetil amônio
Triton S-100	P-tercetil fenol
W₀	“Water in oil”; quantidade de água presente no interior da micela
ΔC_{lm}	Média logarítmica da diferença de concentrações entre a interface e a fase dispersa

RESUMO

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) pode ser obtida de origem animal, vegetal ou microbiana, como no caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta enzima apresenta grande importância para a sobrevivência celular uma vez que participa da regulação do ciclo das pentoses sendo responsável pela manutenção de um nível adequado de NADPH nas células.

A deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em seres humanos é considerada a mais importante enzimopatia diagnosticada. A deficiência desta enzima favorece a ruptura da membrana dos glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos), levando à anemia hemolítica.

Neste trabalho, estudou-se as condições de extração da enzima G6PDH através do uso da técnica de extração líquido-líquido por micelas reversas de tensoativos aniônicos (AOT) e catiônicos (CTAB). Planejamentos estatísticos específicos para cada sistema analisado foram empregados. As variáveis estudadas foram: pH, concentração do tensoativo e temperatura.

Estudou-se, também, uma microcoluna agitada por campânulas pulsadas, visando promover um eficiente contato entre as fases através de uma agitação suave, aumentando assim o tempo de contato entre as fases no interior da microcoluna e também evitando a desnaturação da enzima.

As porcentagens de recuperação da enzima para estes sistemas variaram de nulos a 5,10 % utilizando AOT e de nulos a 14,04 % com CTAB. No entanto, observou-se diminuição na atividade catalítica da enzima.

Verificou-se que, a metodologia estatística empregada foi de extrema importância e que, a microcoluna estudada tem operação estável e altos rendimentos em atividade são alcançados.

Palavras-chave: Glicose-6-Fosfato Desidrogenase, campânulas pulsadas, micela reversa, extração contínua.

ABSTRACT

The enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) it can be obtained of animal origin, vegetable or microbial, as in the case of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This enzyme presents great importance for the cellular survival once it participates in the regulation of the cycle of the pentosys being responsible for the support of an appropriate level of NADPH in the cells.

The deficiency of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in human beings the most important diagnosed enzymepatic is considered. The deficiency of this enzyme favors the rupture of the membrane of the red globules (hemacys or erythrocytes), taking to the hemolytic anemia.

In this work, it was studied the conditions of extraction of the enzyme G6PDH by extraction on reversed micelles utilizing a anionic surfactant (AOT) and cationic surfactant (CTAB). Specific statistical design for each analyzed system were used. The studied variables were: pH, concentration of the surfactant and temperature.

It was studied, also, a microcolumn agitated by pulsed caps, due to promote an efficient contact between the phases in the column and also to avoid the enzyme denaturation and the loss of main proteins properties.

The percentages of recovery of the enzyme for these systems varied of 0 to 5,10 % using AOT and of 0 to 14,04% with CTAB. However, decrease was observed in the catalytic activity of the enzyme.

It was verified that, the statistics employed methodology was of extreme importance and that, the studied microcoluna has stable operation and high incomes in activity are reached.

Keywords: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, pulsed caps, reversed micelles, continuous extraction.

1 – INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta atualmente um mercado interno favorável à pesquisa e desenvolvimento de processos biotecnológicos voltados à obtenção de enzimas, mesmo apresentando em 2002 déficit em sua balança comercial.

A enzima estudada no presente trabalho, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), apresenta grande interesse comercial, sendo utilizada em diversos setores, tais como: análises clínicas, como reagente analítico e na composição de biossensores. No entanto, a obtenção em escala industrial desta e de outras enzimas de interesse depende do desenvolvimento de técnicas de purificação que viabilizem esta produção. Industrialmente empregam-se processos em múltiplos estágios utilizando técnicas de alto custo tais como a cromatografia de afinidade e troca iônica, tornando desta forma o preço final do bioproduto elevado. O desenvolvimento de técnicas de extração para a purificação de enzimas e outros bioprodutos é uma alternativa tecnologicamente atraente.

A extração líquido-líquido convencional com solventes orgânicos é uma operação unitária extensivamente usada na indústria química como técnica de separação, quando se empregam substâncias que se degradam com facilidade, ou por razões econômicas, quando grandes volumes devem ser tratados em tempos curtos. A extração líquido-líquido utilizando solventes é muito empregada para a separação de antibióticos, porém é uma técnica pouco viável para proteínas, pois a maioria pode sofrer desnaturação em solventes orgânicos. Para extrair proteínas biologicamente ativas propõe-se a adição de polímeros hidrofílicos a soluções aquosas no estabelecimento de duas fases imiscíveis. Cada uma das fases formadas contém alta proporção de água formando um ambiente favorável para as proteínas biologicamente ativas, como as enzimas, mantendo-as em seu estado solúvel. Na

extração líquido-líquido por micelas reversas, é possível não somente purificar biomoléculas, mas também concentrá-las, uma vez que geralmente são obtidas em baixas concentrações. Consiste de um método de purificação no qual com a alteração de alguns parâmetros tais como: pH, concentração de tensoativo, tipo e concentração de solvente, temperatura, entre outros, pode-se alterar a especificidade do sistema, melhorando o processo de extração.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Micelas Reversas

A extração por micelas reversas trata-se de uma ampliação da técnica de biosseparação através da extração por solventes. Em engenharia esta pode ser empregada na separação de componentes presentes numa mistura homogênea. Entretanto, a separação do componente de interesse é limitada por diversos fatores, tais como: suas características físico-químicas, custos do processo de separação e condições disponíveis para implantação do processo. O processo de separação através da extração líquido-líquido é um dos principais procedimentos empregados na indústria química. No entanto, a aplicação desta técnica em processos de purificação de proteínas apresenta inúmeras limitações: perda da atividade enzimática, seletividade ou capacidade de englobamento insuficiente, dentre outras (Aires-Barros *et al.*, 1991).

Existem inúmeras definições para a formação de um sistema micelar reverso. Estas definições buscam descrever o mais apropriadamente possível a formação destes agregados. A estrutura de uma micela reversa consiste basicamente em uma micro-região formada pelas cabeças polares do tensoativo, sendo que esta região interage com um meio solvente orgânico (não polar) através das cadeias hidrofóbicas lineares ou ramificadas do tensoativo (Carvalho e Cabral, 2000).

A região polar das micelas reversas tem a capacidade de solubilizar quantidade significativa de água, sendo esta quantidade dependente das propriedades físico-químicas do sistema. Enzimas podem ser microencapsuladas por micelas reversas, localizando-se usualmente no interior da micro-região aquosa conforme constatado por Hasmann *et al.*,

2003 na extração de β -xilosidade por micelas reversas de CTAB. No entanto, o grau de interação enzima-micela reversa é variável, podendo estar a enzima localizada junto às partes hidrofóbicas do tensoativo (Hasmann *et al.*, 2001).

As definições de micelas reversas descrevem o agregado e seus componentes, porém não deixam claro serem micelas reversas estruturas dinâmicas as quais podem alterar os constituintes incluindo o conteúdo de água, tensoativo e outros. A manutenção desta estrutura se deve a diversas forças, entre elas interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, sendo que a fluidez das micelas reversas é permanente desde que nenhuma ligação química covalente seja formada (Carvalho e Cabral, 2000).

Os processos de troca ocorrem entre duas micelas ou entre cada micela e o meio solvente orgânico. Após a colisão de duas micelas, sua coalescência ocorre através da formação de uma estrutura transitória que permite a rápida troca de material (Luisi *et al.*, 1985).

Uma vez solubilizados, enzimas, co-tensoativos, substratos ou produtos, induzem a mudanças estruturais nas micelas reversas, principalmente no tamanho e conteúdo de água afetando ambos, micelas reversas e biomoléculas encapsuladas (Luisi *et al.*, 1985). Estes autores consideram que todas estas propriedades dinâmicas tornam complexa uma definição absoluta para sistemas micelares reversos considerado complexo. Todavia, estudos desenvolvidos por inúmeros grupos de pesquisa buscam esboçar um padrão geral que explique não somente a estrutura (FIGURA 01), mas também os fatores que influenciam ambos, micelas reversas e as biomoléculas envolvidas no processo de extração.

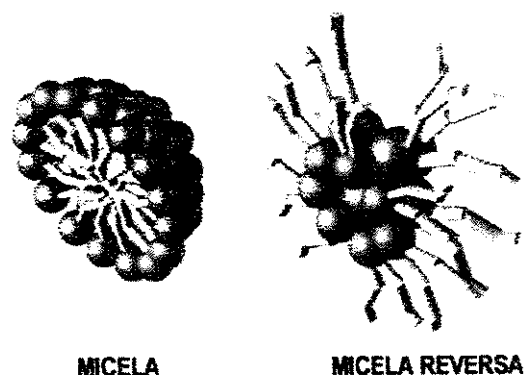


FIGURA 01 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UMA MICELA E DE UMA MICELA REVERSA (ADAPTADO DE www.chic.ac.uk).

2.2 - Tensoativos

Agentes de superfícies ativas, comumente designados como tensoativos, consistem de moléculas anfifílicas que possuem uma porção não polar e outra polar com capacidade de interagir com superfícies.

Substâncias tensoativas são ingredientes importantes em muitos produtos industrializados e possuem um papel de destaque em vários processos industriais. Tensoativos naturais ou sintetizados em laboratório encontram uso em quase todos os ramos da produção industrial, como por exemplo, nas indústrias: de alimentos, químicas, têxteis, de corantes, de tintas, de fibras, de processamento mineral, de plásticos, de produtos farmacêuticos e agroquímicos. Substâncias tensoativas são também vitais em muitos sistemas biológicos.

Estudos de autoconstrução e auto-organização de moléculas tensoativas são importantes tanto do ponto de vista teórico quanto prático, uma vez que os modos de ação dessas substâncias dependem dos seus estados de agregação em várias situações práticas,

tais como: em detergência, emulsificação, na recuperação de petróleo, em biologia celular, entre outros (Brandão, 1999).

Estudos destas substâncias e suas agregações abrem perspectivas que permitem o desenho e a síntese de novos produtos (novos fluidos complexos) os quais se autoconstruam e se auto-organizem em fluidos funcionais previamente projetados, possibilitando o aparecimento de novas aplicações tecnológicas (Brandão, 1999).

Na FIGURA 02 pode-se visualizar as diferentes formas que as micelas podem apresentar:

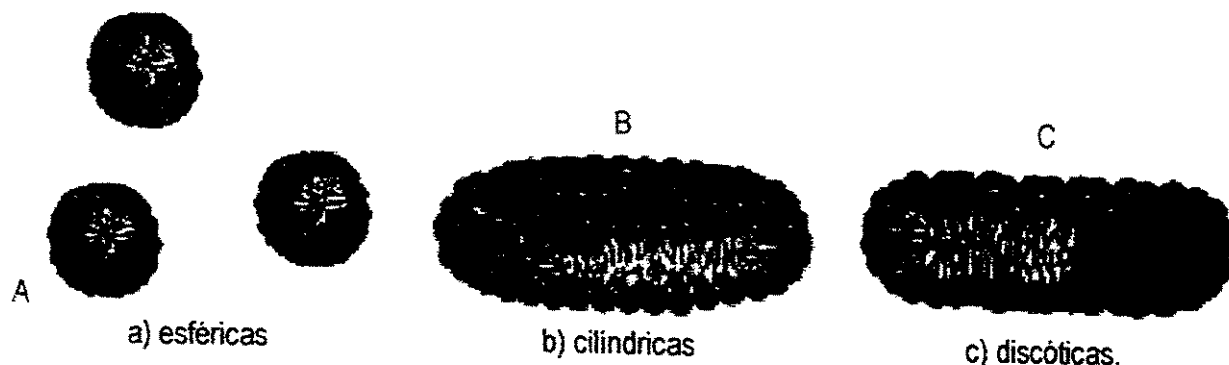


FIGURA 02 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MICELAS DOS TIPOS ESFÉRICAS, CILÍNDRICAS E DISCÓTICAS (BRANDÃO, 1999).

Segundo Brandão (1999) substâncias tensoativas quando diluídas em água, inicialmente tendem a formar pequenos agregados denominados micelas. Acima de uma certa temperatura (denominada de ponto “Kraft”), e uma determinada concentração (concentração micelar crítica, CMC) esses agregados podem assumir diferentes formas, tais como: esférica, cilíndrica (também denominada bastonete) ou discótica (FIGURA 02). A

topologia dos agregados depende, além da natureza da molécula anfifílica (aniônico, catiônico, neutro ou zwitteriônico), das condições da solução (concentração, temperatura, pH, condutividade, entre outras).

Este autor afirma que em condições de equilíbrio termodinâmico, uma área superficial ótima a_0 , onde a energia de interação por molécula anfifílica atinge um mínimo, considera-se que cadeias hidrocarbônicas se comportam como fluidos incompressíveis (ou seja, que seu volume v é constante a uma temperatura fixa). Desta forma é possível se definir um parâmetro adimensional denominado “parâmetro de empacotamento crítico” como $v / a_0 l_c$, onde l_c é o comprimento efetivo máximo da cadeia, também conhecido como comprimento crítico. Uma vez especificado o valor desse parâmetro para uma dada molécula anfifílica, é possível se determinar os tipos de agregados nos quais ela poderá se organizar.

De acordo com Brandão (1999), essas estruturas são freqüentemente formadas pela mesma molécula anfifílica, sendo que uma transição de uma forma para outra é muitas vezes induzida por uma simples mudança na concentração do tensoativo em solução (FIGURA 03).

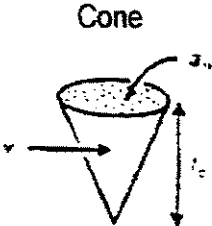
Tensoativo	Parâmetro de empacotamento Crítico (v/a_0l_c)	Forma do empacotamento Crítico	Estruturas formadas
Tensoativos de cadeia simples com áreas de cabeça polar grande (ex: SDS em presença de baixos teores de sal)	$< 1/3$	Cone 	Micelas esféricas 
Tensoativos de cadeia simples com áreas de cabeça polar pequena (ex: SDS em presença de altos teores de sal)	$1/3-1/2$	Cone truncado 	Micelas cilíndricas 
Tensoativos de cadeias duplas com áreas de cabeça polar grande (ex: fosfatidilcolina)	$1/2-1$	Cone truncado 	Bicamadas flexíveis, vesículas 
Tensoativos de cadeias duplas com áreas de cabeça polar pequena (ex: fosfatidiletanolamina)	$=1$	Cilindro 	Bicamadas planares 
Tensoativos de cadeias duplas com áreas de cabeça polar pequenas (ex.: fosfatidiletanolamina)	>1	Cone truncado invertido 	Micelas reversas 

FIGURA 03 – REPRESENTAÇÃO DAS FORMAS DE EMPACOTAMENTO CRÍTICO E ESTRUTURAS FORMADAS PARA DIFERENTES TENSOATIVOS (BRANDÃO, 1999).

Para escolha do agente tensoativo num processo de extração de proteínas deve-se levar em conta o valor de seu ponto isoelétrico e o tamanho da micela desejada. Os agentes tensoativos são classificados de acordo com a carga de sua parte polar, dividindo-se em neutros ou zwitteriônicos, aniônicos e catiônicos.

Na grande maioria dos trabalhos de extração de biomoléculas citados na literatura, tem-se utilizado o agente tensoativo aniônico AOT (Patel *et al.*, 1996; Regalado *et al.*, 1996; Zamarro *et al.*, 1996; Huang e Lee, 1994; Hentsch *et al.*, 1992; Aires-Barros *et al.*, 1991), que é adequado para separação de proteínas de elevado ponto isoelétrico. No entanto, para proteínas de baixo ponto isoelétrico, são recomendados agentes tensoativos catiônicos como CTAB e BDBAC (Aires-Barros *et al.*, 1991), sendo que este último teve sua produção interrompida pela Merk® devido a problemas de estabilidade da matéria-prima.

2.2.1 – Tensoativos Aniônicos

Agentes tensoativos aniônicos possuem um ou mais grupos funcionais que ionizam em solução aquosa, formando íons orgânicos carregados negativamente, responsáveis pela atividade de superfícies.

São representantes deste grupo os seguintes tensoativos (Maniasso, 2001):

- Lauril sulfato de sódio (SDS)
- Bis(2-etilhexil)sulfosuccinato (AOT)
- Dihexadecil fosfato (DHF)

2.2.2 – Tensoativos Catiônicos

Estes agentes são possuidores de um ou mais grupos funcionais que ionizam em solução aquosa, e formam íons orgânicos carregados positivamente.

Um tensoativo catiônico possui em geral a fórmula $R_nX^+Y^-$, onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X é um elemento capaz de formar uma estrutura catiônica, Y é um contra íon e n um número inteiro. Em princípio, X pode ser um dos seguintes elementos: N, P, S, As, Te, Sb, Bi e os halogênios (Sauders, 1966, Attwood *et al.*, 1970).

São exemplos deste grupo os seguintes agentes tensoativos (Maniasso, 2001):

- Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)
- Cloreto de N-benzil-N-bis(2-hidroxi etil) amônio (BDBAC)
- Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)
- Cloreto de cetilpiridina (CICP)

2.2.3 – Tensoativos Neutros ou Zwitteriônicos

Os tensoativos neutros ou não iônicos, não produzem íons quando em solução. A presença de grupos funcionais com grande afinidade pela água proporciona sua solubilidade. Maniasso (2001) classifica como neutros os seguintes tensoativos:

- Polioxietileno
- P-tercotil fenol (Triton S-100)
- Dodecanol (brij 35)

Os tensoativos zwitteriônicos (ou anfóteros) os quais possuem ambos os grupos aniônicos e catiônicos no meio hidrofóbico, e dependendo do pH da solução e da estrutura, pode prevalecer a espécie aniônica, catiônica ou neutra. Os representantes mais comuns

incluem em suas fórmulas os radicais N-alquil e C-alquil betaína e sultaína como também álcool amino fosfatidil e ácidos. Dentre os tensoativos zwitteriônicos destaca-se a lecitina de soja, um semilíquido viscoso de cor marrom com odor característico, parcialmente solúvel em água e acetona; solúvel em clorofórmio e benzeno (Maniasso, 2000).

As propriedades funcionais das lecitinas são determinadas pela estrutura dos seus principais componentes, os fosfolipídios e fosfo-diéster. Os fosfolipídios basicamente são radicais de ácidos graxos não polares e, portanto, lipofílicos, enquanto que o fosfo-diéster é um *zwitterion* (radical bi-polar). Este balanço hidrofílico/lipofílico confere às lecitinas propriedades tensoativas.

As lecitinas apresentam todas as funções comuns aos tensoativos, além de propriedades específicas, tais como a capacidade de atuar como emulsionantes em sistemas água/óleo ou em óleo/água, dependendo do meio e do tipo de lecitina utilizada (Brandão, 1999).

Segundo Brandão (1999), a lecitina ou fosfatidilcolina, é um tensoativo do tipo fosfolipídico de cadeia dupla (zwitteriônico). Porém, por diversos autores é denominado como neutro (Castro e Cabral, 1988; Krei e Hustedt, 1989; Meyer, 1992).

Segundo Solomons (1996), a maioria dos fosfolipídios é obtida de um derivado do glicerol, o ácido fosfatídico, onde dois grupos hidroxila do glicerol unem-se por uma ligação éster e ácidos graxos e um grupo hidroxila terminal une-se, por ligação éster, ao ácido fosfórico.

2.3 – Microambiente Micelar Reverso

2.3.1 – Métodos de Microencapsulação de Biomoléculas

Matzke *et al.*, (1992) demonstraram a existência de três diferentes métodos pelos quais biomoléculas podem ser solubilizadas em sistemas micelares reversos. No entanto, o mecanismo de solubilização para estas técnicas não é bem entendido. Biomoléculas em geral podem ser microencapsuladas em micelas reversas por: injeção, dissolução e transferência de fase.

Segundo Matzke *et al.*, (1992) dos métodos citados a injeção é o método mais aplicado na microencapsulação de enzimas devido principalmente à simplicidade de sua execução. Consiste da adição de uma solução contendo proteínas a uma fase orgânica contendo tensoativo seguido da mistura e posterior centrifugação.

A dissolução consiste da adição de enzima liofilizada à solução de micelas reversas. Este método, no entanto, consome mais tempo para ser executado que a injeção, contribuindo de maneira significativa na desativação das enzimas (Carvalho e Cabral, 2000).

Em contrapartida, o método da transferência de fase apresenta como problema a necessidade do controle da razão molar de água na micela e a necessidade de tempos maiores para a solubilização de enzimas, ele consiste da mistura e posterior centrifugação de uma fase aquosa contendo proteína a uma fase orgânica contendo tensoativo.

A capacidade de solubilização das micelas reversas é dependente do método de adição da biomolécula ao sistema micelar. Matzke *et al.*, (1992), averiguaram que a dissolução da enzima seca não resultou em apreciáveis valores de microencapsulação a

menos que o diâmetro da micela reversa obtida fosse similar ou maior que o diâmetro da biomolécula. Estes autores verificaram ainda que, utilizando o método de injeção a dependência do encapsulamento para com o tamanho micelar não é muito evidente.

2.3.2 – Modelos de Microencapsulação e Localização de Biomoléculas

As interações entre proteínas e micelas reversas possuem um mecanismo bastante complexo. De acordo com a literatura este mecanismo pode ser explicado de diferentes maneiras: trocas micelares, difusão e ainda a teoria que as micelas reversas se formam ao redor das biomoléculas e não no ambiente orgânico.

Martinek *et al.*, (1989), descreveram três modelos básicos para as interações de biomoléculas-micelas reversas demonstrado na FIGURA 2.3.2.1: “water-shell”, “induced-fit” e “fixed-size”.

O modelo “water-shell” (FIGURA 04 -1), considera que a micela reversa tem seu tamanho aumentado com o encapsulamento da biomolécula, o que implicaria em a quantidade de água no interior das micelas reversas ser igual antes e após o encapsulamento. Este modelo foi suportado por estudos estruturais realizados por Meier *et al.*, (1984) que notaram existir um tipo de camada de água de hidratação nas micelas reversas, não implicando na manutenção do volume inicial de água.

O modelo descrito “induced-fit” (FIGURA 04 -2) , propõem serem os diâmetros das micelas reversas ampliados somente após o encapsulamento e se os diâmetros da biomolécula forem superiores ao da micela reversa. Em contrapartida o “fixed-size” (FIGURA 04 -3), considera que a encapsulação ocorre quando as micelas reversas possuem

tamanho correspondente ao da biomolécula, sendo que a água é expulsa pelo englobamento da biomolécula.

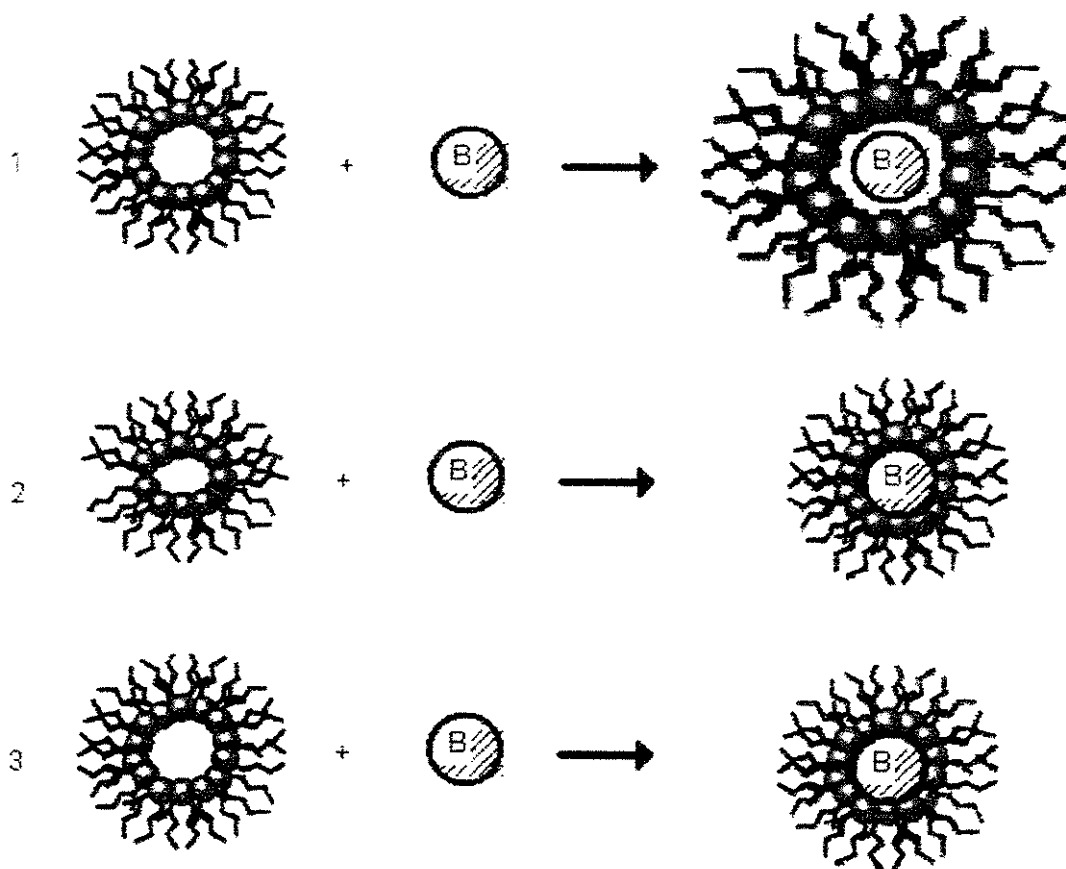


FIGURA 04 – MODELOS PARA MICROENCAPSULAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM MICELAS REVERSAS: 1, “WATER-SHELL”; 2, “INDUCED-FIT”; 3, “FIXED-SIZE” (ADAPTADO DE MARTINEK *et al.*, 1986).

2.3.3 – Extração de Biomoléculas por Micelas Reversas

A recuperação de biomoléculas de uma solução aquosa usando micelas reversas é, a princípio, um método promissor. A solubilização de componentes biologicamente ativos em sistemas micelares reversos tais como aminoácidos (Furusaki *et al.*, 1990), peptídeos

(Leodidis e Hatton, 1990), enzimas (Hasmann *et al.*, 1999; Hasmann *et al.*, 2000; Hasmann *et al.*, 2001) entre outros, tem sido amplamente estudada. Na verdade, a extração por micelas reversas trata-se de uma ampliação da técnica de biosseparação através da extração por solventes.

As vantagens e desvantagens do uso do processo de extração por micelas reversas são amplamente divulgadas na literatura. Algumas das vantagens mencionadas para o método são:

- Micelas reversas possuem uma estrutura relativamente ordenada (Martinek *et al.*, 1989);
- As micelas reversas se formam espontaneamente atingindo o estado de equilíbrio rapidamente (Martinek *et al.*, 1989);
- Micelas e micelas reversas são reconhecidas como estruturas biológicas (Carvalho e Cabral, 2000);
- Podem-se solubilizar tanto produtos/substratos hidrofóbicos quanto hidrofílicos (Carvalho e Cabral, 2000);
- Processos de síntese são favorecidos devido às trocas no equilíbrio termodinâmico (Martinek *et al.*, 1989);
- Contaminação microbiana é minimizada (Carvalho e Cabral, 2000);
- Os processos de troca entre as micelas são rápidos (Carvalho e Cabral, 2000);
- É possível a concentração de enzimas quando extraídas por micelas reversas (Hasmann *et al.*, 2001);
- O controle de quantidade de água e cavidade interna micelares é relativamente simples (Walde e Luisi, 1989);

- As soluções são isotrópicas (opticamente transparentes) permitindo o uso de várias técnicas espectroscópicas para monitoramento das estruturas (Walde e Luisi, 1989);
- Possibilidade de extração em sistema contínuo (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1996; Rodrigues e Tambourgi, 2001).

As desvantagens no emprego do método são menores e incluem: efeito desnaturante do tensoativo, a obtenção de baixos valores de W_0 (grau de hidratação) torna-se difícil quando são usadas enzimas não liofilizadas e talvez a principal desvantagem, o uso dos produtos obtidos ainda apresenta dificuldade.

O ciclo de operação da extração por sistemas micelares reversos é composto basicamente por dois estágios: extração e reextração (Killikian *et al.*, 2000). A primeira etapa é denominada extração e visa transferir a proteína, da fase aquosa para a fase micelar; a segunda etapa, a reextração, consiste da transferência da proteína para uma nova fase aquosa. A FIGURA 05 ilustra a etapa de extração descrita.

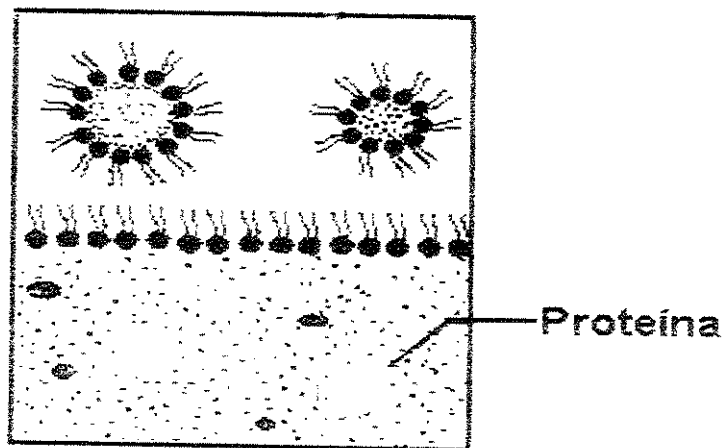


FIGURA 05 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO EM SISTEMAS MICELARES REVERSOS.

O mecanismo de formação das micelas reversas não está totalmente elucidado. No entanto, a teoria mais aceita descreve a formação da micela reversa como um mecanismo cooperativo entre proteína e tensoativo: a interface entre as duas fases (aquosa e micelar) se deforma em torno da proteína formando a micela e transferindo-a para a fase orgânica, conforme ilustrado na FIGURA 06 (Dungan et *al.*, 1991). A interação eletrostática provocada pela ação da força iônica e pH tem sido sugerida com um dos fatores que causam a deformação da interface.

A EQUAÇÃO 01, da força eletrostática, auxilia no entendimento do mecanismo de formação de micelas reversas:

$$F_e = \pi - \frac{1}{2} \epsilon E^2 \qquad \text{EQUAÇÃO 01}$$

Onde: F_e = força eletrostática

π = pressão osmótica

ϵ = constante dielétrica

E = campo elétrico

Quanto mais distante a proteína estiver da interface micelar, maior será a diferença de potencial entre elas, uma vez que a carga da proteína é oposta à do tensoativo. Assim, será maior também o segundo termo da equação ($\frac{1}{2} \epsilon E^2$), aumentando a força de atração e fazendo com que a proteína se aproxime da interface (FIGURA 06-a). Devido à aproximação entre proteína e tensoativo, a concentração de cargas opostas aumenta e com isso ocorre a elevação da pressão osmótica do núcleo aquoso, que age em sentido contrário ao da força eletrostática (FIGURA 06-b). Este fenômeno faz com que haja ruptura da

interface e, conseqüentemente, deslocamento da micela reversa formada em direção à fase orgânica (FIGURA 06-c). Desse modo, a superfície interfacial é atraída para junto da proteína, fechando a micela reversa (FIGURA 06-d).

As tensões superficiais juntamente com a força eletrostática tendem a resistir às deformações das camadas superficiais e, portanto, a interface deforma até que a tensão superficial e a força eletrostática fiquem equilibradas (Dungan *et al.*, 1991).

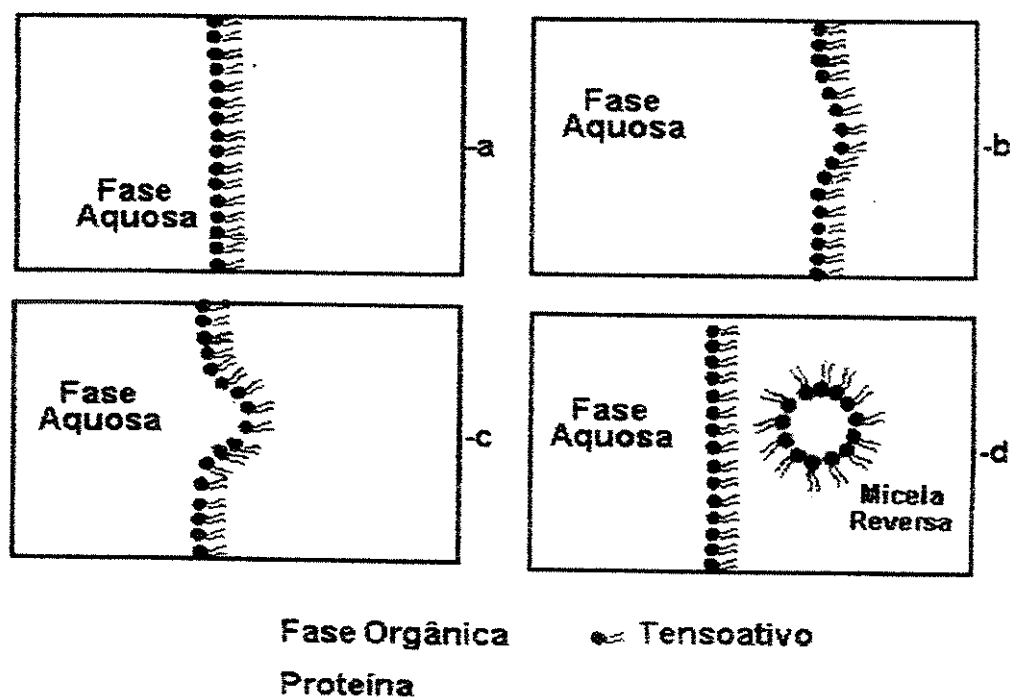


FIGURA 06 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DE MICELAS REVERSAS
(ADAPTADO DE DUNGAN *et al.*, 1991).

A localização da proteína no interior da micela reversa depende da natureza da proteína e do tipo de tensoativo. Existem inúmeros possíveis modelos que visam ilustrar a absorção

de proteínas pelas micelas reversas. As diferentes situações são descritas a seguir e ilustradas na FIGURA 07 (Luisi *et al.*, 1988):

- a) Situação I: Proteínas hidrofílicas estariam localizadas no centro micelar;
- b) Situação II: Molécula de proteína ativa pode interagir fortemente com a parede da micela reversa;
- c) Situação III: Proteínas hidrofílicas localizadas no centro micelar solubilizadas juntamente com outras proteínas contaminantes;
- d) Situação IV: Grande número de micelas reversas solubilizando uma proteína com caráter predominantemente hidrofóbico (proteínas localizadas em contato com a cauda do tensoativo e até mesmo com o solvente);
- e) Situação V: Várias micelas reversas englobando diversas proteínas.

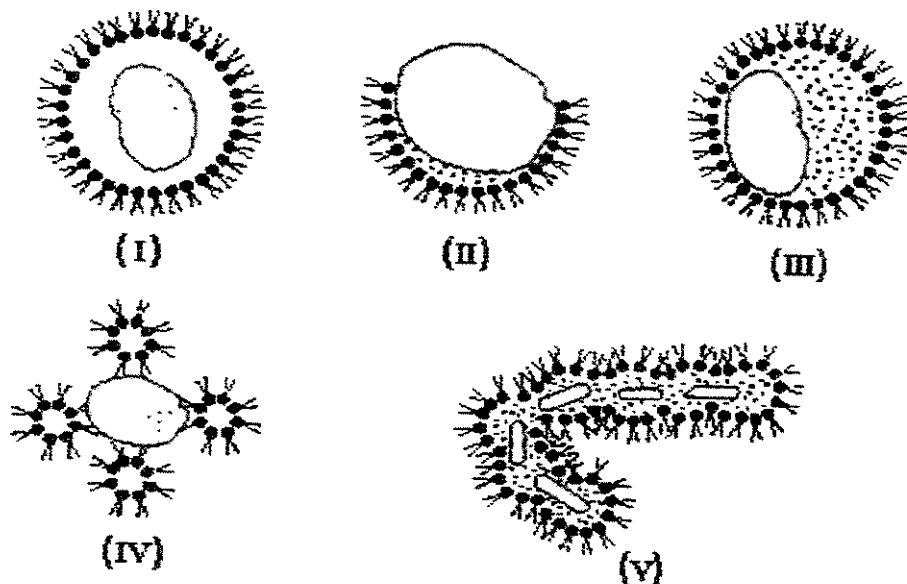


FIGURA 07 – TIPOS ENGLOBAMENTO DE PROTEÍNAS POR MICELAS REVERSAS (LUISI *et al.*, 1988).

2.3.4 – Fatores Determinantes na Extração de Biomoléculas por Micelas Reversas

a) W_0 e Grau de Hidratação

O grau de hidratação das micelas reversas é comumente representado pelo parâmetro W_0 . O valor ótimo do W_0 depende de vários aspectos. Um deles retrata ser o W_0 ótimo aquele correspondente a um tamanho micelar comparável ao da biomolécula. Martinek *et al.*, (1989) encontraram uma relação direta entre o raio efetivo da enzima encapsulada e o correspondente tamanho do núcleo micelar, o qual é regido pelo parâmetro W_0 .

O estudo das propriedades físicas da água no centro aquoso provou que estas são bem diferentes das propriedades da água no meio de solução. A micela reversa seria formada por três regiões: uma primeira região formada pelas caudas hidrofóbicas das moléculas do tensoativo, que fica em contato direto com o solvente apolar, a segunda região é a periferia micelar, onde as moléculas de água estão fortemente ligadas aos núcleos polares do tensoativo e, por fim, a terceira região, o centro micelar, formada pela água contida no interior da micela que está ligada ao tensoativo ou água livre. A FIGURA 08 ilustra a composição de uma micela reversa.

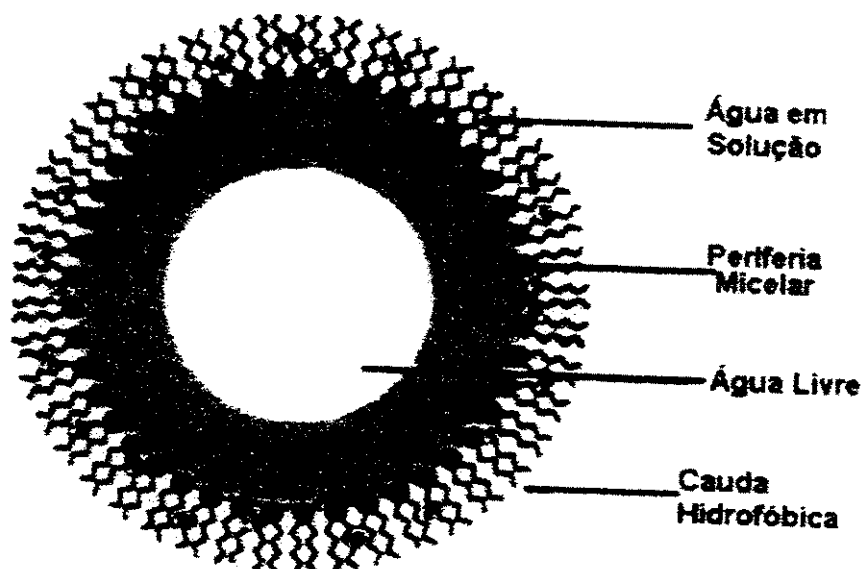


FIGURA 08 – COMPOSIÇÃO DE UMA MICELA REVERSA (ADAPTADO DE SEOUD *et al.*, 1999)

A água que fica na periferia micelar possui propriedades físico-químicas diferentes da água em solução, principalmente em micelas de diâmetro pequeno, uma vez que suas moléculas se ligam fortemente ao tensoativo, alterando a estrutura e viscosidade. Por sua vez, a água do centro micelar tem propriedades semelhantes às da água, pois essa está livre e, portanto, não teve sua estrutura modificada; tal característica é importante visto que a água do centro micelar entra em contato com a substância de interesse (Luisi *et al.*, 1988; Kadam, 1986).

Ress *et al.*, (1995) estudando as propriedades físico-químicas das diferentes águas, constataram que para baixos valores de W_0 a água livre apresentou um ponto de congelamento a temperatura abaixo de zero, permitindo aplicações em crioenzimologia.

Goto *et al.*, (1992) por sua vez estudaram a solubilização de água em micelas reversas de AOT, classificando-na como imobilizada, de hidratação e água livre. De acordo com estes autores, para valores de W_0 menores que 2, somente existiria água imobilizada, todavia numa faixa de W_0 de 4 a 10 a água hidrata as cabeças polares de AOT e finalmente na presença de água livre foi verificado valores de W_0 acima de 10 (FIGURA 09).;

Apesar da necessidade do valor do parâmetro de W_0 (e, portanto o tamanho micelar) ser compatível ao da biomolécula, estudos revelaram ser as micelas reversas capazes de se rearranjarem para acomodar a proteína cujas dimensões sejam maiores que o centro aquoso. Esta capacidade se deve a possibilidade de rearranjo das cadeias do tensoativo (Gupte *et al.*, 1995).

O mecanismo de interação proteína-micela reversa pode ser afetado pelo W_0 (FIGURA 09), as interações com o tensoativo são algumas vezes, responsáveis pela desnaturação da proteína. Valores baixos de W_0 favoreceriam problemas de desnaturação devido à promoção de uma maior interação entre a proteína e a interface em um reduzido conteúdo de água.

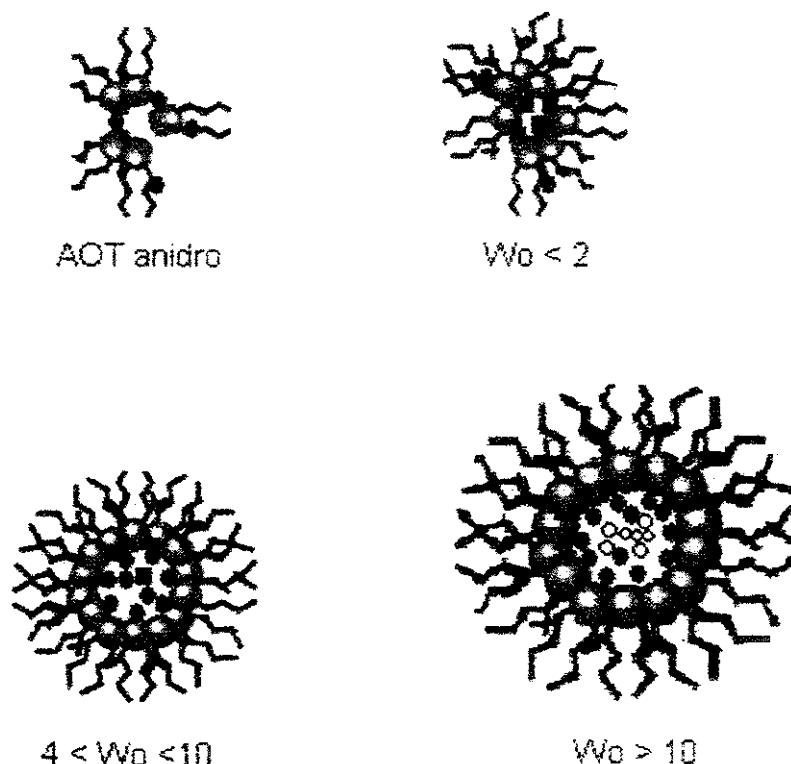


FIGURA 09 - EFEITO NO AUMENTO DA QUANTIDADE DE ÁGUA EM MICELAS REVERSAS DO AGENTE TENSOATIVO ANIÔNICO AOT, ONDE: ÁGUA IMOBILIZADA ■; ÁGUA DE HIDRATAÇÃO • E ÁGUA LIVRE ○. (ADAPTADO DE GOTO, *et al.* (1995))

O conceito de W_0 é usualmente associado somente com o grau de hidratação, no entanto, é dependente de outra variável: a concentração do tensoativo. Quando o tensoativo interage com a enzima, o processo de desnaturação é acelerado, o que ocorre com tensoativos aniônicos (Rangel-Yagui, 2003). Desta forma é razoável considerar o conteúdo de água e a concentração de tensoativo como variáveis independentes, visto que os mesmos valores de W_0 podem ser obtidos com diferentes combinações dos dois fatores. A FIGURA 10 mostra como estas diferentes combinações podem ocorrer: mantendo-se a concentração

de água constante e aumentando-se a concentração do tensoativo, observa-se uma diminuição no tamanho da micela. Ao contrário, adicionando-se água e mantendo-se constante a concentração do tensoativo o tamanho das micelas aumenta.

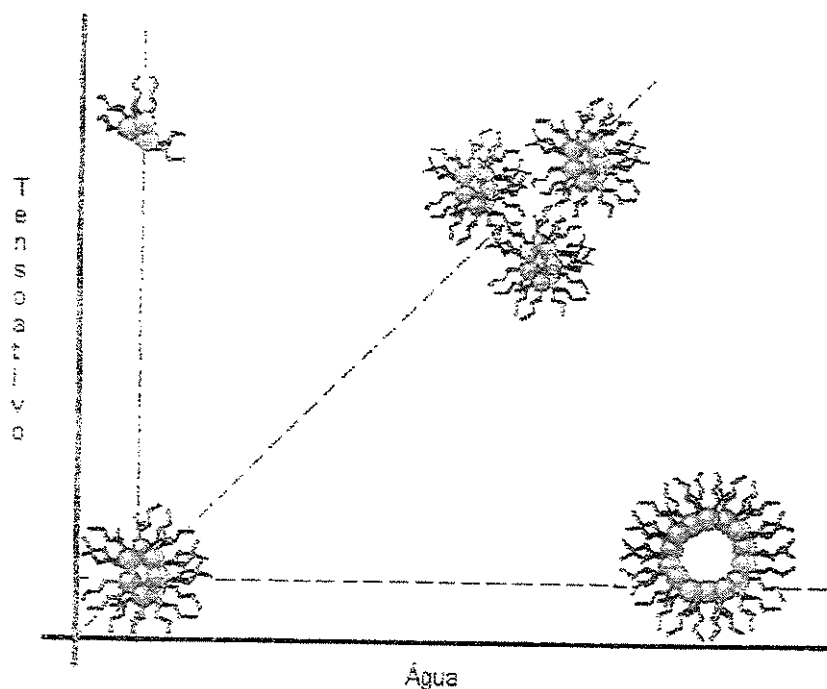


FIGURA 10 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGUA E TENSOATIVO EM SISTEMAS MICELARES REVERSOS.

b) pH

É sabido que o comportamento das enzimas é dependente do pH da solução: Esta variável determina a rede de cargas da proteína, influenciando o estado de ionização dos grupos eletricamente carregados em sua superfície. Quando se usam soluções com valores de pH inferiores aos do ponto isoeletrico da proteína, esta apresentará carga líquida positiva. De modo oposto, em valores de pH acima do ponto isoeletrico (pI) da proteína

esta apresentará carga líquida negativa. Segundo Asenjo (1990), o pH de uma solução também afeta as características de solubilização das proteínas, pois modifica não somente a distribuição de cargas na sua superfície, mas também causando repulsão eletrostática e inibição da transferência de proteínas para o interior da micela reversa.

No microambiente micelar a medida do pH não é tecnicamente possível, no entanto a idéia que o pH inicial da solução tamponada mude com a formação micelar é amplamente difundida.

Para que o encapsulamento da proteína ocorra através das interações eletrostáticas é necessário que exista a diferença de cargas entre esta e o tensoativo. Desta forma, tensoativos aniônicos atrairiam proteínas em soluções cujo pH seja inferior ao seu pI, e o inverso para catiônicos (Castro e Cabral, 1988, Dekker *et al.*, 1989). No entanto, tal comportamento não foi observado, por exemplo, por Pires *et al.* (1996), que em trabalhos de extração de α -quimiotripsina (que possui pI = 8,3) e pepsina (pI < 1,1) utilizando em ambos os casos TOMAC (tensoativo catiônico). A explicação dos autores para tal fato consistiu na existência de íons em solução aquosa que exerceriam maior influência que o pH.

Para β -xilosidase, Hasmann *et al.*, (1999 e 2000) observaram valores semelhantes de recuperação para enzima tanto extraída por CTAB quanto por BDBAC utilizando valores de pH acima e abaixo do pI da enzima, respectivamente para cada um destes tensoativos catiônicos empregados. Neste caso, as extrações ocorreram tanto por interações eletrostáticas quanto por forças hidrofóbicas.

Via de regra, para proteínas de elevada massa molar, a diferença entre o pH da fase aquosa e o seu pI deve ser suficiente para obter uma transferência de massa satisfatória. No

entanto, para proteínas de menor massa molar, não existe esta necessidade, uma vez que serão solubilizadas mesmo quando o valor do pH estiver próximo ao do pI da enzima. O pH influi na transferência da proteína em função de sua massa molar, pois, para proteínas de massas molares elevadas, são necessárias micelas reversas maiores que a micela vazia, tornando o processo energeticamente desfavorável. Para viabilizá-lo, deve-se favorecer as interações eletrostáticas (entre proteína e tensoativo) através do aumento da densidade de cargas da proteína, o que ocorre com o aumento da diferença entre o pH e o pI. Assim, para proteínas menores, o tamanho necessário da micela também é menor, portanto não há a necessidade de uma diferença grande entre o pH e o pI.

c) Força Iônica

Quando se solubiliza proteínas e diversas outras moléculas, soluções tampão são usadas para constituir a fase aquosa do sistema. Como a transferência das proteínas para as micelas reversas depende das interações eletrostáticas entre a proteína e o núcleo tensoativo, a força iônica e o tipo de íon da fase aquosa são muito importantes, devido às cargas presentes na solução (Regalado *et al.*, 1994).

A força iônica, que pode ser expressa em termos de condutividade elétrica, controla a solubilização de proteínas no sistema micelar, pois o alcance da força eletrostática da micela depende da força iônica do meio. O aumento da concentração de íons no meio ocasiona uma redução na eficiência de transferência de proteínas pelas micelas, seguida de um enfraquecimento das trocas eletrostáticas entre as proteínas e as porções polares dos

tensoativos, e conseqüentemente diminuição da solubilidade das proteínas na micela (Krei e Hustedt, 1989; Hatton, 1987).

O efeito da força iônica sobre o processo de extração por micelas reversas tem sido amplamente discutido na literatura. Aires-Barros *et al.*, (1991), verificaram que na extração de lipase com micelas reversas, o aumento da força iônica da fase aquosa promoveu a diminuição das interações entre proteína e tensoativo conduzindo a formação de micelas reversas pequenas. De fato o aumento da salinidade promove a diminuição do tamanho da micela e diminuição das interações atrativas na área interfacial com as cabeças do tensoativo, devido à formação de uma interface mais rígida e menos penetrável (Hou *et al.*, 1988).

A adição de sais afeta as propriedades dos tensoativos em solução, o aumento da concentração de sais diminui o tamanho da área polar efetiva do tensoativo. Por outro lado, a diminuição na concentração de sais promove o “salting-out” do tensoativo das micelas para a fase orgânica devido ao caráter parcialmente hidrofóbico do tensoativo (Wang *et al.*, 1994).

d) Aditivos

Alguns aditivos são usados para aprimorar a capacidade de englobamento dos sistemas micelares. Seus efeitos sobre o encapsulamento de biomoléculas são variáveis. Alguns têm sido descritos como prejudiciais à atividade/estabilidade enquanto outros tendem a favorecer a atividade enzimática ou ainda promovem uma maior estabilidade da

atividade catalítica Carvalho e Cabral, (2000) consideraram estes aditivos como co-tensoativos, os quais podem aumentar ou diminuir o tamanho das micelas em microemulsões, dependendo de sua estrutura química.

Freeman *et al.*, (1998) noticiaram um aumento da atividade catalítica enzimática de quimotripsina em micelas reversas de AOT pela adição de sais biliares. Verificaram que este aditivo modificou as propriedades interfaciais do sistema aumentando a água do centro micelar, alterando tanto o microambiente catalítico quanto a estrutura da enzima, promovendo, assim, a organização dos agregados.

Sun *et al.*, (1999), desenvolveram um sistema micelar reverso composto de lecitina de soja na qual *Cibacron Blue* (CB) foi imobilizado com o intuito de se aumentar a solubilização de proteínas no sistema. O sistema sem este ligante apresenta baixa capacidade de solubilização de proteínas, por outro lado com a adição de CB promoveu-se um aumento de até 10 vezes na partição de lisozima, por esta enzima apresentar afinidade pelo ligante empregado.

Em estudos de partição de G6PDH em sistemas micelares em duas fases aquosas, utilizando o tensoativo C₁₀E₄, Rangel-Yagui (2003) concluiu ser pequeno o aumento no coeficiente de partição da enzima devido à presença de CB e “*Procion Red*” como ligantes de afinidade.

e) Solventes e co-solventes

Várias correlações têm sido estabelecidas entre os solventes e suas propriedades no tocante a mudanças em seu comportamento e estabilidade das enzimas.

O tamanho das micelas e as interações são afetados pelo solvente e diminuem com o crescimento da cadeia carbônica, alterando diretamente o W_0 . Alcanos de cadeia pequena são capazes de penetrar mais fortemente as camadas de tensoativo, ocasionando a redução da água solubilizada (Hou *et al.*, 1988).

O tipo de solvente pode também influenciar no tamanho da micela reversa. Sistemas com hexano, isooctano, octano e querosene formam micelas reversas com diâmetros maiores que sistemas com ciclo hexano, xileno e clorofórmio (Chang e Chen, 1996; Kadam, 1986). A diminuição da concentração do solvente pode ocasionar a redução na transferência de proteínas para o interior da micela reversa, prejudicando o processo de extração (Krei e Hustedt, 1992).

Para que haja a formação das micelas reversas é necessário que o solvente e a água sejam imiscíveis. Dos diversos solventes que podem ser usados nos sistemas de micelas reversas, os mais indicados são hidrocarbonetos alifáticos, como o isooctano, o n-octano, o n-heptano e o ciclo hexano (Rodrigues *et al.*, 1999; Hasmann *et al.*, 1999, Hasmann *et al.*, 2000).

No entanto, os efeitos do aumento e da diminuição da cadeia do solvente no sistema ainda não estão totalmente elucidados. A situação mais comumente observada quando solventes de cadeia longa são aplicados refere-se ao atraso das interações atrativas, embora

ocorra o aumento da densidade interfacial quando se aumentam as interações entre a interface micelar e o meio contendo as biomoléculas (Hays e Gualri, 1994).

Outra importante função para os solventes foi evidenciada nos trabalhos de Bachman *et al.*, (1991), onde se descreveram a auto-replicação de micelas pela transformação “*in situ*” do solvente.

Os co-solventes são utilizados como auxiliares em sistemas de micelas reversas de tensoativos catiônicos para aumentar o seu tamanho, pois micelas formadas por estas substâncias são muito pequenas. O co-solvente assemelha-se a uma solução tampão que provoca uma forte repulsão entre as interações íon-íon dos núcleos do tensoativo, permitindo a formação do núcleo interno da micela reversa (Luisi *et al.*, 1988). Geralmente utilizam-se, como co-solventes, álcoois de cadeias não muito curtas como hexanol e n-butanol (Hasmann *et al.*, 2003; Rodrigues e Tambourgi, 2000).

Os co-solventes também podem ter influência sobre as estruturas das micelas reversas, como é o caso da água solubilizada na micela reversa de TOMAC que sofre variação em função da quantidade de co-solvente do meio (Chang e Chen, 1996). Também a extração de α -amilase, utilizando Aliquat 336 mostrou-se sensível às variações no tipo de co-solvente utilizado no sistema alterando sua capacidade de extração (Hilhorst *et al.*, 1995).

f) Temperatura

A temperatura é também um fator de importância na absorção de proteínas por micelas reversas, dependendo desta a capacidade máxima de absorção das micelas reversas. Dentro de uma determinada faixa de temperatura, as micelas reversas são formações estáveis, o que favorece a absorção de moléculas. Segundo Luisi *et al.* (1988), a presença de enzimas no interior da micela a temperaturas mais elevadas vai depender mais da sua termoestabilidade do que da capacidade de absorção da micela. Sob temperaturas inferiores a uma faixa ótima, as micelas encolhem e perdem sua capacidade de absorção. Temperaturas elevadas afetam o coeficiente de partição do agente tensoativo, de modo que, praticamente, este não permaneça mais na fase orgânica e só seja encontrado na fase polar (Krei e Hustedt, 1989).

Pessoa e Vitolo (1998), em trabalhos de extração da enzima inulinase, também constataram que o tamanho da micela reversa é bastante dependente da temperatura e, na faixa de 5 a 45 °C, as micelas reversas, em solventes orgânicos, são formações estáveis e podem favorecer a absorção desta enzima.

Hasmann *et al.* (1999) por sua vez verificaram que de fato a influência da temperatura sobre os sistemas micelares reversos segue as mesmas regras que outros meios aquosos e não convencionais. Os autores verificaram que o processo de extração de β -xilosidade é melhorado pelo incremento da temperatura (neste caso até 26 °C), sendo de fundamental importância na definição, no tipo de arranjo encontrado naquela fase (micelas, micelas reversas, líquido cristalino ou outros) e, portanto a porcentagem de extração da enzima.

2.4 – A Enzima Alvo: Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

Glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) é a primeira enzima da via das pentoses. A G6PDH está amplamente distribuída pela natureza, sendo encontrada em quase todos os tecidos de origem animal, vegetal e de células de microorganismos. Encontra-se em grandes quantidades nas células sanguíneas, no fígado, nos rins, no cérebro, nos pulmões e na mucosa gástrica (Warburg e Christian, 1931).

Glicose-6-fosfato desidrogenase catalisa a oxidação de glicose-6-fosfato (G6P) para 6-fosfogluconolactona. Simultaneamente nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+) é reduzido a NADPH, como mostrado na FIGURA 11.

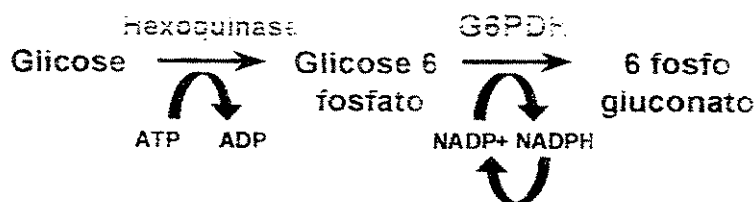


FIGURA 11 – PRIMEIRA ETAPA DA VIA DAS PENTOSSES.

2.4.1 – Principais Aplicações da G6PDH

2.4.1.1 – Aplicações clínicas

O mercado de enzimas para kits de diagnóstico movimenta cerca de US\$ 61 milhões por ano (TABELA 01) e a G6PDH (usada conjuntamente com a hexoquinase) ocupa lugar

de destaque entre as mais utilizadas. Esta enzima é responsável por 11,5 % do total financeiro movimentado no mercado mundial de enzimas (Godfrey e West, 1996).

TABELA 01 – MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS UTILIZADAS EM KITS DE DIAGNÓSTICOS

Enzima	Mercado Mundial (milhões de US\$)
Fosfatase alcalina	15
Peroxidade	15
Colesterol oxidase	8
G6PDH/ Hexoquinase	7
Glicose oxidase	5
Glutamato desidrogenase	2
Lactato desidrogenase	2
Malato desidrogenase	2
Piruvirato Quinase	2
Outras	3
Total	61

Clinicamente, enzimas encontradas nas hemácias sanguíneas apresentam grande interesse e têm sido extensamente estudadas (Zinkham, 1958; Yoshida, 1973; Beutler, 1978).

A deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em seres humanos é considerada a mais importante enzimopatia diagnosticada. Consiste de um erro inato do metabolismo que interfere nos processos de manutenção da estabilidade dos eritrócitos. A deficiência desta enzima favorece a ruptura da membrana dos glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos), levando à anemia hemolítica.

Os pacientes com deficiência de G6PDH podem apresentar sintomas a partir dos primeiros dias de vida ou mais tardiamente, desde que sejam expostos a alguns tipos de alimentos ou medicamentos. Muitos pacientes podem permanecer assintomáticos por muitos anos. Estes pacientes podem apresentar icterícia neonatal ou anemia hemolítica devido à incapacidade de regenerarem o NADPH, um cofator importante nos processos biológicos oxidativos. A anemia pode vir a se manifestar mais agudamente quando da ingestão do feijão de fava (daí a doença ser conhecida também como “favismo”), da ocorrência de infecções ou do uso de medicamentos como antimaláricos, antibióticos, analgésicos, antipiréticos, sulfonas e sulfonamidas. Em alguns pacientes, a icterícia neonatal é severa o suficiente para levar as seqüelas neurológicas ou a risco de óbito. Alguns pacientes podem apresentar insuficiência renal aguda ou anemia hemolítica crônica (Kaplan *et al.*, 1995). Este é um distúrbio genético de herança ligada ao cromossomo X, bastante heterogêneo, existindo mais de 400 mutações já descritas. Manifestações clínicas em mulheres não são incomuns (Luzzatto e Mehta, 1995).

A produção de NADPH (na via das pentoses) é essencial em várias rotas metabólicas, assim como na hemácia, para a estabilidade da catalase e preservação e regeneração da forma reduzida do glutathione. Como a catalase e o glutathione são essenciais

para a detoxificação do peróxido de hidrogênio, a defesa da célula contra este agente depende quase totalmente da G6PDH. Este processo é especialmente importante nos eritrócitos, que são células muito sensíveis ao dano oxidativo.

O diagnóstico precoce (através de triagem neonatal) e o tratamento adequado podem evitar o aparecimento de seqüelas ou o risco de óbito. Da mesma forma, depois de realizado o diagnóstico pode-se evitar o uso das drogas previamente conhecidas como hemolíticas. A detecção de portadores não é fácil, pois nas mulheres heterozigotas (as quais apresentam um gene normal e um gene alterado) se encontra grande variabilidade na atividade enzimática. Assim, pode ser realizado diagnóstico pré-natal, através da avaliação da atividade de G6PDH no sangue fetal (Neto *et al.*, 1999).

2.4.1.2 – Aplicações analíticas

A glicose-6-fosfato desidrogenase, é também utilizada em métodos analíticos (em associação a hexoquinase) para medida dos teores de glicose, frutose, manose, ATP (Boros *et al.*, 1987) e ainda na determinação da atividade enzimática de creatina-quinase (Bergmeyer, 1983). Esta enzima constitui ainda uma importante ferramenta para a indústria vinícola e de sucos, pois possibilita a determinação precisa de teores de glicose (adoçante adicionado ilegalmente) liberados após a hidrólise do amido destas bebidas. Esta determinação é eficiente mesmo na presença de frutose, pedaços de frutas, pigmentos, sacarose e outros polissacarídeos. (Whitaker, 1991; Chatel *et al.*, 1996).

2.4.1.3 – Aplicações na construção de biossensores

Eletrodos enzimáticos têm sido testados para aplicações ambientais como na detecção de fosfatos. Nestes sensores G6PDH está presente associada a outras enzimas (Parellada *et al.*, 1998).

Bassi *et al.*, (1999) desenvolveram um biossensor amperométrico onde G6PDH está imobilizada para uso na monitoração dos níveis de glicose-6-fosfato em eritrócitos humanos e em células de fígado de ratos. Esta detecção apresenta menor custo e consumo de tempo que os métodos tradicionalmente empregados (cromatografia e espectroscopia).

2.4.2 – **Preços Praticados pelo Mercado**

A purificação da G6PDH não consiste de uma inovação tecnológica, uma vez que o produto em questão é comercializado de diferentes fontes e atividades, até a sua forma mais pura. Os preços praticados pelo mercado são diversos:

- a) SIGMA COMPANY USA – de US\$ 65 a US\$ 400 (1000 unidades) dependendo do grau de pureza desejado;
- b) WORTHINGTON – de US\$ 24 a US\$ 380, variando com o número de unidades e pureza desejadas.

2.4.3 – Características Gerais da G6PDH

a) pH

Heyer e Woodward (2001), encontraram para G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* um valor de pH ótimo para a atividade catalítica de 7,8, valor idêntico ao encontrado por Özer *et al.*, (2002) para a enzima obtida de fígado de cachorro.

A G6PDH presente no extrato enzimático de células de *S. cerevisiae* mantém-se estável por até 5 horas quando estocada em valores de pH de 4,0 a 9,5 (Souza *et al.*, 2002). Decorrido este período, em pH 4,0 a perda da capacidade catalítica foi total enquanto que em valores de pH próximos a neutralidade ela apresentou-se suficientemente estável (mais que 51 horas);

b) Estabilidade a estocagem

Ribeiro (2001) em estudos da estabilidade da G6PDH em solução com inibidores de proteases a pH 7,5; verificou ser a enzima estável a temperatura ambiente até 25 horas, sendo que após este período houve um decréscimo em sua atividade catalítica de aproximadamente 50 %. No entanto, quando mantida a 4 °C, G6PDH manteve cerca de 80 % da sua capacidade catalítica por um período de 50 horas.

c) Massa molar

Diversas variantes para a massa molar da enzima foram descritas pela literatura, as diferenças podem ser elucidadas pela análise da mobilidade eletroforética, pela determinação das características cinéticas e pela especificidade pelo substrato. Cerca de

300 variantes da proteína são conhecidas muitas das quais possuem atividade catalítica deficiente.

A TABELA 02 mostra algumas massas molares determinadas para G6PDH encontradas na literatura.

TABELA 02 - MASSA MOLAR DE G6PDH DE FONTES DIFERENTES.

Fonte	Massa Molar (kDa)	Referência
Eritrócitos humanos	240	Severo, 1979
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	180	Ellison, 1997
<i>L mesenteroides</i> ⁽³⁾ ; <i>Aquifex</i> <i>aelicus</i>	110	Levy, 1988 Iyer <i>et al.</i> , 2002
Fígado de cachorro	105	Özer <i>et al.</i> , 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57,5	Zaitzeva <i>et al.</i> , 1997

A observação de diferentes massas molares para G6PDH de fontes diferentes e até mesmo para tecidos iguais, não é incomum. A massa molar é dependente do estado de agregação da proteína, que varia de dímero a hexâmero dependendo de fatores diversos tais como: concentração de NADP, concentração de sais e pH.

A FIGURA 12 representa a enzima G6PDH em três dimensões.

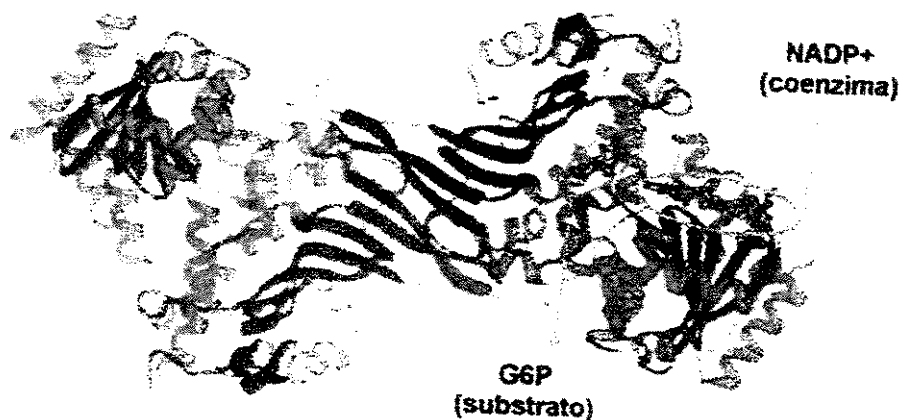


FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉLULAS DE *L. mesenteroides* (DÍMERO). O SUBSTRATO E A COENZIMA NADP^+ APARECEM LIGADOS AOS RESPECTIVOS SÍTIOS CATALÍTICOS (VOUGHT *et al.*, 2000).

2.5 – Perspectivas e Novas Tendências

Está mais que comprovado a bem sucedida atuação de sistemas micelares reversos em diversas operações biotecnológicas. Suas diferentes aplicações foram citadas na literatura por inúmeros autores, entre eles: Morgado *et al.*, (1996); Pessoa e Vitolo, (1997), Serralheiro *et al.*, (1999); Hasmann *et al.*, (1999); Cortez e Pessoa, (1999); Hasmann *et al.*, (2000); Carvalho *et al.*, (2000); Rodrigues e Tambourgi, (2001); Hasmann *et al.*, (2003).

No entanto, a aplicação industrial da técnica tem encontrado dificuldades no tocante a recuperação e reuso dos bioprodutos. Apesar do amplo espectro de utilização da técnica

de micelas reversas: purificação de proteínas, remoção de impurezas, biocatálise, dentre outras, existe muita dificuldade de se encontrar descrições industriais de casos. Desta forma, é de fundamental importância para o emprego industrial da técnica a operação em sistema contínuo no sentido de tornar os processos economicamente atraentes.

Outros fatores importantes a serem destacados são os obstáculos ambientais e de compatibilidade que a aplicabilidade da técnica encontra. O tensoativo mais estudado AOT, por exemplo, é altamente tóxico, impedindo sua utilização em fármacos e alimentos. Para buscar uma solução a estes problemas, estão sendo estudados os tensoativos naturais, ou biotensoativos, para aplicação em sistemas micelares na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos. Devido à complexibilidade da total remoção do tensoativo por mais sofisticada que seja a técnica empregada, tensoativos biocompatíveis representam um avanço, uma vez que os resíduos destes são toleráveis e não afetam a qualidade e objetivo do produto.

Os tensoativos sintéticos apresentam inúmeras desvantagens como as citadas anteriormente. No entanto, sua maior desvantagem se refere à falta de biodegradabilidade, acumula-se no ambiente sendo conseqüentemente um grande problema ambiental. No entanto, a utilização de tensoativos biocompatíveis é limitada devido a sua incapacidade de competir economicamente com os sintéticos.

Span® e Tween® tratam-se de derivados de açúcar utilizados como tensoativos e classificados como naturais. Tem-se ainda a produção de biotensoativos a partir de ácidos graxos e esteróis (Holmberg, 2001).

O termo tensoativo natural ou biotensoativo não é ambíguo, pode ser considerado tensoativo natural aquele obtido diretamente de fonte natural, sem que síntese orgânica seja envolvida nem mesmo como tratamento posterior (Holmberg, 2001). O melhor exemplo desta categoria é a lecitina obtida tanto de soja quanto de clara de ovo. No entanto, os exemplos não se restringem às lecitinas, pois processos fermentativos podem ser empregados na obtenção de biotensoativos a partir de bactérias e leveduras. Alguns exemplos de tensoativos naturais obtidos por fermentação podem ser citados: acilpoliois (como o éster de trealose), produzidos por *Mycobacterium*, *Corynebacterium* e *Brevibacterium* e glicolipídeos (como o soforolipídeo) produzido por *Candida sp.*

2.6 - Equipamentos Utilizados na Extração Líquido-Líquido

Ultimamente, em virtude da necessidade em se procurar alternativas mais viáveis economicamente para uma dada separação, a extração líquido-líquido vem sendo usada de maneira crescente. Isso se torna evidente pelo grande número de novos equipamentos desenvolvidos neste campo.

Alguns fatores que vêm estimulando o desenvolvimento da extração líquido-líquido são (Humphrey *et al.*, 1984):

- Perspectivas de economia de energia em comparação a destilação;
- Possibilidade de evitar a degradação de compostos, devido ao efeito da temperatura, que pode ser causada por processos que fazem uso de energia térmica;
- Desenvolvimento de equipamentos mais eficientes e que permitam um contato das fases líquidas mais efetivo;

- Melhor entendimento dos princípios para desenvolvimento, projeto e “scale-up” dos processos de extração.

No passado, as operações de extração líquido-líquido eram restritas a processos que utilizassem um pequeno número de estágios devido a elevada altura dos estágios teóricos associados a colunas gravitacionais que representava um alto investimento de capital, tornando o processo de extração bastante oneroso. Nas últimas décadas, contudo, novos projetos de extratores tipo coluna e tanques misturadores foram desenvolvidos possibilitando em vários casos considerar a extração líquido-líquido como alternativa para separações que requerem um grande número de estágios teóricos (Logsdail *et al.*, 1957). O desenvolvimento de novos equipamentos para efetuar extração líquido-líquido tem tornado este método mais competitivo com relação aos outros processos de separação existentes (Souza, 1997).

Para o desenvolvimento de equipamentos de extração líquido-líquido, são alvo de considerações fatores como (Steiner, 1988):

- O sistema de trabalho: solvente a ser usado, grau de pureza do refinado, condições de escoamento dos líquidos, entre outros;
- Dados de equilíbrio: são imprescindíveis, deverão estar disponíveis na temperatura de trabalho;
- Dados de transferência de massa.

Durante o processo de extração vários fenômenos acontecem no interior do extrator, alguns dos quais prejudicam a transferência de massa. Os mais conhecidos são definidos abaixo:

- “Hold up”: é a fração retida da fase dispersa, que é a razão do volume da fase dispersa pelo volume total do equipamento;
- Inundação: quando as condições de operação na coluna fazem com que seja impossível as correntes escoarem em contracorrente e uma fase se dispersar na outra. Nesta situação, as correntes entram e saem da coluna numa mesma extremidade;
- “Backmixing” (mistura axial): é o retorno axial da fase dispersa. A fase dispersa escoar em sentido oposto ao esperado. Ele faz com que o gradiente de concentração, que é a força motriz da transferência de massa na coluna, diminua, prejudicando a taxa de transferência de massa e a eficiência de separação;
- “Backflow”: é o retorno axial da fase contínua. Ocorre quando a fase contínua é carregada na direção oposta à esperada.

Num processo de extração, existem diversos fatores que influenciam o desempenho do extrator, principalmente em escala industrial. Portanto, é necessário um estudo em escala piloto para melhor definir as condições de operação.

A utilização de extratores verticais nos processos de extração líquido-líquido é justificado devido a esses equipamentos ocuparem pequena área, terem boa eficiência de separação e apresentarem facilidades de operação e manutenção.

Existem vários tipos de extratores que podem ser classificados de acordo com os princípios gerais de operação e construção. Vários autores dividiram os extratores em duas categorias, de acordo com o tipo de contato entre as fases em (Hanson, 1971):

- Sistemas de contato e separação de fases em estágios (descontínuos): estes sistemas são formados por uma série de estágios compostos por tanques

misturadores-decantadores, onde a solução e o solvente são misturados até serem atingidas às concentrações de equilíbrio em ambas as fases. Após isso deixa-se decantar a fase mais densa e, então, faz-se a separação das fases antes delas passarem ao próximo estágio. Nestes equipamentos, obtêm-se altas eficiências de separação em cada estágio. A desvantagem é o grande espaço físico que ocupam (FIGURA 13).

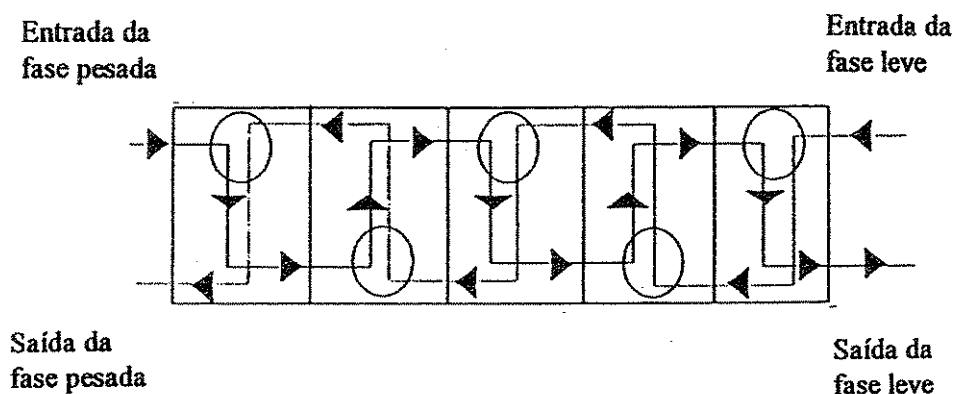


FIGURA 13 - EXEMPLO DE UM EXTRATOR EM ESTÁGIOS DISCRETOS.

- **Sistemas de contato diferencial (contínuos):** nos sistemas diferenciais, os líquidos escoam continuamente em contracorrente, sem misturadores ou decantadores intermediários, sendo que estes contadores são normalmente colunas verticais. O escoamento em contracorrente ocorre em função da diferença de densidade entre as fases. A fase mais densa é alimentada no topo e flui de maneira descendente no interior da coluna e a fase menos densa é alimentada na base e flui em direção ao topo da coluna. As colunas de contato diferencial são equipamentos mais compactos e ocupam um menor espaço físico que os misturadores-decantadores.

Esta categoria pode ainda ser subdividida de acordo com a maneira de se promover a mistura das fases, em:

- Colunas sem agitação mecânica e separação pela gravidade, como colunas de pratos perfurados fixos, colunas tipo Spray e colunas recheadas (FIGURA 14). Nestes equipamentos, a forma de promover o contato entre as fases e, portanto a transferência de massa é a ação da força gravitacional, devido à diferença de densidade entre as fases. São os mais simples dos extratores diferenciais usados na extração líquido-líquido. Apresentam baixo custo de instalação e manutenção e ocupam reduzido espaço físico. A principal desvantagem é a baixa eficiência de separação.

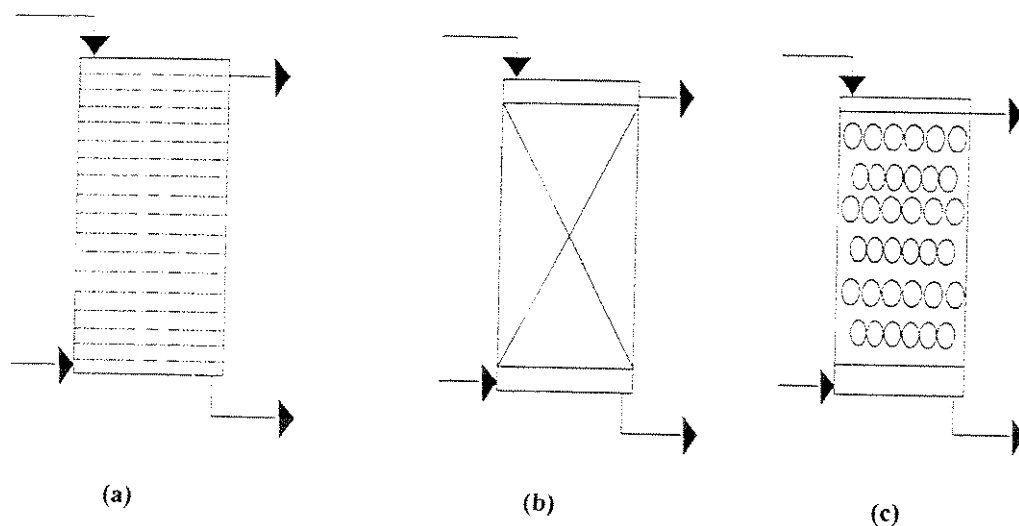


FIGURA 14 - EXEMPLOS DE COLUNAS QUE ATUAM SOB A FORÇA DA GRAVIDADE. (A) COLUNA DE PRATOS FIXOS PERFURADOS; (B) COLUNA RECHEADADA; (C) COLUNA SPRAY

- Colunas com agitação mecânica e separação pela gravidade, como coluna de discos rotativos (RDC), coluna de fluxo pulsado, coluna de pratos pulsados, coluna “Oldshue-Rushton”, coluna “Sheibel” e coluna Kuhni (FIGURA 15). Nestes extratores, além da força da gravidade, tem-se a ação da agitação causada mecanicamente que pode ser empregada através de pulsações ou sistemas rotativos. Nas colunas agitadas mecanicamente por meio de sistemas rotativos, a força da gravidade atua em conjunto com a energia introduzida por estes sistemas de rotação, que podem ser: discos rígidos ou perfurados, pás, turbinas, etc. O grau de dispersão, e, portanto, o grau de transferência de massa é bastante elevado em comparação aos equipamentos sem agitação mecânica.
- Contadores centrífugos, que utilizam a força centrífuga como força motriz para a transferência de massa. São de desenvolvimento mais recente e possuem alta eficiência de separação e ocupam pouco espaço físico. A desvantagem é o seu alto custo de implantação. São exemplos o extrator Podbielniak, Luwesta e de Laval.

A classificação dos equipamentos segundo Hanson (1971) pode ser observada na TABELA 03.

**TABELA 03 - CLASSIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS DE EXTRAÇÃO
SEGUNDO HANSON (1971)**

TIPO DE AGITAÇÃO	CONTATO COM	
	SEPARAÇÃO DE FASES	CONTATO CONTÍNUO
SEM AGITAÇÃO		-coluna Spray
		-coluna de chicanas
		-coluna recheada
		-coluna de pratos perfurados
APARELHO AGITADO POR ROTAÇÃO	-Holley-Mott	-coluna Sheibel
	-misturador-decantador simples	-coluna Oldshue-Rushton
	-misturador-decantador com bomba	-contador de discos rotativos
	-centrífuga de estágio individual	-coluna misturadora multi-estágio
	-misturador-decantador com pulsação	
COM PULSAÇÃO	-misturador-decantador com pulsação	-coluna recheada com pulsação
		-coluna de pratos perfurados pulsados
		-coluna de fluxo pulsado com pratos perfurados

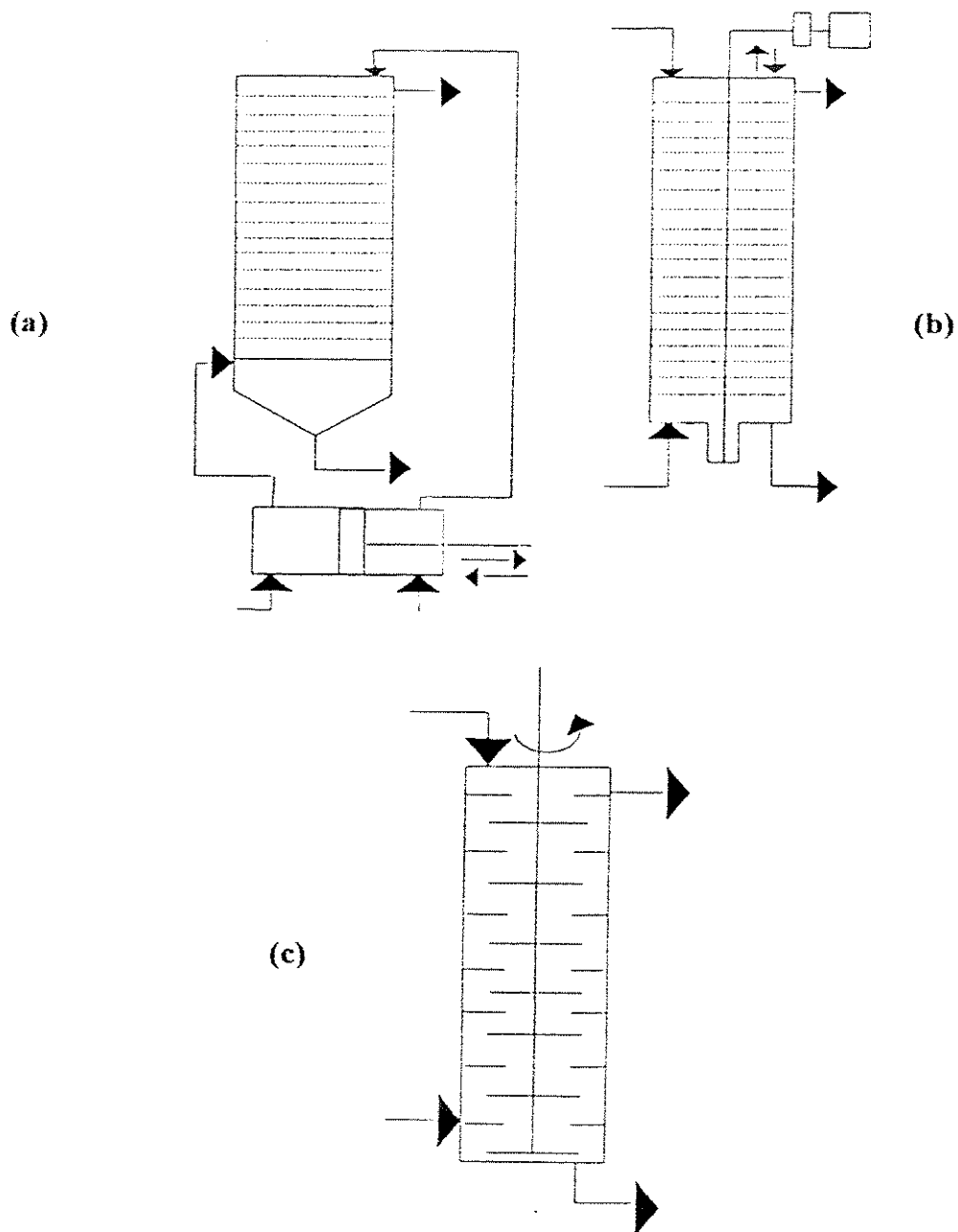


FIGURA 15 - EXEMPLOS DE COLUNAS QUE ATUAM SOB A FORÇA DA GRAVIDADE. (A) COLUNA DE FLUXO PULSADO; (B) COLUNA DE PRATOS PULSADOS; (C) COLUNA DE DISCOS ROTATIVOS.

2.7 - Processamento Contínuo

A maioria dos processos de extração de partículas biológicas tem sido realizada de modo descontínuo; recentemente, a utilização de processos contínuos tem adquirido um grande impulso, uma vez que o processamento contínuo apresenta inúmeras vantagens (Boland, 1990):

- Redução no tempo de processamento: os processamentos de fases aquosas atualmente são muito rápidos. A mistura e o equilíbrio das fases ocorrem em alguns minutos quando se utilizam equipamentos adequados. Portanto, a utilização do processo contínuo permite processar rapidamente grandes quantidades de material, com instalações reduzidas em relação à quantidade de material que está sendo processada, resultando numa economia de capital e energia.
- Automação do processo, o que significa baixa mão-de-obra a ser empregada;
- Obtenção de produtos mais homogêneos: a combinação entre o processo contínuo e a automação mantém o processamento mais constante, com poucas variações e maior uniformidade ao longo da corrida;
- Maior rendimento de produtos lábeis: devido a rapidez do processamento, as perdas de materiais lábeis são minimizadas;
- Possibilidade de reciclagem dos componentes constituintes das fases.

A aplicação de sistemas bifásicos aquosos para a purificação em contínuo de proteínas tem sido demonstrada em vários trabalhos utilizando diferentes sistemas de extração. Albertsson (1986) descreveu a operação de uma unidade Craig, em modo contracorrente, empregando sistemas PEG-Dextrana. KULA *et al.*, (1982) pesquisaram a extração de formato desidrogenase com sistemas PEG-Sal. Hustedt *et al.*, (1988)

analisaram o processo contínuo em uma coluna Kuhni, em um extrator Graesser, em uma coluna Podbielniak e em uma unidade misturadora-decantadora usando SBA.

Em operação semicontínua, Sawant *et al.*, 1990; Patil *et al.*, 1991 e Jafarabad *et al.*, (1992a; 1992b) avaliaram a transferência de massa e a fração retida da fase dispersa (“Hold up”) para a albumina de soro bovino e para amiloglicosidase. Para a purificação da albumina foram empregadas as colunas tipo Spray e York-Scheibel operando com sistemas PEG-Dextrana e PEG-fosfato de potássio, respectivamente. Para a separação da amiloglicosidase foi utilizado o sistema PEG-sulfato de sódio nas colunas York-scheibel e Empacotada.

Coimbra *et al.*, 1994 utilizaram um extrator Graesser para a separação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro do leite com sistemas bifásicos PEG-fosfato e avaliaram a performance do extrator com relação a eficiência de separação e a transferência de massa (Coimbra *et al.*, 1995). Pawar *et al.*, (1997) analisaram a fração retida da fase dispersa e o coeficiente de transferência de massa em uma coluna Spray modificada utilizando o sistema bifásico PEG-sulfato para a extração de amiloglicosidase e β -galactosidase. Mais recentemente, Porto *et al.*, (1997; 1999) avaliaram a transferência de massa e a fração retida da fase dispersa (“Hold up”) para o citocromo b5 e albumina de soro bovino em coluna de discos perfurados da fase dispersa (“Hold up”) para a albumina de soro bovino em PRDC com sistemas PEG-fosfatos de potássio.

2.8 - Extração Contínua em Colunas de Campânulas Pulsadas

As colunas agitadas por pulsações, apesar de utilizarem mais energia em sua operação, oferecem a grande vantagem de proporcionarem taxas de transferência de massa e eficiências bem mais elevadas do que outros tipos de equipamentos. Isto acontece porque neste tipo de extrator, a forma de agitação (pulsação) é introduzida no sistema na mesma direção de escoamento das correntes no interior da coluna, o que favorece um contato mais intenso entre as fases, sem prejudicar o escoamento em ambas as fases.

O primeiro trabalho apresentado sobre colunas agitadas por pulsações foi proposto por Van Dijck (1935). Neste trabalho, o autor propôs um novo tipo de equipamento para extração líquido-líquido, com a principal finalidade de se obter o máximo contato entre duas correntes líquidas. O princípio de funcionamento desta coluna consta basicamente do seguinte: as correntes líquidas são introduzidas na coluna em contracorrente, formando porções de cada uma delas nos vários compartimentos da coluna. Assim, em cada estágio (cada seção da coluna formada por um prato) são formadas duas camadas líquidas distintas, a superior de líquido leve (de menor densidade) e a inferior de líquido pesado (de maior densidade). Com o movimento alternativo dos pratos, quando estes se movem para cima, o líquido pesado atravessa os furos dos pratos na forma de jatos, sendo disperso como gotas na camada de líquido leve do estágio anterior. De forma análoga, quando os pratos se movem para baixo, o líquido leve é injetado nos furos do prato superior, se dispersando na camada de líquido pesado.

Van Dijck (1935) propôs também um outro tipo de coluna, em que os pratos são fixos e os fluidos pulsados através do emprego de bombas alternativas. Este equipamento, conhecido como coluna de fluxo pulsado, também apresenta boas taxas de eficiência,

segundo os autores. Já que estes extratores não têm partes móveis, encontram extenso uso no processamento de soluções radioativas em trabalhos com energia atômica, onde podem ser colocados sob pesados campos de radiação sem requerer manutenção (Treybal, 1968).

Vários autores, entre eles Smoot e Babb (1962), Duarte *et al.*, 1992; Khemangkorn *et al.*, 1978 e Góis (1995), já apresentaram estudos sobre colunas agitadas por pulsações, porém, a maioria se refere às colunas com fluxo pulsado. Todos os trabalhos mostram que este tipo de equipamento é bastante eficiente. Os sistemas líquidos estudados nestes trabalhos foram formados por água/solventes orgânicos

2.9 - Transferência de Massa em Sistemas Bifásicos Aquosos

Quando um sistema contém dois ou mais componente de ponto a ponto no sistema, há uma tendência natural à massa ser transferida, minimizando as diferenças de concentração no sistema, já que de acordo com a segunda lei da termodinâmica, sistemas que não estão em equilíbrio tendem a alcançar o equilíbrio com o tempo. O transporte de um constituinte de uma região de maior concentração para outra de menor concentração é chamado “transferência de massa”.

É de fundamental importância no estudo de um processo de extração líquido-líquido ou de um extrator em particular, a avaliação da transferência de massa no interior deste equipamento.

A transferência de massa entre duas fases líquidas é função do comportamento dos líquidos que atravessam o extrator e da taxa local de transferência de massa, que depende da resistência no filme líquido interfacial.

O estudo da transferência de massa visa principalmente avaliar o quanto o sistema se aproxima do equilíbrio. Com este estudo, pode-se definir um limite ideal de operação para o extrator.

Em equipamentos de extração líquido-líquido, em contracorrente, a transferência de massa ocorre numa dispersão de gotas que fluem pela gravidade através da fase líquida contínua, sendo o contador de discos rotativos um exemplo destes equipamentos.

A mudança da concentração numa gota, numa dada parte da coluna, é dependente da diferença de densidades, do coeficiente de transferência de massa, da área interfacial e do tempo de contato, sendo que todas essas variáveis dependem do diâmetro das gotas. Segundo Hanson (1968) a transferência de massa ocorre entre a fase contínua e as gotas.

Em sistemas líquido-líquido, o aumento da agitação, inicialmente causa um aumento da área interfacial (através da diminuição no tamanho das gotas) e assim, aumentando a taxa de transferência de massa. Porém, isso não ocorre indefinidamente. Primeiramente, há um limite para o aumento da área interfacial que pode ser obtida. Em segundo lugar, abaixo de certo tamanho de gotas, estas começam a se comportar como esferas rígidas sem circulação pelo lento processo de difusão molecular. Em terceiro lugar, após certo ponto, o aumento na agitação pode começar a suprimir a interação gota-gota, reduzindo a mistura na fase dispersa e também a taxa de transferência de massa. Há, portanto um grau ótimo de agitação que fornece a taxa de transferência de massa máxima (Rod, 1966).

Segundo Hanson (1968), a coalescência das gotas da fase dispersa numa fase contínua é fundamental para ocorrer a separação das fases. Em geral, quanto menor o tamanho das gotas, mais lenta é a coalescência. Quanto menores forem as gotas, maior será a tendência da solução emulsificar.

Em colunas de discos perfurados rotativos, o coeficiente global de transferência de massa pode ser determinado por:

$$N = Kda(C^* - C)V$$

EQUAÇÃO 02

Onde: N: Fluxo de proteína para a fase dispersa;

Kda: Coeficiente global de transferência de proteína;

C*: Concentração de proteína na interface em equilíbrio com a fase contínua;

C: Concentração de proteína na fase dispersa;

V: Volume da fase contínua.

Considerando que as duas fases são imiscíveis, que a quantidade de soluto transferida entre as fases é pequena, que o coeficiente de partição para a proteína é independente da sua concentração e que o coeficiente de transferência se mantém constante ao longo da coluna, a integração da expressão acima é possível, originando:

$$N = Kda \Delta C_{lm} V$$

EQUAÇÃO 03

Onde: ΔC_{lm} : Média logarítmica da diferença de concentrações entre a interface e a fase dispersa.

O balanço material global do soluto na coluna origina

$$Q(C_{ent}-C_{sai})=K_d \Delta C_{lm} V$$

EQUAÇÃO 04

Onde: Q: Velocidade de fluxo da fase dispersa;

C_{ent}: Concentração de proteína na corrente de entrada da fase dispersa;

C_{sai}: Concentração de proteína na corrente de saída da fase dispersa.

Reorganizando esta expressão, obtém-se a expressão:

$$K_d = Q/V \cdot \ln (C_{ent} - KC_{fc}/C_{sai} - KC_{fc})$$

EQUAÇÃO 05

Onde: K representa o coeficiente de partição do soluto.

Sabe-se que existem dois aspectos distintos sobre a eficiência de extração a serem considerados: o primeiro costuma diferenciar o comportamento real do ideal; o segundo interpreta a eficiência em termos de mecanismos de transporte de massa. Baseado nestes aspectos, várias definições de eficiência têm sido propostas.

3 – OBJETIVOS

No presente trabalho pretendeu-se purificar G6PDH utilizando a extração líquido-líquido por micelas reversas, e, por isto, foram realizadas:

- A avaliação dos fatores (pH, temperatura, condutividade elétrica, concentração e tipo do agente tensoativo, concentração de co-solvente) na extração da glicose-6-fosfato desidrogenase da fase aquosa para a fase micelar, com o auxílio de planejamento estatístico específico para cada sistema formado a partir dos seguintes tensoativos: AOT, CTAB;
- A otimização do processo de extração utilizando o sistema selecionado na etapa anterior e posterior determinação do modelo estatístico para descrição do processo;
- Os estudos iniciais da extração da enzima por micelas reversas em um sistema contínuo, utilizando coluna de campânulas pulsantes.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Microorganismo

Saccharomyces cerevisiae, proveniente de fermento de padaria (massa comercial prensada), foi utilizadas como fonte de G6PDH.

4.2 – Extrato Bruto

O extrato bruto foi obtido no Laboratório de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e congelado a - 18 °C.

4.3 – Extração de G6PDH por Micela Reversa

Neste trabalho foram utilizados os seguintes sistemas. AOT em isooctano, CTAB em isooctano, hexanol e butanol.

4.3.1 – Preparo das Soluções Micelares

Para cada sistema micelar reverso (tensoativo/solvente) foi empregada uma metodologia de preparo da microemulsão específica. As massas de tensoativo foram determinadas em função dos planejamentos estatísticos empregados e constam das respectivas matrizes:

- a) Sistema AOT em isooctano: dissolução de quantidade apropriada do tensoativo usando isooctano como solvente;
- b) Sistema CTAB em isooctano/hexanol/butanol: primeiramente se preparou uma solução estoque com as proporções entre isooctano e hexanol de 9:1 e butanol

em proporção determinada pelo planejamento experimental. Esta solução foi utilizada de quantidades apropriadas do tensoativo.

4.4 – Coluna Agitada por Campânulas Pulsantes

Nos ensaios de extração com alimentação contínua de ambas as fases foi utilizada uma micro-coluna agitada por campânulas pulsadas como representadas na FIGURA 16. Optou-se pelas campânulas como dispositivos para promover a agitação, porque elas conseguem promover uma boa dispersão e aumentar o tempo de contato entre as fases.

A micro-coluna, disponível no laboratório, é formada por um tubo de vidro de 19 cm de altura; 2,84 cm de diâmetro externo e 2,54 cm de diâmetro interno. No interior da mesma foi acoplada uma haste de aço inox, no qual estão soldadas 03 campânulas que estão distanciadas 04 cm uma das outras. O diâmetro da base da campânula é de 2,49 cm. A peneira de aço inox da qual a campânula foi construída tem 24 "mesh" e, portanto, fornece uma área livre de 38%.

Os bocais de alimentação e saída são de inox, e possuem um diâmetro interno de 3,65 mm e 6,85 mm de diâmetro externo.

Os pulsos são fornecidos por um dispositivo que promove os movimentos alternados (movimenta o eixo para cima e para baixo) e controlados por um dispositivo de frequência de pulsação.

A alimentação da fase contínua, que possui maior densidade, é feita utilizando-se a gravidade e a sua vazão é controlada por um rotâmetro. A alimentação da fase dispersa que possui menor densidade, é feita por meio de uma bomba peristáltica, previamente calibrada. As válvulas para controle das vazões são válvulas agulha.

Os tubos para conduzir as alimentações e saída são de viton, que é um material resistente à ação do isooctano.

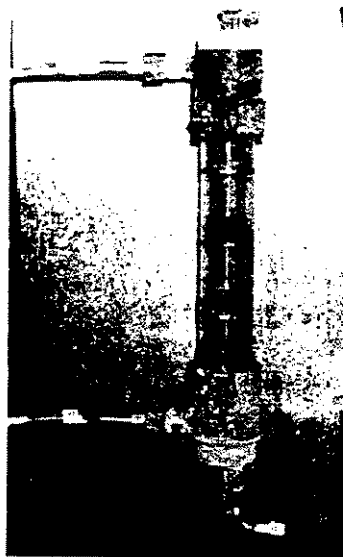


FIGURA 16 - MICROCOLUNA DE CAMPÂNULAS PULSADAS.

Na FIGURA 17 é mostrada a fotografia de uma haste na qual estão soldadas duas campânulas.

Durante um pulso, a campânula movimenta-se aproximadamente 2,8 cm para baixo e 2,8 cm para cima, o que faz com que a amplitude do pulso seja de aproximadamente 5,6 cm.



FIGURA 17 – CAMPÂNULAS SOLDADAS À HASTE. FORMANDO O DISPOSITIVO DE AGITAÇÃO DA MICRO-COLUNA

As amostras das fases leve e pesada foram retiradas no topo e fundo da coluna, respectivamente. As condições de carga total alimentada, razão entre as fases alimentadas e intensidade de pulsação, foram determinadas experimentalmente.

4.5 – Avaliação da Atividade Enzimática

Foi utilizado o procedimento descrito por Bergmeyer (1984). Para a determinação da atividade da G6PDH o meio reacional continha os componentes discriminados na TABELA 04.

TABELA 04 – COMPOSIÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DE G6PDH.

Componente	Concentração da Solução (mM)	Volume Empregado (μL)
Tampão tris-HCL pH 7,5	50	600
com $MgCl_2$ a 5 mM		
NADP⁺	0,5	5
Glicose-6-fosfato	10	10
Amostra	---	30 - 100

A atividade da enzima foi determinada pela medida da velocidade de formação de NADPH. Uma unidade (U) de G6PDH foi definida como a quantidade da enzima capaz de catalisar a redução de 1 μ mol de NAP⁺/min nas condições experimentais. Os resultados foram expressos em U/mg_{proteína total}.

4.6 – Avaliação do Processo de Extração

Para avaliação do processo de extração de G6PDH por micelas reversas foi utilizada a metodologia do planejamento experimental (Box *et al.*, 1978). Para o tensoativo AOT avaliou-se como resposta a recuperação da atividade catalítica da enzima.

A recuperação (R), ou seja, porcentagem da atividade catalítica inicial presente nas fases aquosas após realização do processo de extração foi calculada utilizando a EQUAÇÃO 06:

$$R = (A_2/A_1) \times 100$$

EQUAÇÃO 06

Onde: A₁: Atividade no HI [U/L];

A₂: Atividade específica da amostra após o processo de extração [U/L].

O teor de proteínas totais foi determinado de acordo com o método de Lowry (1959); utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA).

A eficiência do processo de extração pode ser calculada através do balanço de massa protéica onde se observou a porcentagem de rendimento (η). Para o cálculo utilizou-se a EQUAÇÃO 07:

$$\eta\% = [1 - (Pf/Pi)] \times 100 \quad [\text{mg/mL}]$$

EQUAÇÃO 07

Onde: Pf: Concentração de proteínas [mg/mL] após a condução do processo de extração;

Pi: Concentração de proteínas [mg/mL] do controle.

4.7 – Planejamento Fatorial

Para cada sistema de tensoativo empregado foi utilizado um planejamento específico conforme descrito a seguir:

- a) Sistema AOT em isooctano: planejamento completo 2³ com três repetições no ponto central, onde se estudou o efeito das variáveis: pH, concentração do tensoativo e temperatura sobre a extração da enzima.

- b) Sistema CTAB em isooctano/hexanol/butanol: planejamento completo 2^4 com três repetições no ponto central, onde se estudou o efeito das variáveis: pH, concentração do tensoativo, concentração de butanol e temperatura sobre a extração da enzima.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Tensoativos Aniônicos

Um tensoativo aniônico, o AOT, foi testado e para o mesmo foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com 03 repetições no ponto central, para avaliação da influência do pH, concentração de AOT e temperatura.

A TABELA 05 corresponde a matriz do planejamento estatístico usado e mostra os níveis reais utilizados para cada variável nos diferentes ensaios, bem como os resultados de recuperação da enzima.

TABELA 05 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 COM 03 REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PH, CONCENTRAÇÃO DE AOT E TEMPERATURA NA RECUPERAÇÃO DE G6PDH POR MICELAS REVERSAS.

Ensaio nº	pH	AOT [M]	Temperatura [°C]	R* [%]
1	4,0	0,1	5,0	1,71
2	8,0	0,1	5,0	0
3	4,0	0,4	5,0	3,55
4	8,0	0,4	5,0	0,53
5	4,0	0,1	25,0	0
6	8,0	0,1	25,0	3,64
7	4,0	0,4	25,0	0
8	8,0	0,4	25,0	5,10
9	6,0	0,25	15,0	0
10	6,0	0,25	15,0	0
11	6,0	0,25	15,0	0

*R = recuperação na Fase Aquosa

Condutividade elétrica da fase aquosa = 7 mS/cm

Os resultados de recuperação variaram de 0 a 5,1 %. Os rendimentos em atividade total recuperada são baixos. Na TABELA 06 encontra-se a estimativa dos efeitos através da qual é possível identificar os efeitos principais bem como as interações importantes ao processo de extração.

TABELA 06 – ESTIMATIVA DOS EFEITOS, ERROS-PADRÃO E TESTE t (STUDENT) PARA OS PARÂMETROS ESTUDADOS NA RECUPERAÇÃO DA G6PDH POR MICELAS REVERSAS DE AOT

Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	t
Média	1,3209	+/-0,4306	3,07
A (pH)	1,0025	+/-1,0097	0,99
B (Conc. Tensoativo)	0,9575	+/-1,0097	0,95
C (Temperatura)	0,7375	+/-1,0097	0,73
AB	0,0375	+/-1,0097	0,04
AC	3,3675	+/-1,0097	3,34*
BC	-0,2275	+/-1,0097	0,23

* Significativo ao nível de 95 % de confiança

Valor de t para 95 % de confiança com 4 GL ($t = 2,7743$)

Como pode ser visto na TABELA 06, nenhuma das variáveis, pH (A), concentração do tensoativo (B) ou temperatura (C), apresentam efeito principal significativo para o intervalo de confiança considerado (95 %), na região averiguada. Ou seja, os valores para t (de Student) são inferiores ao valor tabelado. Observa-se, no entanto efeito significativo para este nível de significância, entre as variáveis AC (pH e temperatura) com estimativa de (+ 3,37).

5.2 – Tensoativos Catiônicos

Nesta seção estão apresentados os resultados obtidos na extração de G6PDH por micelas reversas de tensoativo catiônico, o CTAB.

Para o tensoativo CTAB foi executado um planejamento experimental e com base nos resultados obtidos novos ensaios foram feitos.

5.2.1 – Extração da Enzima G6PDH por Sistema de Micelas Reversas Formadas a Partir do Agente Tensoativo Catiônico CTAB

Para o estudo da influência das variáveis: pH, concentração do agente tensoativo CTAB, concentração do co-solvente e temperatura, utilizou-se um planejamento fatorial fracionário 2^4 com 03 (três) repetições no ponto central buscando assim, a identificação dos fatores significativos ao sistema sem que o número de ensaios fosse demasiadamente grande. A matriz da TABELA 07 mostra os níveis utilizados para cada variável nos diferentes ensaios, bem como os resultados de recuperação da enzima G6PDH.

TABELA 07 – MATRIZ PARA PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^4 COM 03 (TRÊS) REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL PARA ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS: PH, CONCENTRAÇÃO DE CTAB, CONCENTRAÇÃO DE BUTANOL (%) E TEMPERATURA, NA RECUPERAÇÃO DE G6PDH POR MICELAS REVERSAS.

Ensaio Nº	pH	CTAB [M]	Butanol [%]	Temperatura [° C]	R* [%]
1	8,0	0,40	20	25	5,00
2	4,0	0,40	20	25	14,04
3	8,0	0,10	20	25	5,54
4	4,0	0,10	20	25	8,53
5	8,0	0,40	10	25	1,41
6	4,0	0,40	10	25	0
7	8,0	0,10	10	25	3,43
8	4,0	0,10	10	25	2,65
9	8,0	0,40	20	5	3,83
10	4,0	0,40	20	5	0
11	8,0	0,10	20	5	1,57
12	4,0	0,10	20	5	0
13	8,0	0,40	10	5	0,53
14	4,0	0,40	10	5	0
15	8,0	0,10	10	5	0
16	4,0	0,10	10	5	1,71
17	6,0	0,25	15	15	1,43
18	6,0	0,25	15	15	1,40
19	6,0	0,25	15	15	0,52

* R = recuperação na fase aquosa

Com base nos resultados apresentados, pode-se observar que os valores para a variável resposta (recuperação) variaram de 0 a 14,04 % da atividade enzimática total recuperada na fase aquosa.

Com exceção dos ensaios 01, 02, 03 e 04, todos os demais apresentaram valores para variável resposta (recuperação) inferior a 4 %. Os ensaios 02 e 04, os quais correspondem aos maiores valores de recuperação obtidos 14,04 e 8,53 %, respectivamente, possuem em comum a utilização das variáveis butanol e temperatura em seus níveis superiores (20 % e 25 °C, respectivamente) e da variável pH em seu nível inferior, ou seja, pH 4,0; observa-se que a diminuição da concentração de CTAB de 0,4 M para 0,1 M nestes dois ensaios, provocou diminuição de 40 % no valor da atividade recuperada da enzima G6PDH.

Com relação aos ensaios 01 e 03, utilizaram-se as mesmas condições para as variáveis pH, butanol e temperatura (8,0; 20 % e 25 °C, respectivamente), sendo a única variação o decréscimo na concentração de CTAB de 0,4 para 0,1 M. No entanto, tal variação não afetou significativamente a variável resposta, recuperação que aumentou de 5,00 para 5,54 %.

Tem sido utilizado, no presente estudo, o agente tensoativo catiônico CTAB, esperava-se que a recuperação fosse favorecida pela utilização de pH superior ao pI (ponto isoelétrico) da G6PDH, o que garantiria carga líquida total negativa à enzima. Desta forma, as interações eletrostáticas entre a enzima e o interior polar positivo das micelas reversas do agente tensoativo catiônico seriam favorecidas e por consequência a extração da enzima.

Porém, em pH 4,0; a carga líquida total da proteína apresentou positiva (pH inferior ao pI da G6PDH) o que poderia dificultar a extração da enzima, entretanto, outras forças provavelmente favoreceram a extração, tais como as forças hidrofóbicas,

oriundas das partes apolares das micelas reversas do tensoativo em uso, as quais facilitaram a difusão da enzima do interior da micela para o meio externo.

De fato, fatores como pH, condutividade elétrica, tipo de solvente, co-solvente, concentração e tipo de agente tensoativo têm grande ascendência sobre as forças que regem o processo de recuperação de proteínas, porém a técnica mostra-se eficaz para a purificação de enzimas tanto por interações eletrostáticas quanto por forças hidrofóbicas, manifestando, assim, sua flexibilidade (Hasmann *et al.*, 1999 e Hasmann *et al.*, 2000).

Através da estimativa dos efeitos das variáveis e suas interações mostrada na TABELA 08, identificou-se os efeitos principais bem como as interações importantes ao processo de extração. Considerou-se um intervalo de confiança de 95 %, ou seja, apenas 5 % das variações não poderiam ser explicadas pela análise estatística.

TABELA 08 – ESTIMATIVA DOS EFEITOS, ERROS-PADRÃO E TESTE t (STUDENT) PARA OS PARÂMETROS ESTUDADOS NA RECUPERAÇÃO DE G6PDH POR MICELAS REVERSAS DE CTAB.

Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	t
Média	2,715	+/- 0,5781	4,696*
A: Temperatura	4,120	+/- 1,2891	3,269*
B: Butanol	3,597	+/- 1,2891	2,855*
C: CTAB	0,173	+/- 1,2891	0,137
D: pH	0,703	+/- 1,2891	0,558
AB	2,807	+/- 1,2891	2,228*
AC	0,868	+/- 1,2891	0,077
AD	1,670	+/- 1,2891	1,395
BC	1,723	+/- 1,2891	1,298
BD	0,955	+/- 1,2891	0,758
CD	0115	+/- 1,2891	0,091

* Significativo ao nível de 95 % de confiança

Valor de t para 95 % confiança com 8GL (t = 2,307)

Como pode ser visto na TABELA 08, os maiores efeitos principais observados para a recuperação da enzima foram os das variáveis butanol e temperatura, que apresentaram estimativas de, aproximadamente, + 3,59 e + 4,12; respectivamente. Observa-se ainda efeito interativo, ao nível de 95 % de significância, entre estas variáveis, o qual apresenta uma estimativa de, aproximadamente, + 2,81. O fato de esta interação apresentar sinal positivo indica que os resultados de recuperação são melhorados com a condução dos ensaios em valores de butanol e temperaturas mais elevadas, nas respectivas faixas estudadas.

No intervalo de confiança considerado as variáveis pH e concentração de CTAB não apresentaram efeito principal significativo, com estimativas de - 0,70 e + 0,17; respectivamente. Também a interação entre estas apresentou baixa significância (estimativa de + 0,11).

Após a seleção das variáveis que apresentam efeitos significativos sobre o processo estudado, conduziu-se uma análise de variância (ANOVA) para verificação da possibilidade de ajuste de um modelo linear aos dados experimentais. Os parâmetros desta análise, que possui R^2 de 0,76, encontra-se na TABELA 09.

TABELA 09 – PARÂMETROS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS FATORES SIGNIFICATIVOS.

Efeitos	SQ	GL	QM	F	p
A (Temperatura)	67,898	1	67,898	15,583	0,0017*
B (Butanol)	51,768	1	51,768	11,881	0,0043*
AB	31,528	1	31,528	7,236	0,0185*
AD	12,355	1	12,355	2,836	0,1160
BC	10,6929	1	10,6929	2,454	0,1412
Erro Total	56,641	13	4,357		
Total	230,883	18			
	0,76				

* Significativo ao nível de 95 % de confiança
QM = média dos quadrados

SQ = soma dos quadrados,

GL = graus de liberdade,

Na FIGURA 18 está representada a superfície de resposta da interação mais significativa. A superfície mostrada representa a interação entre as variáveis: temperatura (A) e butanol (B) e permite visualizar o comportamento da recuperação da enzima G6PDH nas condições averiguadas por este planejamento. Nota-se que, para esta interação, houve aumento na recuperação da enzima com o aumento da temperatura

e da concentração de butanol, ou seja, com a utilização destas variáveis em seus níveis superiores.

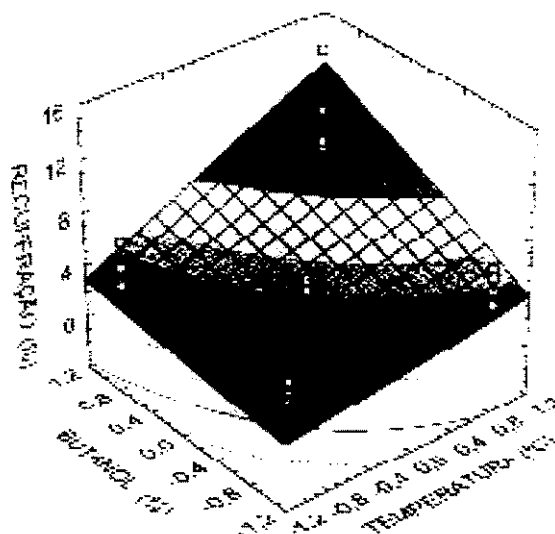


FIGURA 18 - RECUPERAÇÃO DE G6PDH POR MICELAS REVERSAS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE BUTANOL.

A validade do modelo linear foi verificada pela análise de variância de regressão do modelo, representado na TABELA 10.

TABELA 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE REGRESSÃO PARA O MODELO REPRESENTATIVO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA G6PDH POR MICELAS REVERSAS DE CTAB.

Causas de Variação	SQ	GL	MQ	F
Modelo	162,255	5	32,451	6,15
Resíduo	68,629	13	5,279	
Total	230,883	18		

$R^2 = 0,76$ GL = graus de liberdade SQ = soma quadrática MQ = média quadrática

Desta forma, o modelo matemático descrito para apresentar o processo, é expresso pela EQUAÇÃO 08, onde Y representa porcentagem de recuperação da enzima, A é a temperatura e B a concentração de butanol, C a concentração de CTAB e D o pH.

$$Y = 2,72 + 2,06 + 1,79 B + 1,40 AB - 0,88 AD + 0,82 BC \quad \text{EQUAÇÃO 08}$$

A modelagem matemática obtida com a EQUAÇÃO 08 prevê valores de recuperação para a G6PDH de 12 %, para as seguintes condições: pH 4,0; concentração de CTAB 0,4 M, concentração de butanol 20 % e temperatura 26 °C. Nestas condições dois novos ensaios para confirmação do modelo foram realizados onde os valores de recuperação observados foram de 12,9 e 12,3 % respectivamente.

5.3 - Resultados Preliminares: Extração Contínua em Colunas Pulsadas

A recuperação da enzima G6PDH foi realizada utilizando uma microcoluna de extração contínua com campânulas pulsadas, conforme descrito anteriormente.

Os resultados apresentados nessa fase do trabalho são preliminares e foram realizados utilizando as condições ótimas obtidas em batelada por Hasmann (2003). Seguindo essas condições, foram realizados alguns ensaios na microcoluna de operação contínua, com a intenção de verificar e comparar com os resultados obtidos em batelada. Esses resultados são encontrados nas TABELAS 11; 12 e 13. Podemos observar que nas TABELAS 11 e 12; a maior recuperação na fase aquosa após reextração ocorreu em 10 minutos, ou seja, no início do processo, e que, no decorrer da extração, não apresentou oscilações. Analisando a TABELA 13, constata-se que não

houve uma maior recuperação na fase aquosa após a reextração, pois, nestas condições, manteve-se aproximadamente constante. Entretanto, vale ressaltar que esses resultados foram inferiores aos obtidos nas mesmas condições, quando os ensaios foram realizados em batelada (Rodrigues, 1997).

TABELA 11 - BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DA G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.

Tempo (min)	Atividade recuperada na fase aquosa (%)	Atividade recuperada na fase aquosa após reextração (%)	Atividade Total (%)
10	62,8	11,5	74,3
30	65,3	4,3	69,6
60	71,5	6,5	78,0

Condições de extração: pH 4,0; Concentração de CTAB 0,4 M; 20 % de butanol e Temperatura de 26 °C.

TABELA 12 - BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.

Tempo (min)	Atividade recuperada na fase aquosa (%)	Atividade na fase aquosa após reextração (%)	Atividade Total (%)
10	49,7	10,6	60,3
30	39,3	8,9	48,1
60	27,2	5,8	33,0

Condições de extração: pH 4,0; Concentração de CTAB 0,4 M; 20 % de butanol e Temperatura de 26 °C.

TABELA 13 - BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.

Tempo (min)	Atividade recuperada na fase aquosa (%)	Atividade recuperada na fase aquosa após reextração (%)	Atividade Total (%)
10	83,4	n.d.	83,4
30	71,7	3,0	74,7
60	78,1	4,4	82,5

Condições de extração: pH 4,0; Concentração de CTAB 0,4 M; 20 % de butanol e Temperatura de 26 °C.

Como não foi possível obter bons resultados com as condições ótimas obtidas em batelada, optou-se por realizar novos ensaios variando a condutividade da fase aquosa.

Observando isoladamente os resultados obtidos nos três ensaios em função do balanço de atividade, apresentados nas TABELAS 14; 15 e 16, constata-se que os resultados foram diminuindo com a redução da condutividade. Este fato pode ser explicado pela diluição, pois para diminuir a condutividade foi preciso fazer uma diluição do caldo enzimático e esta foi feita em água.

TABELA 14 - BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DA G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.

Tempo (min)	Atividade recuperada na fase aquosa (%)	Atividade recuperada na fase aquosa após reextração (%)	Atividade Total (%)
10	98,5	1,9	100,4
30	84,9	7,4	92,3
60	104,3	6,1	110,4

Condições de extração: pH 4,0; Concentração de CTAB 0,4 M; 20 % de butanol e Temperatura de 26 °C.

TABELA 15 - BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DA G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.

Tempo (min)	Atividade recuperada na fase aquosa (%)	Atividade recuperada na fase aquosa após reextração (%)	Atividade Total (%)
10	86,4	8,2	96,6
30	78,6	15,1	93,7
60	75,2	10,7	85,9

Condições de extração: pH 4,0; Concentração de CTAB 0,4 M; 20 % de butanol e Temperatura de 26 °C.

TABELA 16 - BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE G6PDH REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS.

Tempo (min)	Atividade recuperada na fase aquosa (%)	Atividade recuperada na fase aquosa após reextração (%)	Atividade Total (%)
10	39,0	6,5	45,5
30	39,9	16,2	56,1
60	31,3	19,2	50,5

Condições de extração: pH 4,0; Concentração de CTAB 0,4 M; 20 % de butanol e Temperatura de 26 °C.

5.3.1 - Extração da G6PDH por Micela Reversa em Processo Contínuo utilizando o Agente Tensoativo Aniônico AOT

Nesta fase do trabalho foram também realizados ensaios com o agente tensoativo aniônico AOT. Entretanto, nesses ensaios, não foi possível determinar a recuperação em atividade na fase reextraída. Pode ter acontecido que a enzima não seja mesmo extraída, ou ainda que tenha ocorrido a desnaturação.

Como os resultados obtidos com o AOT foram baixos e no processo contínuo não houve recuperação, optou-se por não realizar mais ensaios com este tensoativo.

5.4 - Otimização da Enzima G6PDH por Micela Reversa Utilizando uma Microcoluna com Campânulas Pulsadas e a Enzima Pura

Foram selecionadas duas variáveis para estudo de seus efeitos sobre o rendimento em atividade da enzima, a condutividade da fase aquosa e a razão entre as

fases aquosa/orgânica. Os resultados dos experimentos obtidos deste planejamento são apresentados na TABELA 17.

TABELA 17 - ESQUEMA DA MATRIZ UTILIZADA NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 COM 02 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.

Ensaio	Fatores		Rendimento em atividade (%)
	A	B	
1	-1	-1	140,1
2	1	-1	139,2
3	-1	1	72,8
4	1	1	88,7
5	0	0	110,2
6	0	0	107,3

A = Condutividade (mS/cm) (-1 = 7,5; 0 = 8,75; 1 = 10,0)

B = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica (-1 = 0,6; 0 = 0,8; 1 = 1,0)

Ao analisar os resultados apresentados na TABELA 17, observa-se que o melhor resultado de recuperação em atividade foi de, aproximadamente, 140,1 %, obtido quando se trabalhou nos menores níveis, ou seja, na condutividade da fase aquosa 7,5 mS/cm e razão entre as fases de 0,6. Observa-se também que, quando passamos do menor nível (-1) para o maior nível (1), temos uma redução de aproximadamente 50% na recuperação em atividade, indicando que para se ter bons resultados é preciso trabalhar com razão entre as fases menores que 1.

A análise estatística dos resultados desse ensaio mostrou que as duas variáveis condutividade da fase aquosa e razão entre as fases apresentam efeitos significativos (TABELA 18). Pelo resultado do teste t de "Student" pode-se observar que essas variáveis apresentam valores de t superiores ao tabelado (4,303). O sinal negativo que

aparece no efeito da variável razão entre as fases indica que para aumentar a recuperação em atividade é preciso reduzir o nível deste fator, comprovando o que já teria sido observado anteriormente.

TABELA 18 - EFEITOS ESTIMADOS, VALORES DO TESTE t DE "STUDENT" E ERROS-PADRÃO OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2² COM 02 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.

Efeitos e interações	Estimativas	Erros-Padrão	t
Média	110,167	+/- 0,527	-
A	7,500	+/- 0,129	58,095*
B	-58,900	+/- 0,129	-456,237*
AB	8,400	+/- 0,129	65,066*

A = Condutividade (mS/cm); B = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica

* Significativos ($t_{2, 0,95}$) = 4,303

Tendo em vista a significância dessas variáveis, procedeu-se uma análise da variância para verificar se os dados experimentais ajustam-se a um modelo linear. Por meio dessa análise, comprovam-se os resultados do teste t e obtém-se uma correlação de 0,999, podendo com este valor afirmar que os dados observados se ajustam ao modelo, no caso um modelo linear. Os resultados estatísticos desse estudo se encontram nas TABELAS 19 e 20.

TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE G6PDH NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2² COM 02 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.

Efeitos	QM	F	P
A	56,250	3375,000	0,0003*
B	3469,210	20815,600	0,0000*
AB	70,560	4233,600	0,0002*
R ² = 0,999 QM – Média Quadrática *Significativos ao nível de 95% de confiança			

TABELA 20 - COEFICIENTE DE REGRESSÃO, ERROS-PADRÃO, TESTE t DE "STUDENT" E NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA O MODELO QUE REPRESENTA O PROCESSO CONTÍNUO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO DE G6PDH POR MICELA REVERSA, UTILIZANDO UM PLANEJAMENTO FATORIAL 2² COM FACE CENTRADA.

Fatores	Coeficiente	Erros-Padrão	t	p
Média	110,167	+/- 0,053	2090,266*	0,0000**
A	3,750	+/- 0,065	58,095*	0,0003**
B	-29,450	+/- 0,065	-456,237*	0,0000**
AB	4,200	+/- 0,065	65,066*	0,0002**
* Significativos (t _{1, 0,95} = 12,706)				** Significativos ao nível de 95% de confiança

Como o resultado encontrado para a recuperação foi superior a 100% e o modelo é bem representado por um modelo linear, então podemos representar o processo considerando os termos que influenciam a extração, pela EQUAÇÃO 09:

$$Y = 110,17 + 3,75 A - 29,45 B + 4,2 AB$$

EQUAÇÃO 09

Onde: Y: Rendimento em atividade da G6PDH;

A: Condutividade da fase aquosa;

B: Razão entre as fases.

Dessa forma, obtiveram-se melhores resultados de recuperação quando se utilizou os valores de condutividade da fase aquosa de 7,5 mS/cm e razão entre as fases de 0,6. Nessas condições, o rendimento máximo estimado pelo modelo foi de 147,57%. Os altos valores de rendimento em atividade obtidos na extração podem indicar que as condições operacionais estão muito próximas ao equilíbrio e que podemos considerar, com isso, a operação da coluna como sendo um único estágio de extração.

As curvas de nível e a superfície de resposta do modelo estão apresentadas na FIGURA 19. É possível observar que, na superfície de resposta, o rendimento máximo obtido para este modelo é de 142%.

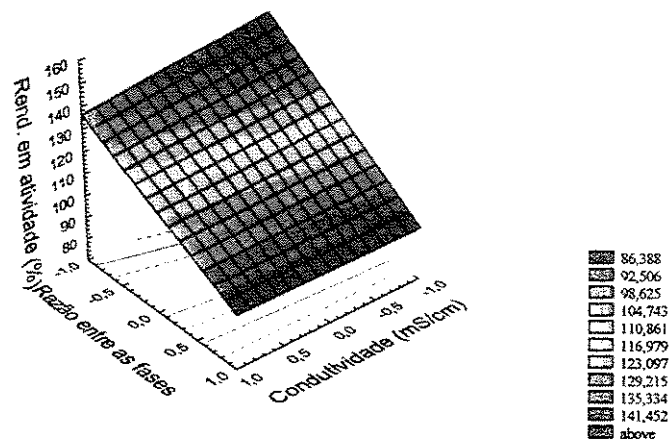


FIGURA 19 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVAS DE NÍVEL DESCRITA PELO MODELO DA EQUAÇÃO 09, QUE REPRESENTA A EXTRAÇÃO DE G6PDH POR MICELA REVERSA UTILIZANDO UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS E A ENZIMA PURA.

5.5 - Estudos Experimentais da Extração de G6PDH por Micela Reversa em Processo Contínuo

O estudo da extração da G6PDH foi realizado a fim de analisar o comportamento da extração líquido - líquido durante o tempo de operação da microcoluna.

O uso de microcolunas com campânulas pulsadas foi estudado por RABELO (1999) e Moro (1999) para a extração de citocromo b5 e tripsina, respectivamente, sendo que Rabelo (1999) utilizou o sistema de duas fases aquosas e Moro (1999) o sistema de micelas reversas. Contudo, a utilização da G6PDH com este tipo de equipamento não foi ainda descrito na literatura, o que motivou as investigações no

sentido de caracterizar hidrodinamicamente este sistema neste tipo de microcoluna e avaliar o processo de extração contínuo de enzimas.

A transferência da enzima G6PDH do extrato enzimático para a fase micelar foi estudada analisando-se o efeito da condutividade da fase aquosa, frequência de pulsação das campânulas e razão entre as fases aquosa/orgânica no rendimento em atividade. Estes parâmetros constituem fatores determinantes para a transferência da enzima e desempenho do equipamento para possível utilização em larga escala. Os ensaios foram realizados nas seguintes condições: pH 4,0; concentração de CTAB 0,4 M; 20 % de butanol e temperatura de 26 °C.

Os dados apresentados nas TABELAS 21 (A) e (B); 22 (A) e (B); 23 (A) e (B) e 24 (A) e (B) demonstram que o rendimento em atividade é superior a 100% em todos os ensaios estudados, e isso pode ser explicado pelo aumento da atividade enzimática que, muitas vezes pode ocorrer, pois as micelas reversas podem retirar algum tipo de inibidor da fase aquosa levando para o interior micelar, fazendo então que ocorra um aumento da atividade na fase externa. Resultados similares foram obtidos por Rodrigues (1997). Além disso, estes valores podem indicar que as condições operacionais estão muito próximas ao equilíbrio e que, com isso, podemos considerar a operação da coluna como sendo um estágio único de extração.

Pode-se também observar que, em relação ao tempo, o rendimento em atividade na fase aquosa apresenta uma queda entre 20 e 30 minutos e com o passar do tempo mantêm-se aproximadamente constante. Em relação à fase aquosa, depois da reextração, é possível notar que a recuperação fica constante ao longo do ensaio, alcançando um máximo entre 40 e 50 minutos de operação. Entretanto, considerou-se interessante observar o comportamento do sistema por um período de tempo maior para se verificar a possibilidade de ocorrer a desnaturação.

Outro fator importante que pode ser observado é o efeito da condutividade da fase aquosa sobre a recuperação em atividade, pois quando se trabalhou em valores menores, constataram-se melhores resultados de recuperação, independente da razão entre as fases e da frequência de pulsação utilizada. Isso pode ser explicado pela forte influência da força iônica sobre as micelas reversas, pois é conhecido que, quanto maior a força iônica menor será a micela reversa formada (Cabral, Aires-Barros, 1993).

TABELA 21 (A) - COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33 PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 1. CONDUTIVIDADE: 10 mS/cm.

Tempo de Operação (min)	Fase Aquosa (%)	Fase Aquosa após Reextração (%)
10	133	16
20	147	20
30	112	28
40	114	32
50	108	15
60	106	30

TABELA 21 (B) - COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33 PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 1. CONDUTIVIDADE: 15 mS/cm.

Tempo de Operação (min)	Fase Aquosa (%)	Fase Aquosa após Reextração (%)
10	155	0
20	144	9
30	135	5
40	147	3
50	115	4
60	142	6

TABELA 22 (A) - COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,13 PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 2. CONDUTIVIDADE: 10 mS/cm.

Tempo de Operação (min)	Fase Aquosa (%)	Fase Aquosa após Reextração (%)
10	130	15
20	130	19
30	94	18
40	126	22
50	108	15
60	92	25

TABELA 22 (B) - COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,13 PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 2. CONDUTIVIDADE: 15 mS/cm.

Tempo de Operação (min)	Fase Aquosa (%)	Fase Aquosa após Reextração (%)
10	138	5
20	130	7
30	122	6
40	120	6
50	105	10
60	110	4

TABELA 23 (A) - COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: CONDUTIVIDADE: 12,5 mS/cm E FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33 PULSO/SEG. RAZÃO ENTRE AS FASES: 0,5.

Tempo de Operação (min)	Fase Aquosa (%)	Fase Aquosa após Reextração (%)
10	135	0
20	112,5	0
30	115	10
40	110	0
50	100	8
60	95	11

TABELA 23 (B) - COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: CONDUTIVIDADE: 12,5 mS/cm E FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33 PULSO/SEG. RAZÃO ENTRE AS FASES: 1,5.

Tempo de Operação (min)	Fase Aquosa (%)	Fase Aquosa após Reextração (%)
10	115	5
20	100	7
30	103	6
40	92	3
50	97	5
60	80	3

TABELA 24 (A) - COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: CONDUTIVIDADE: 10 mS/cm E FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,5 PULSO/SEG. RAZÃO ENTRE AS FASES: 0,5.

Tempo de Operação (min)	Fase Aquosa (%)	Fase Aquosa após Reextração (%)
10	98	25
20	110	39
30	105	46
40	103	30
50	90	44
60	94	42

TABELA 24 (B) - COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA G6PDH NA FASE AQUOSA E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICROCOLUNA. CONDIÇÕES: CONDUTIVIDADE: 10 mS/cm E FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,5 PULSO/SEG. RAZÃO ENTRE AS FASES: 1,5.

Tempo de Operação (min)	Fase Aquosa (%)	Fase Aquosa após Reextração (%)
10	127	2
20	112	0
30	117	8
40	110	0
50	100	8
60	97	10

6 – CONCLUSÕES

No presente estudo foi proposto a utilização de uma microcoluna com campânulas pulsadas para a extração líquido – líquido da glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando micela reversa.

Com base nos resultados experimentais obtidos, dentro da faixa de operação trabalhada, podemos concluir que:

- Com a utilização do sistema AOT em isooctano, as extrações de G6PDH apresentaram baixos valores de rendimento em atividade total recuperada;
- O máximo rendimento em atividade da G6PDH, com a utilização do tensoativo CTAB foi de 14,04 %;
- Não houve reprodutibilidade dos resultados em batelada no processo contínuo;
- A utilização da microcoluna com campânulas pulsadas resultou em altos valores de rendimento em atividade.
- O máximo rendimento em atividade da G6PDH, usando o extrato enzimático bruto na microcoluna de campânulas pulsadas, foi de 46 %, obtida nas condições: condutividade na fase aquosa de 7 mS/cm e razão entre as fases aquosa/orgânica de 0,6.
- A metodologia estatística empregada no trabalho foi de extrema importância, pois determinou quais as variáveis significativas no processo de extração e suas interações, além de determinar os modelos matemáticos que representam o processo de extração líquido - líquido de G6PDH por micela reversa numa microcoluna de campânulas pulsadas nas condições otimizadas.
- Aplicando-se as melhores condições previstas pelo modelo, pode-se sugerir que as dimensões das micelas reversas foram suficientes para acomodar a enzima.

7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar outros tensoativos substitutos para os tensoativos aniônicos – AOT e catiônicos – CTAB;
- Realizar experimentos utilizando o tensoativo zwiteriônico – Lecitina de Soja;
- Avaliar novas variáveis operacionais e geométricas de modo a expandir o conhecimento do extrator;
- Desenvolver correlações para a predição do comportamento do sistema;
- Analisar economicamente o custo do processo e estudar a reciclagem dos produtos formadores das fases inferior e superior utilizadas na microcoluna.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. Selective separation and purification of two Lípases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 38, p. 1302 – 1307, 1991.
- Asejo, J.A. Separation Processes in Biotechnology. New York: Marcell Dekker, 801p., 1990.
- Bachmann, P.A., Walde P., Luisi P.L., Lang J., Self-replicationg micelles-aqueous micelles and enzymatically driven reations in reverse micelles, **Journal Am. Chem. Soc.**, v. 113, p. 8204 – 8209, 1996.
- Bassi, A.B., Tang, D.Q., Bergougnou, M.A. 1999. Mediated, amperometry biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6-phosphate dehydrogenase, Mg^{+2} Ions, tetracyanoquinodimethane, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste. **Analytical Biochemistry**, Baltimore, v. 268, n. 2, 223 – 228, 1996.
- Bergmeyer, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**, 3ed., Weinheim: Verlag Chemie, 1983. p. 190 – 197.
- Beutler E., Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism, **Plenum**, New York, p. 23 – 167, 1978.

- Boross, L; Simon, M; Kotorman, M; Szajani, B. Characterization and analytical application of glycolytic enzymes immobilized covalently on 'Akrilex' carrier. In: Eur. Congr. Biotechno. v. 2, p. 331, 1987.
- Box, G.E.P., Hunter, G.W., Hunter, J.S., Statistics for experimenters – An introduction to design, data analysis, and model building, New York: John Wiley & Sons, 653p., (1978).
- Brandão, M.S.B. Substâncias Tensoativas. **Biotecnologia**, Brasília, n. 8, 1999. Disponível em: [http:// www.biotecnologia.com.br](http://www.biotecnologia.com.br). Acesso em 16/12/2001.
- Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. Reversed micelles in liquid-liquid extraction. In Recovery Process for Biological Materials, p.247-271. KENNEDY, J.F. and CABRAL, J.M.S. (Eds.). John Wiley & Sons, U.K. 1993.
- Carceiro-da-Cunha, M.G., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S., Tambourgi, E.B. Recovery of a recombinant cutinase with reversed micelles in continuous perforated rotating disc contator. **Biotechnology Techniques**, London, v. 8, p. 413 – 418, 1994.
- Carvalho, C.M.L., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S. A continuous membrane bioreactor for ester synthesis in organic media: Operational characterization and stability, **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 2000.

- Carvalho, C.M.L., Cabral J.M.S., Reverse micelles as reaction media for lipases, **Biochimie**, London, v. 82, p. 1063 – 1085, 2000.
- Castro, M.J.M, Cabral J.M.S. Reversed micelles in biotechnological processes. **Biotechnology Advances**, New York, v. 6, p. 151 – 167, 1988.
- Chang, Q.L., Chen, J.Y. Selective recovery of two enzymes from *Bacillus subtilis* using Aliquat 336 reversed micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 56, p. 197 – 204, 1996.
- Chatel, S., Vqirin, A., Luciani, A.; Artaud, J. 1996. Starch identification and determination in sweetened fruit preparations. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, s.l., v. 44, n. 2, p. 502 – 506, 1996.
- Cortez EV, Pessoa Jr A., Xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**, New York, v. 35, n. 3 – 4, p. 277 – 283, 1999.
- Dekker, M.; Hilhorst, R.; Laane, C., Isolation enzymes by reversed micelles. **Analytical Biochemistry**, Baltimore, v. 178, p. 217 – 26, 1989.
- Dungan, S.R.; Bausch, t; Hatton, T.A.; Plucinski, P.; Nitsch, W. Interfacial transport processes in the reversed micellar extraction of proteins. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1, 33 – 50, 1991.

- Ellison B.S., The purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*;
<http://www.bio.davidson.edu/biology/student/Ellison/thesistext.html>, Honor Thesis, 1997.
- Freeman K.S., Lee S.S., Kiserow D.J., McGown L.B., Increased chymotrypsin activity in SOT/bile salt reversed micelles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 207, p. 344 – 348, 1998.
- Furusaki, S., Kishi, K., Extraction of amino acids by reversed micelles, **Journal Chemical Engineering Japan**, p. 91 – 93, 1990.
- Godfrey, T., West, S. Industrial Enzimology, Mac Millan Press, United Dington, 2º edição, 1996.
- Goto M., Ono T., Nakashiro F., Hatton T. A., Desingn of surfactants suitable for protein extraction by reversed micelle, **Biochemistry and Engineering**, New York, v. 54, p. 91 – 102, 1992.
- Gupte, A.; Nagarajan, R.; Kilara A., Enzyme reations in reverse micelles, in: Charalambous G. (Ed.), Food Flavours: Generation, analysis and process influence, Elsevier, Amsterdam, pp. 74. 1995.

- Hasmann, F.A.; Pessoa Jr., A.; Roberto, I.C., Optimization of pH and temperature for β -xylosidase recovery by reversed micelles. **Biotechnology Techniques**, London, v. 13, p. 239 – 242, 1999.
- Hasmann, F.A. Extração Líquido-Líquido de β -xilosidase por micelas reversas. Lorena, FAENQUIL, 2000 (Tese de Mestrado).
- Hasmann, F.A.; Pessoa Jr., A.; Roberto, I.C., β -xylosidase recovery by reversed micelles: use of cationic surfactant, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 84 – 86, p. 1101 – 1111, 2000.
- Hasmann, F.A.; Pessoa Jr., A.; Roberto, I.C., Screening of variables in β -xylosidase recovery using cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 91 – 93, p. 719 – 728, 2001.
- Hasmann, F.A.; Cortez, D.V., Roberto, I.C., Pessoa –Jr, Optimization of beta-xylosidase recovery by reversed using response surface methodology, **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 6, p. 153 – 160, 2003.
- Hatton, T.A. Reversed micellar extraction of proteins. In SCAMEHORN, J.F., HORWELL, J.H. (AEDS). **Sufactant-Based Separation Process**, New York, v. 33, 55 – 90, 1989.

- Hayes D.G., Gulari E., Improvement of enzyme activity and stability for reverse micellar-encapsulated lipase in the presence of short-chain and polar alcohols, **Biocatalysis** v. 11, p. 223 – 231, 1994.
- Heyer N.I., Woodward J., Efficient hydrogen production using enzymes of the pentose phosphate cycle, Proceedings DOE Hydrogen Program Review, NREL/CP-570-30535, 2001.
- Hentsch, M., Menoud, P., Steiner, L., Flaschel, E., Renken, A. Optimization of the surfactant (AOT) concentration in a reverse micellar extraction process. **Biotechnology Techniques**, Keue, v. 6, n. 4, p. 359 – 354, 1992.
- Hilhorst, R., Segeeva, M., Heering, D. Rietvekd, P., Fijneman, P., Wolbert, R.B.G., Deller, M., Bijterbosh, B.H. Protein extraction from aqueous phase into a reversed micellar phase: effect of water content and reversed micellar composition. **Biotechnology and Engineering**, New York, v. 4, p. 375 – 387, 1995.
- Hou M.J., Kim M., Shah D. A light scattering study on the droplet size and interdroplet interaction in microemulsions of AOT-OIL-WATER system **Journal Colloids Interfacial Science**, v. 123, p. 398 – 412, 1988.
- Holmberg, K., Natural surfactants, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, p. 148 – 159, 2001.

- Huang, S-Y., Lee, Y-C. Separation and purification of horseradish peroxidase from *Armoracia rusticana* root using reversed micellar extraction. **Bioseparation**, Dordrecht, v. 4, p. 1 – 5, 1994.
- Ihara, T., Suzuki, N., Maeda, T., Sagara, K., Hobo, T., Extraction of water-soluble vitamins from pharmaceutical preparations using AOT (sodium di-2,2 ethylhexyl sulfosuccinate)/ pentane reversed micelles. **Chemical Pharmaceutical Bulletins**, v. 43, n° 4, p. 626 – 630, 1995.
- Kadam, K.I. Reversed micelles as a bioseparation tool. **Enzyme Microbiology and Technology**, Surrey, v. 8, p. 266 - 273, 1986.
- Kaplan, A.; Jack, R.; Opheim, K.; Toivola, B.; Lyon, A. Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques. Williams & Wilkins, Malvern, 4 th ed., 1995.
- Kilikian, B.V., Bastazin, M.R., Minami, N.M., Gonçalves, E.M.R., Pessoa Junior, A. Liquid-liquid Extraction by Reversed Micelles in Biotechnological Process, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 17, p.29-38, 2000.
- Krei, G.A., Hustedt, H. Extraktion von Enzymen Mittels Reverser Mizellen. **Bioengineering**, v. 3-4, p. 32-41, 1989.
- Krei, G.A., Hustedt, H. Extraction of Enzymes by Reverse Micelles. **Chemical Engineering Science**, New York, v. 47, n. 1, p.99-111, 1992.

Lehninger, A.L. Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, p. 126 – 145., 1976.

Leodidis, E.B., Hatton, T.A., Amino acids in AOT reversed micelles. Determination of interfacial partition coefficients using the phase-transfer method, **Journal Physical Chemistry**, v. 64, p. 6400 – 6411, 1990.

Levy, H.R. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biochem. Soc. Trans**, v. 17, p. 313 – 315, 1988.

Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., Randall, R. J., Protein measurement with the Folin-phenol-reagent, **Journal Biotechnology**, v. 193, p. 265 – 375, 1959.

Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P., Robinson, B.H. Reversed micelles as hosts for proteins and small molecules. **Biochimica et Biophysical Acta**, v. 947, p. 209 - 246, 1988.

Luzzatto, L.; Mehta, A. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase deficiency. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Vale, D. eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Mc Graw Hill, New York, 7 th ed., 1995.

Martinek, K., Klyachko, N.L., Kabanov, A.V., Khmelnitsky, YIL., Levashov, A.V., Micellar enzymology: its relation to membranology, **Biochimica et Biophysical Acta**, v. 981, p. 161 – 172, 1989.

- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Khmelnitsky, YIL., Berezin, I.V., Micellar enzymology, **Europe Journal Biochemistry**, Berlin, v. 155, p. 543 – 468, 1986.
- Matzke, S.F., Creagh, A.L., Haynes, C.A., Prausnitz, J.M., Blanch, H.W., Mechanisms of Protein Solubilization in Reversed Micelle, **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 40, p. 91 – 102, 1992.
- Maniasso, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 87 – 93, 2001.
- Meier P., Imre V.E., Fleschar M., Luisi P.L., Further investigations on the micelar solubilization of biopolymers in apolar solvents, inurfactants in solution, vol. 2, **Plenum Press**, New York, pp 1012, 1984.
- Meyer, U. Extraktion von Enzymen Mittels Inverser Mizellen. Braunschweig: Technische Universität Braunschweig, 58p., 1992. (Dissertação de Graduação).
- Morgado, M.A.P., Cabral, J.M.S., Prazeres D. M>F>, Phospholipase A2-catalised hydrolysis of lecithin in a continuous reverse micelar membrane bioreactor, **Journal Am. Oil Chemical Society**. v. 73, p. 337 – 346, 1996.
- Moro, J. R. Extração de tripsina numa microcoluna agitada por campânulas pulsadas. Campinas: UNICAMP, 102 p., 1999. (Tese de Mestrado).

- Neto, E.C.; Weber, L.; Brites, A. Deficiência de Glicose-6-Fosfato-Desidrogenas: Qual a Incidência no Brasil? **Laes Haes**, São Paulo, n. 120, p. 126 – 136. 1999.
- Özer N., Bilgi C., Ögüs, H.I., Dog liver Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase: purification and kinetic properties, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 34, p. 253 – 262, 2002.
- Patel, M.T., Nagarajan, R., Kilara, A. Interactive influence and optimization of reaction parameters in the hydrolysis of olive and coconut triacylglycerols by *C. cylindracea* and *R. javanicus* lipases in reverse micellar media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 59, p. 109 – 124, 1996.
- Parellada J., Narváez A., López M.A., Domingues E., Fernández J.J., Pavlov V., Katakis I., Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications, **Analytica Chimica Acta**, v. 362, p. 47 – 57, 1998.
- Pessoa Junior, A., Vitolo, M. Recovery of inulinase using BDBAC reversed micelles. **Process Biochemistry**, New York, v. 33, n. 3, p. 291 – 97, 1998.
- Pires, M.J., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. Liquid-liquid extraction of protein with reversed micelles. **Biotechnology Progress**, New York, v.12, p.290 - 301, 1996.

- Rabelo, A.P.B. Estudo e desenvolvimento de uma microcoluna de campânulas pulsantes para a purificação de proteínas. Campinas: UNICAMP, 1999. 213p. (Tese de Doutorado).
- Rangel-Yagui, O. Sistemas micelares de duas fases aquosas aplicados à purificação de enzimas. São Paulo, USP/FCF, 2003 (Tese de Doutorado).
- Rees, G.D., Robinson, B.H., Stephenson, G.R., Macrocyclic lactone synthesis by lipases in water-in-oil microemulsions, **Biochimica et Biophysica Acta** 1257, p. 239 – 248, 1995.
- Regalado, C., Asenjo, J.A., Pyle, D.L. Studies on the purification of peroxidase from horseradish roots using reversed micelles. **Enzyme Microbial and Technology**, Surrey, v. 18, p. 332 – 339, 1996.
- Ribeiro, M.A. Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas. São Paulo, USP/FCF, 2001 (Tese de Mestrado).
- Rodrigues, E.M.G. Extração líquido-líquido de xilanase por micela reversa. Lorena: FAENQUIL, 1997. 90p. (Tese de Mestrado)
- Rodrigues, E.M., Milagres, A.M.F., Pessoa, Jr. A. Selective recovery of xylanase from *Penicillium janthinellum* using BDBAC reversed micelles. **Acta Biotechnology**, v. 19, p.157 - 161, 1999.

Rodrigues, E.M.G, Tambourgi, E.B., Continuous extraction of xylanase from *Penicillium janthinellum* with reversed micelles using experimental design mathematical model. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 365 – 367, 2001.

Seoud, O.A., Sanctis, D.S., Palma, E.J. **Tensoativos: química e aplicações em cosméticos e detergentes**. São Paulo: ABQ, 1999. (Apostila do Curso de Tensoativos).

Severo, L.G., Determinação da atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase em eritrócitos humanos. São Paulo: FCF/USP, 1979, 68p (Tese de Mestrado).

Serralheiro M.L.M., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S., Continuous production and simultaneous precipitation of a dipeptide in a reversed micellar membrane reactor, **Enzyme Microbiology and Technology**, New York, v. 24, p. 507 – 513, 1999.

Solomons, T.W.G. Química Orgânica. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v. 2, 6 ed., 1996.

Souza, M.A., Ribeiro, M.Z., Silva, D.P., Pessoa Junior A., Vitolo M., Effect of pH on the stability of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 98 -100, p. 265 - 273, 2002.

- Sun, Y., Bai, S., Gu, I., Tong, X-D., Ichikawa, S., Furusaki, S. Effect of hexanol as a cosolvent on partitioning and mass transfer rate of protein extraction using reversed micelles of CB-modified lecithin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 9 – 16, 1999.
- Vought, V., Ciccone, T., Davino, M.H., Fairbairn, L., Lin, Y., Cosgrove, M.S., Adams, M.J. Delineation of the roles of amino acids involved in the catalytic functions *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry**, Washington, D.C., v. 12, n. 49, p. 15012 15021, 2000.
- Walde P., Luisi P.L., Detection of water in lipase-catalyzed reactions in reverse micelles as studied by infrared spectroscopy, **Biocatalysis** 3,0p. 381 – 383, 1989.
- Wang W., Weber M.E., Vera J.H. Effect of alcohol and salt on water uptake of reverse micelles formed by dioctyldimethyl ammonium chloride in isooctane, **Journal Colloids Interfacial Science**, v. 207, p. 344 – 348, 1994.
- Warburg, O., Christian, W., Über aktivierung der Robisonschen Hexose-Monophosphorsaure in rotten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösunge, **Biochemistry**, London, v. 242, p. 206 – 227, 1931.
- Whitaker, J.R. **Enzymes in Analytical Chemistry**. In: FOX, P.F. ed, Food Enzymology. New York: Elsevier Science Publishers, v. 2, 378p. 1991.

Yoshida, A., Hemolytic anemia and G6PD deficiency, **Science**, v. 179, p. 532 – 537, 1973.

Zaitzeva, E.A., Chukrai, e.s., Poltorak, O.M. Thermostability of yeast hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 61, p. 67 – 74, 1997.

Zamarro, M.T., Domingo, M.J., Ortega, F., Estrada, P. Recovery of cellulolytic enzymes from wheat-straw hydrolysis broth with dioctyl sulphosuccinate/iso-octane reverse micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 23, p. 117 – 125, 1996

Zinkham, W.H., Lenhard-Jr., R.E., Childs, B., A deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes from patients with favism. **Bull. Johns Hopkins Hospital**, v. 102, p. 169 – 175, 1958.