UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA - FEQ Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SAL VOLÁTIL CARBAMATO DE AMÔNIO SOBRE A ESTABILIDADE DE ENZIMAS

Lucimara Lopes da Silva

ORIENTADOR:	Prof. Dr. Everson Alves Miranda
CO-ORIENTADOR:	Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessôa Filho
	DEQ - Escola Politécnica da USP

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo Agosto de 2008

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

Si38a	Silva, Lucimara Lopes da Avaliação do efeito do sal volátil carbamato de amônio sobre a estabilidade de enzimas / Lucimara Lopes da SilvaCampinas, SP: [s.n.], 2008.
	Orientadores: Everson Alves Miranda, Pedro de Alcântara Pessôa Filho. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	1. Eletrólitos. 2. Estabilidade. 3. Precipitação (Química). 4. Enzimas. I. Miranda, Everson Alves. II. Pessôa Filho, Pedro de Alcântara . III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Titulo em Inglês: Evaluation of the effect of ammonium carbamate on the stability of enzymes Palavras-chave em Inglês: biosseparation, Volatile electrolyte, Stability, Precipitation Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos Titulação: Mestre em Engenharia Química Banca examinadora: Everson Alves Miranda, Sônia Maria Alves Bueno, Carlota de Oliveira Rangel Yagui Data da defesa: 15/08/2008 Programa de Pós Graduação: Engenharia Química Dissertação de Mestrado defendida por Lucimara Lopes da Silva e aprovada em 15 de agosto de 2008 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

loni

Prof. Dr. Sônia Maria Alves Bueno

.

(yaputtana Prof. Dr. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Lucimara Lopes da Silva e aprovada pela comissão julgadora em 15 de agosto de 2008.

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Ao Alessandro pelo amor e dedicação; aos meus pais Luciano e Maria Aparecida pelo incentivo e carinho; aos meus avós Orlando e Trindade pelas orações, pelo exemplo de caráter e por me mostrar a importância da escola desde cedo e à minha irmã Luciana pela cumplicidade, amizade e pelos sonhos e segredos compartilhados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me orientou em todas as decisões da vida, inclusive na escolha de fazer o mestrado, agradeço pela dádiva da minha existência e por mais esta oportunidade.

Ao Alessandro, pelo amor e dedicação, por se orgulhar de mim em tudo e sempre, por me ensinar a superar desafios pessoais e profissionais, ajudando-me no crescimento como um todo. Obrigado meu anjo por estar tão perto de mim, de modo que em meio às preocupações, eu podia ouvir sua doce voz e sorrir. Obrigado por me tornar uma pessoa sempre melhor.

Aos meus pais, Luciano e Maria Aparecida, e minha irmã Luciana, pelo carinho e amizade, pelo apoio e ajuda em todos os momentos e pela superação dos desafios financeiros para que eu pudesse estudar. Aos meus avós Orlando e Trindade por todo incentivo e auxílio. Sou muito grata a Deus por ter me dado de presente vocês como família.

Às minhas amigas Christhianna, Cristiane, Letícia e Rubiane, por todo auxílio e companheirismo, e à amiga Sandra por ter me recebido como uma irmã. Obrigado demais.

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda, pela orientação. Obrigado pela paciência e compreensão, pelo incentivo e confiança e por ter sido amigo e conselheiro, além de professor.

Ao Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessôa Filho, pela co-orientação. Sou muito grata por toda ajuda e sugestões dadas, pela atenção dispensada quando solicitada e por estar sempre disposto a ajudar. Obrigado.

Ao Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed (*in memorian*), que iniciou esta linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Martín Aznar, FEQ-UNICAMP, por ter gentilmente emprestado o aparelho de liofilização, deixando-o à disposição no nosso laboratório.

À Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho da Costa, do Laboratório de Bioprocessos da FEQ-UNICAMP, por ter disponibilizado a enzima celulase e outros materiais.

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Durrant e aos técnicos Emerson C. Amaro e Beatriz Christiane Melo, FEA-UNICAMP, pela doação da enzima peroxidase e de reagentes necessários aos ensaios de atividade.

À Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno e ao Dr. Adriano Rodrigues Azzoni pelas sugestões dadas no exame de qualificação que muito colaboraram na continuidade e finalização da tese. À Prof^a. Dr^a. Sônia por também disponibilizar seu laboratório para a execução de experimentos.

À Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes pelo uso de reagentes de seu laboratório e por disponibilizar seu laboratório para a execução de experimentos.

Aos colegas de laboratório da Unicamp: Ana Paula, Cristiane, Gisele, Goran, lara, Igor, Itiara, Juliana e Lidiana por compartilhar das mesmas horas no ambiente de trabalho e, em especial, à Érika pela ajuda e discussões sobre o trabalho.

Aos colegas Cristiane, Eugênio, Gisele, Iara, Igor, Itiara, Juliana e Rafael pelos momentos de descontração.

À Dr^a. Cristiane Sanchez Farinas, da Embrapa Instrumentação Agropecuária, pela doação da hidroxipropilmetilcelulose.

Aos demais colegas da FEQ: Amanda e Paula pela ajuda e, em especial, à colega Sarita do Laboratório de Bioprocessos da FEQ-UNICAMP pela assessoria nos ensaios de atividade da enzima celulase.

Pelo suporte financeiro dado pela FAPESP e pela CAPES a este projeto de pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se tornasse possível, meu muito obrigado.

"Todas as coisas vêm única e exclusivamente de Deus. Tudo vive por Seu poder e tudo é para Sua glória. A Ele seja a glória para todo o sempre." Romanos 11.36

'Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima'. Louis Pasteur

Todos os progressos realizados pela humanidade foram obtidos após várias tentativas fracassadas. Raríssimas vezes foi possível chegar-se a resultado satisfatório à primeira tentativa. Os fracassos repetidos são os marcos lançados no caminho de toda e qualquer realização. Só não fracassamos na última tentativa: a de que saímos vitoriosos.

Charles F. Kettering

SUMÁRIO

ABSTRACTx
LISTA DE TABELASxi
LISTA DE FIGURASxii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕESxiv
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO1
1.1. Precipitação como técnica de RPB1
1.2. Colocação do problema4
1.3. Objetivo
1.4. Etapas executadas6
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA9
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA9 2.1. Precipitação de proteínas9
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA9 2.1. Precipitação de proteínas9 2.2. Precipitação de proteínas com uso de sais10
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.4.3. Celulase	25
2.4.4. Peroxidase	30
2.4.5. Lipase	31
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Materiais	33
3.1.1. Enzimas	33
3.1.2. Reagentes químicos	35
3.1.3. Outros materiais e equipamentos	35
3.2. Procedimentos	36
3.2.1. Determinação da concentração das proteínas	36
3.2.2. Preparo das soluções de sal volátil	37
3.2.3. Determinação das atividades enzimáticas	37
3.2.3.1. α-Amilase	37
3.2.3.2. Lisozima	38
3.2.3.3. Celulase	39
3.2.3.4. Peroxidase	40
3.2.3.5. Lipase	41
3.2.4. Determinação das faixas de variáveis-respostas operacionais nas dosagens de atividades enzimáticas	42
3.2.5. Análise de perfil protéico por eletroforese SDS-PAGE	43
3.2.6. Efeito dos sais na medida da concentração de α -amilase por A _{280 nm}	43
3.2.7. Determinação da estabilidade das proteínas em solução de sais	44

3.2.8. Efeito de diferentes íons e do processo de liofilização na estabilidade da	
peroxidase	45
3.2.9. Precipitação das enzimas e determinação de seus balanços de massa e	
de atividade	46

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1. Análise dos perfis protéicos por eletroforese SDS-PAGE	48
4.2. Efeito do carbamato de amônio na atividade catalítica das enzimas	. 51
4.3. Efeito dos sais convencionais na estabilidade da celulase e peroxidase	. 56
4.4. Efeito de diferentes íons e do processo de liofilização na estabilidade da peroxidase	58
4.5. Precipitação das enzimas com sal volátil	60
4.6. Balanços de massa e atividade para as enzimas celulase e peroxidase	66

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	.71
5.1. Conclusões	. 71
5.2. Sugestões para trabalhos futuros	. 72

/	^	,	
CAPITIII O 6	. REFERENCIAS E	RIBLIOCRAFICAS	74
CALIFOLO 0 -		JIDLIOUKAPICAS	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••

APÊNDICE 1	.89
A1.1. Determinação da concentração de proteína	89
A1.1.1. Método de Bradford	.89
A1.1.2. Método de A _{280 nm}	.91
	vii

A1.2.	Curvas padrão para	determinação d	de açúcar e de ácido	oléico94
-------	--------------------	----------------	----------------------	----------

APÊNDICE 2	.96
Verificação da influência dos sais carbamato de amônio e sulfato de amônio na	
determinação da concentração de α-amilase	96

APÊNDICE 3	101
Determinação das faixas de variáveis-respostas na determinação de atividades enzimáticas	101
A3.1. α-Amilase	101
A3.2. Lisozima	102
A3.3. Celulase	103
A3.4. Peroxidase	105
A3.5. Lipase	106

APÊNDICE 4	
Teste-t de Student para comparação entre amostras	

RESUMO

A precipitação de proteínas com sais é uma etapa de purificação freqüentemente encontrada em bioprocessos. Porém, a necessidade de um tratamento posterior para recuperação do sal e purificação da proteína torna o processo de precipitação com sais convencionais oneroso, além de limitado por questões ambientais. A precipitação com sais voláteis é uma alternativa à precipitação convencional, tendo como principal vantagem a fácil remoção destes sais dos precipitados e efluentes líquidos através da elevação da temperatura ou diminuição da pressão. A indução do "salting-out" de proteínas por estes sais para foi inicialmente investigada por nosso grupo de pesquisa, no entanto, algumas proteínas apresentaram indícios de desnaturação, embora a eficiência da precipitação tenha sido verificada. Para esclarecer esta questão, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do sal volátil carbamato de amônio na atividade de cinco enzimas (α-amilase, lisozima, celulase, peroxidase e lipase). Realizaram-se ensaios mantendo-se as enzimas a 4,0°C por 60 min em soluções 1,0 a 5,0 molal deste sal. Depois da remoção do sal volátil, as massas secas foram dissolvidas em tampões apropriados e estas soluções tiveram sua concentração de proteína e atividade enzimática determinadas. Experimentos similares com sais convencionais também foram feitos, assim como ensaios de precipitação com carbamato de amônio em forças iônicas de 5,0 a 9,0 molal. α-Amilase, lisozima e lipase não tiveram perda de atividade em soluções salinas de 1,0 a 5,0 molal, enquanto que celulase e peroxidase mostraram uma perda de atividade média de 55% e 44%, respectivamente. Análises dos experimentos similares com sulfatos de amônio e de sódio levam à conclusão que estas duas enzimas desnaturaram em presença do sal volátil carbamato de amônio. Os ensaios de precipitação não mostraram nenhuma desnaturação enzimática ou separação de fases para α-amilase e lipase, enquanto que a celulase e a peroxidase precipitaram com alguma perda de atividade. Os balanços de massa e de atividade determinados para estes casos não permitiram uma conclusão definitiva sobre o efeito do sal volátil sobre estas duas enzimas durante a precipitação.

ABSTRACT

Salting-out is a precipitation method frequently found in downstream processing schemes of proteins. However, the need for post-precipitation treatment for salt recovery and final purification of the protein may lead precipitation with conventional salts to be costly and limited for environmental questions. Precipitation with Volatile salts is an alternative to conventional precipitation, presenting as main advantage the easy salt removal from precipitates and liquid effluents by a temperature increase or a pressure reduction. Protein salting-out induction with these salts was pioneered by our research group. However, there was evidence of some denaturation, although efficient precipitation was verified for all proteins studied. To address this question, the objective of this work was to evaluate the effect of ammonium carbamate volatile salt on the specific activity of five enzymes (an α -amylase, a lysozyme, a cellulase complex, a peroxidase and a lipase). Experiments were made with enzymes kept at 4.0°C for 60 min in solutions 1.0 to 5.0 molal of this salt. After this salt removal, the dried masses were dissolved in appropriate buffers and these solutions had their protein concentration and enzymatic activity measured. Similar experiments with conventional salts were also carried-out which the desalination made by gel permeation columns as well as precipitation assays with ammonium carbamate at ionic strength from 5.0 to 9.0 molal. α -Amylase, lysozyme and lipase did not undergo activity loss in salt solutions from 1.0 to 5.0 molal, whereas cellulase and peroxidase showed an average activity loss of 55% and 44%, respectively. Analysis of similar experiments with ammonium sulfate and sodium sulfate led to the conclusion that these two enzymes denatured with volatile salt ammonium carbamate. The precipitation assays did not show enzyme denaturation or separation of phases for a-amylase and lipase while celullase and peroxidase precipitated with some activity reduction. Mass and activity balances determined for these cases did not allow a definitive conclusion about the effect of ammonium carbamate on these two enzymes during the precipitation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Valores da razão $R_{N/C}$ para soluções feitas a partir de diferentes eletrólitos voláteis $CO_2 - NH_3$
Tabela 2.2: Características das enzimas encontradas no complexo celulásicoproveniente de Trichoderma reesei.28
Tabela 3.1: Características de quatro enzimas estudadas
Tabela 4.1: Atividades específicas (valor médio \pm desvio padrão) para tratamentos de α -amilase, lisozima, celulase, peroxidase e lipase em solução de carbamato de amônio por 60 min a 4,0 °C. Concentrações iniciais das enzimas: α -amilase, lisozima, e peroxidase, 0,200 mg/mL; celulase e lipase, 0,032 mg/mL e 0,400 mg/mL, respectivamente
Tabela 4.2: Atividades específicas (valor médio \pm desvio padrão) da celulase e peroxidase a 4º C por 60 min. Concentrações iniciais da peroxidase e celulase eram 0,20 mg/mL e 0,15 mg/mL, respectivamente
Tabela 4.3: Atividades específicas (valor médio \pm desvio padrão) da peroxidase a 4º C por 60 min em diferentes tampões de valores de pH distintos. Concentração inicial da peroxidase igual a 0,20 mg/mL
Tabela 4.4: Atividades específicas (valor médio \pm desvio padrão) para tratamentos de precipitação das enzimas α -amilase, celulase, peroxidase e lipase em solução de carbamato de amônio por 60 min a 4°C. Concentrações iniciais das enzimas: α -amilase, celulases da Sigma e Novozyme, peroxidase e lipase, 1,65 mg/mL; 0,32 mg/mL; 0,35 mg/mL, 1,53 mg/mL e 1,60 mg/mL, respectivamente.
Tabela 4.5: Balanços de massa e de atividade da celulase precipitada com carbamato de amônio a 4,0ºC, na ausência de HPMC67
Tabela 4.6: Balanços de massa e de atividade da celulase precipitada com carbamato de amônio a 4,0°C, com HPMC68
Tabela 4.7: Balanços de massa e de atividade da peroxidase precipitada com carbamato de amônio a 4,0ºC69
Tabela A2.1: Efeito do sal sulfato de amônio nos parâmetros das curvas padrão de α-amilase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Fluxograma das etapas experimentais deste trabalho7
Figura 2.1: Equilíbrio líquido-vapor de um sistema composto pela fase aquosa e um eletrólito volátil (EDWARDS <i>et al.</i> , 1975)16
Figura 2.2: Estrutura tridimensional da α-amilase proveniente de Bacillus amyloliquefaciens (PDB Code 1E3X). Íons cálcio e íons sódio são mostrados como esferas amarelas e vermelhas, respectivamente24
Figura 2.3: Estrutura tridimensional da lisozima de clara de ovo de galinha (PDB Code 1 AKI)25
Figura 2.4: Estrutura tridimensional das celulase de Trichoderma. reesei. A - EG I (PDB Code 1EG1), B - EG II (PDB Code 1EG2), C - CBH 1 (PDB Code 1CBH), D - CBH II (PDB Code 1CB2)
Figura 2.5: Estrutura tridimensional de uma peroxidase de rabanete (PDB Code 2B12).
Figura 2.6: Estrutura tridimensional de lipase de Humicola lanuginosa (PDB Code 1TIB). 32
Figura 4.1: Perfil eletroforético (SDS-PAGE em gel 15%) de soluções enzimáticas em tampões de atividade. Tampão de desnaturação sem β -mercaptoetanol no gel A e com β -mercaptoetanol no gel B. Pista 1, marcadores de massa molecular; pista 2, solução de α -amilase; pista 3, solução de lisozima; pista 4, solução de celulase de Trichoderma reesei (adquirida da Sigma); pista 5, solução de celulase de Trichoderma reesei (obtida diretamente da Novozyme); pista 6, solução de peroxidase; pista 7, solução de lipase. Revelação feita com nitrato de prata.
Figura 4.2: Esquema de precipitação de E (enzimas de interesse) e de C (contaminantes) em três proporções diferentes. A: com ocorrência de desnaturação de E (esferas sombreadas). B: sem ocorrência de desnaturação de E. AER: atividade específica relativa. Subscritos: p = precipitado, s = sobrenadante64
Figura A1.1: Estrutura do corante Coomassie blue BG-250 (CASTRO, 2006)90
Figura A1.2: Curva padrão para dosagem de proteínas segundo BRADFORD (1976) usando solução de BSA em água como referência90
Figura A1.3: Curva de absorção a 280 nm de solução de α -amilase em tampão fosfato de sódio 20,0 mmol/L com 6,7 mmol/L de cloreto de sódio pH 6,9091
Figura A1.4: Curva de absorção a 280 nm de solução de lisozima em tampão fosfato de potássio 66,0 mmol/L pH 6,2492
xii

Figura A1.5: Curva de absorção a 280 nm da solução de celulase em tampão citrato 50 mmol/L pH 4,8092
Figura A1.6: Curva de absorção a 280 nm da solução de peroxidase em tampão fosfato de potássio 100 mmol/L pH 6,093
Figura A1.7: Curva de absorção a 280 nm da solução de lipase em tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,093
Figura A1.8: Curva padrão de açúcar redutor em termos de glicose para ensaios de atividade de α -amilase, conforme método de SUMNER (1921)94
Figura A1.9: Curva padrão de açúcar redutor em termos de glicose para ensaios de atividade de celulase, conforme método de MILLER (1959)95
Figura A1.10: Curva padrão de concentração de ácido oléico relacionada com o volume de solução de KOH 50 mmol/L necessária para sua neutralização95
Figura A2.1: Curva de absorbância a 280 nm em função da concentração de sal sulfato de amônio. Concentração de α-amilase = 0,04 mg/mL97
Figura A2.2: Influência da concentração de sulfato de amônio no coeficiente de absorção a 280 nm para soluções de α-amilase em tampão fosfato de sódio a pH 6,9.
Figura A2.3: Absorbância a 280 nm de soluções de α -amilase 0,04 mg de proteína/mL em função da concentração de carbamato de amônio99
Figura A3.1: Atividade específica da α-amilase em tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 6,9 a 20 °C em função da diluição da solução estoque de 4,00 mg de proteína/mL.
Figura A3.2: Determinação da variável resposta taxa de consumo de substrato dada em termos de ($\Delta A_{450}/\Delta t$) e sua relação com a atividade específica da lisozima em tampão fosfato de potássio 60 mmol/L pH 6,24 a 25 °C
Figura A3.3: Relação entre a concentração de glicose liberada pela celulase e a concentração protéica da preparação de celulase utilizada no ensaio
Figura A3.4: Atividade específica da enzima peroxidase em função da diferença de absorbância (ΔA_{420} nm) entre o tempo inicial e o tempo de 20 s
Figura A3.5: Determinação da atividade específica da lipase em tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0 a 37 °C em função da diluição da solução estoque de 19,00 mg de proteína/mL106
Figura A4.1: Algoritmo de realização do teste estatístico107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

- RPB Recuperação e purificação de bioprodutos
- IgG Imunoglobulina G
- SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
- HPMC Hidroxipropilmetilcelulose
- S Solubilidade da proteína em solução (mg·mL⁻¹)

 S_o – Solubilidade da proteína em água nas mesmas condições de temperatura e pressão da determinação de S (mg·mL⁻¹)

- γ Coeficiente de atividade da proteína
- K_s Constante de "salting-out" para curva logarítmica com base decimal

I – Força iônica

- m(i) Molalidade da espécie i em solução (mol kg⁻¹)
- z_i Carga elétrica do íon

β - Constante relacionada ao logaritmo de base decimal da solubilidade da proteína associada ao modelo de Debye-Hückel para a solubilização de espécimes iônicas em soluções salinas concentradas

 Λ - Termo relacionado ao "salting-in" intrínseco em K_s, oriundo do modelo de Kirkwood para a solubilização de um dipolo neutro

 Ω – Termo relacionado ao "salting-out" intrínseco em K_s; dependente da área hidrofóbica superficial da proteína (Φ) e inversamente proporcional à temperatura (T)

 σ – Incremento na tensão superficial da solução com o aumento da molalidade do sal

- D Constante de proporcionalidade para determinação de Λ , dependente da proteína
- M Momento dipolo da proteína
- R Constante universal dos gases ideais
- T Temperatura em Kelvin

P - Pressão

- R_{N/C} Razão entre as molalidades totais de nitrogênio e carbono total
- BSA Albumina de soro bovino
- CO "Contact order", ordem de contato
- CBHs Celobioidrolases
- EGs Endoglucanases
- CBD "Cellulose binding domain", domínio de ligação à celulose
- BGL β -Glicosidase ou celobiase
- PDB "Protein data bank", banco de dados de proteínas
- CMC Grupo carboximetílico
- HEC Grupo hidroxietílico
- DNS "Dinitrosalicilic acid", ácido dinitrosalicílico
- AER Atividade específica relativa
- CD "Circular dichroism", dicroísmo circular
- DLS Espalhamento de luz dinâmico
- DSC Calorimetria diferencial de varredura
- HRP "Horseradish peroxidase", peroxidase de rabanete

a²⁸⁰mg/ml – Coeficiente de absorção para o comprimento de onda de 280 nm (cm²·mg⁻¹)

- C Concentração da enzima (mg·mL⁻¹)
- V_{Total} Volume total do meio reacional (mL)
- V_{Enzima} Volume de enzima (mL)
- D Fator de diluição da solução enzimática estoque
- FPU "Filter paper units", Unidades de papel de filtro

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Neste primeiro capítulo é apresentada uma descrição sucinta sobre as operações de Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB) com enfoque no fenômeno de precipitação de proteínas. A seguir, tem-se a colocação do problema estudado, o objetivo deste trabalho e finalmente as etapas executadas para alcançar este objetivo.

1.1. Precipitação como técnica de RPB

O desenvolvimento de novos métodos e técnicas de separação e purificação de bioprodutos tem sido essencial para os avanços recentes da área de pesquisas biotecnológicas. O potencial de aplicação ou uso final de um bioproduto irá depender do nível de pureza do mesmo, como por exemplo: alto grau de pureza é requerido para aplicações terapêuticas ou estudos de estrutura e função de proteínas e baixo grau de pureza para aplicações industriais como no caso de indústria de alimentos ou detergentes domésticos (QUEIROZ *et al.*, 2001). Entre os bioprodutos, as enzimas apresentam uma variedade de aplicações, desde o uso terapêutico e em tratamentos estéticos corporais, até sua utilização na indústria de alimentos para consumo humano e animal. Entretanto, independente da forma de produção, as enzimas não são obtidas puras e a purificação constitui uma etapa complexa do processo de produção das mesmas devido às características dos meios e da complexidade e variedade das biomoléculas de interesse e contaminantes (PESSOA JUNIOR, 2005). Devido a isso, uma extensa seqüência de etapas de separação conhecida como Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB) ou "Downstream Processing", deve ser utilizada para

que se obtenha o produto desejado a partir de uma mistura, no nível de pureza requerido para cada aplicação. Atualmente, há uma série de limites impostos à RPB, dentre as quais estão as dificuldades encontradas nas estruturas de processos existentes, que requerem uma resposta proporcional dos equipamentos e infra-estrutura disponíveis (LOW et al., 2007). Dentre estas dificuldades pode-se citar o gerenciamento de todas as variáveis do processo, o alcance das características desejáveis do produto final e a seleção de tecnologias de separação eficientes para atingir estas características (KELLER et al., 2001). Estes limites tornam a RPB o conjunto de etapas mais complexo e caro de um bioprocesso, podendo atingir até 80% do custo de produção no caso específico de fármacos (CLONIS et. al., 2006). Assim, estratégias que incluem reduzir o número de etapas no processo de purificação e formas alternativas de operações unitárias de RPB têm sido desenvolvidas com o intuito de reduzir o custo dos produtos. Entre essas novas alternativas inclui-se o uso do leito móvel simulado, métodos de cromatografia em membrana e métodos não cromatográficos como a floculação, precipitação, cristalização e sistemas de duas fases aquosas.

O objetivo global da purificação de biomoléculas não é somente a remoção de contaminantes indesejados, mas também a concentração da proteína desejada e sua transferência para um ambiente onde ela seja estável e pronta para a aplicação a que se destina (QUEIROZ *et al.*, 2001). Entre as operações de RPB, a precipitação está presente em mais de metade dos processos e tem a característica de concentrar em alto grau a molécula de interesse, sendo geralmente utilizada no início da RPB, entre uma primeira etapa de separação de sólido-líquido e uma primeira etapa de prépurificação, antes da etapa de purificação final de alta resolução (BONNERJEA *et al.*, 1986) ou como última etapa para gerar o produto na forma sólida. Além disso, a precipitação é menos afetada por interferentes não protéicos do que procedimentos de adsorção e cromatografia (LADISCH, 2001) e é de relativo baixo custo.

Os métodos de precipitação podem variar em seletividade devido à dificuldade na lavagem do precipitado ou devido à co-precipitação de contaminantes, mas em geral oferecem condições de serem projetados como uma operação de alta capacidade (LOW *et al.,* 2007), sendo que aproximadamente 80% dos procedimentos de purificação

utilizam no mínimo uma etapa de precipitação (ENGLARD e SEIFTER, 1990). Desvantagens da precipitação são as possibilidades de baixo rendimento se o produto desnaturar durante o processo e dificuldade de remoção do agente precipitante (LOW *et al.,* 2007), a geração de grandes volumes de efluentes se solventes orgânicos são utilizados, a necessidade de se recuperar os agentes de precipitação (no caso de solventes orgânicos por exemplo), a toxidez de alguns agentes precipitantes, etc.

No caso da precipitação por adição de sal, uma desvantagem é a existência de sal em ambas as fases formadas. O sistema bifásico formado é constituído de uma fase líquida concentrada em eletrólito e uma fase composta que contém a proteína precipitada com grande proporção de fase líquida salina, podendo também conter sal na fase sólida intrinsicamente ligado a ela (WATANABE *et al.*, 2006, 2007). Assim, são necessárias operações como a diálise ou diafiltração para a eliminação do sal da fase precipitado e processamento da fase líquida para sua reutilização ou descarte final. Esses tratamentos limitam em parte as aplicações do processo de precipitação por "salting-out" devido ao custo dos mesmos.

O uso de eletrólitos voláteis se apresenta como uma alternativa para o aumento da viabilidade do processo de precipitação por "salting-out". Isto se dá porque a dissolução e a dissociação destes eletrólitos em solução aquosa gera íons que têm a capacidade de precipitar as proteínas pela mudança de pH (TOMASULA *et al.*, 1995, HOFLAND *et al.*, 2000) ou pelo efeito de salting-out (WATANABE *et al.*, 2006). Além disso, o equilíbrio entre as espécies é alterado com o aumento da temperatura ou abaixamento da pressão do sistema formando gases que passam para a fase vapor podendo ser facilmente removidos da solução. Assim, estes gases podem ser recuperados e reutilizados, diminuindo consideravelmente a geração de efluentes salinos no sistema e consequentemente, o custo global de produção.

Os eletrólitos voláteis compreendem sais, bases e ácidos como o ácido sulfídrico (H₂S), ácido clorídrico (HCI), ácido cianídrico (HCN), além de uma série de compostos cujas soluções podem ser obtidas a partir da dissolução em água de dióxido de carbono (CO₂) e amônia (NH₃) em diferentes proporções, como o ácido carbônico (H₂CO₃), o hidróxido de amônio (NH₄OH), o bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃), o

carbonato de amônio ((NH₄)₂CO₃) e o carbamato de amônio (NH₄NH₂COO). Por razões ambientais e de segurança, compostos como o ácido sulfídrico e o ácido cianídrico não são usadas em operações de RPB.

1.2. Colocação do problema

Nos estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos em parceria com o Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessôa Filho do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP) - São Paulo - SP, foi verificada a eficiência do uso dos sais voláteis para a indução do "salting-out" com o trabalho pioneiro de precipitação da tripsina suína (WATANABE et al., 2006), lisozima de ovo de galinha e insulinas suína e bovina (LIMA, 2006), quimiotripsina e IgG (PESSÔA FILHO, 2006) usando carbamato de amônio como agente precipitante. No entanto, experimentos de precipitação da tripsina suína com sal nas concentrações de 7,1 e 9,1 molal mostraram redução na atividade da proteína de aproximadamente 20% (WATANABE et al., 2006). Além disso, LIMA (2006) observou indícios de mudanças conformacionais nas proteínas lisozima e insulina bovina após precipitação com sais voláteis. Dentre esses indícios estão a não ressolubilização do precipitado de lisozima, após a decorrência do tempo de equilíbrio (48 h), na mesma solução em que esta proteína havia sido previamente solubilizada antes dos ensaios de precipitação e leve desestruturação molecular detectada através de espectroscopia de dicroísmo circular na insulina bovina precipitada com o mesmo sal.

Creditou-se a perda de atividade da tripsina suína à autólise da mesma ou à desnaturação provocada pelos altos valores de pH da solução salina de carbamato de amônio (próximo de 10,0). Porém, estudos de SDS-PAGE não indicaram autólise significante, e a hipótese que o alto valor de pH promovia a desnaturação foi verificada por medidas de atividade da tripsina em soluções de trietanolamina-HCI em valores de pH na faixa entre 7,8 e 10,0, onde a perda de atividade foi ainda maior (50 e 55%, respectivamente) do que a detectada previamente com soluções de carbamato de amônio. Sendo assim, se o alto valor de pH das soluções de carbamato de amônio.

causou alguma desnaturação da tripsina, o sal aparentemente teve um efeito contrário, ou seja, um efeito estabilizante, sugerindo que a principal causa para a desnaturação naquelas precipitações de tripsina foi o alto valor de pH.

No trabalho de LIMA (2006), a interpretação dos espectros de dicroísmo circular da insulina bovina em conjunto com dados da literatura, revelou que a proteína teve uma leve mudança estrutural, que, segundo sugestão do autor, foi causada pelo aumento das interações hidrofóbicas e oligômeros em solução, ambos os efeitos atribuídos ao eletrólito volátil em questão. As análises dos espectros dicróicos da insulina também revelaram que o pH alcalino da solução mãe, além de outros fatores como, por exemplo, o processo de liofilização, não contribuíram significativamente para a alteração da estrutura secundária da proteína. Estes dados, juntamente com o fato de que a lisozima apresentou cinética de precipitação lenta e dificuldades em sua ressolubilização após o tempo de equilíbrio, levaram o autor a especular que o tempo de indução e a cinética de precipitação sejam fatores limitantes no que se refere à preservação da estrutura nativa de proteínas após a precipitação com o carbamato de amônio, já que a decorrência de um maior intervalo de tempo entre a adição do sal e a precipitação implica em uma maior exposição da molécula aos possíveis efeitos desnaturantes do sal.

Com base nestes resultados, é necessário avaliar em detalhe a influência do uso de eletrólitos voláteis em processos de desnaturação de enzimas para dar continuidade ao uso dos mesmos na purificação de bioprodutos através da precipitação.

1.3. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do sal volátil carbamato de amônio na atividade catalítica de diferentes enzimas com enfoque em purificação de biomoléculas. Assim, mediu-se a atividade enzimática relativa de soluções de cinco enzimas (α -amilase, celulase, lisozima, peroxidase e lipase) após estas serem, uma a uma, combinadas por 60 min a 4,0°C com soluções de carbamato de amônio, comparando-se estes resultados de atividade com ensaios similares conduzidos com sais convencionais (sulfatos de amônio e de sódio).

1.4. Etapas executadas

O presente trabalho constou das seguintes etapas:

a) Incubação de soluções de enzimas com carbamato de amônio por 60 min a
 4,0ºC e medidas da atividade relativa após este tratamento e remoção do sal volátil;

 b) Realização de ensaios similares aos descritos em a) para as enzimas que apresentaram redução de atividade enzimática, substituindo-se o sal volátil por sulfatos de sódio e de amônio;

c) Determinação da estabilidade da peroxidase em tampão carbonatobicarbonato e fosfato de diferentes pHs com dessalinização realizada por colunas de filtração em gel;

 d) Precipitação das enzimas com o intuito de avaliar o efeito deste processo na manutenção da atividade das mesmas. Para efeitos de comparação, estes experimentos foram realizados nas mesmas condições dos estudos de estabilidade anteriores;

e) Precipitação da enzima celulase na presença de solução de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), um polímero que mimetiza o substrato desta enzima objetivando a redução da desnaturação;

 f) Caracterização das enzimas estudadas por obtenção de seus perfis protéicos através de ensaios de eletroforese SDS-PAGE.

As etapas experimentais deste trabalho que compreendem os itens de a) até e) estão representadas na Figura 1.1. Preliminarmente às etapas nomeadas experimentas, três etapas relacionadas à metodologia analítica foram realizadas por serem fundamentais ao estudo em questão. Estas etapas estão listadas a seguir e seus resultados apresentados como apêndices:



Figura 1.1: Fluxograma das etapas experimentais deste trabalho.

a) Implementação de métodos para a determinação da concentração de proteína por absorbância a 280 nm e pelo método de BRADFORD (1976);

b) Verificação da influência do sal volátil carbamato de amônio e do sal convencional sulfato de amônio na medida da concentração de α-amilase por absorbância a 280 nm. Com base nos resultados deste ensaio, optou-se por fazer, para todas as enzimas, a remoção do sal antes da determinação das concentrações protéicas. Assim, esta verificação de influência do sal foi realizada somente para esta enzima.

c) Determinação da atividade enzimática e da faixa operacional da variável resposta de cada método de atividade enzimática.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada a revisão bibliográfica de temas concernentes a este trabalho, entre os quais está a precipitação de proteínas, com destaque às suas variantes, além de uma sucinta discussão sobre a precipitação de proteínas induzida pela adição de sais com a respectiva modelagem matemática deste fenômeno. A seguir, uma breve apresentação do uso de sais voláteis na precipitação de proteínas é feita, com ênfase no equilíbrio líquido-vapor destes sistemas assim como a descrição do histórico e principais aplicações do sal volátil carbamato de amônio, sal cujo efeito sobre a atividade de enzimas foi avaliado neste trabalho. Conceitos sobre estabilidade protéica e enzimática serão abordados e, finalmente, serão apresentadas características das enzimas estudadas.

2.1. Precipitação de proteínas

A precipitação de proteínas pode ser induzida por vários fenômenos causados por mudanças na solução tais como: adição de solventes orgânicos, alteração do pH, adição de ligantes, mudança de força iônica decorrente da adição de sais, aquecimento ou resfriamento (ENGLARD e SEIFTER, 1990; BELTER *et al.*, 1988).

A adição de solventes orgânicos em soluções aquosas de proteínas promove a precipitação devido à diminuição da constante dielétrica da solução que promove a intensificação da atração entre as cargas opostas das moléculas de proteína e redução do poder de solvatação destas moléculas pela água devido, principalmente, ao deslocamento e à imobilização parcial das moléculas de água pela hidratação do solvente orgânico (LADISCH, 2001). Para evitar perda parcial ou total na atividade

biológica do produto, é necessário que a precipitação seja realizada a baixa temperatura e com concentração de solvente relativamente baixa. Dentre os solventes orgânicos utilizados, os mais citados na literatura são a acetona e o etanol por terem completa miscibilidade em água e por não reagirem com a proteína (SCOPES, 1988).

A precipitação isoelétrica de proteínas é feita por ajuste de pH. Adicionam-se ácidos ou bases até que o pH do meio seja igual ao ponto isoelétrico (pI) da proteína. As proteínas têm baixa solubilidade no seu pI, pois, neste pH, a carga líquida da molécula é nula, e a repulsão eletrostática entre as moléculas é mínima, prevalecendo as interações hidrofóbicas proteína-proteína. Desnaturação e inativação da proteína precipitada podem acontecer em alguns casos, o que torna esse processo útil na remoção de proteínas indesejáveis da solução que contém a proteína-alvo, desde que esta seja estável nas condições de precipitação (LADISCH, 2001).

A precipitação por afinidade é uma técnica não-cromatográfica simples utilizada para purificação de proteínas através da exploração da afinidade entre um ligante de afinidade (bifuncional ou multifuncional como anticorpos ou polímeros acoplados à várias moléculas de ligantes monofuncionais) e a proteína-alvo. Essa afinidade causa a agregação, e o complexo proteína-ligante de afinidade é precipitado (SCOPES, 1988).

A precipitação por desnaturação térmica é adequada para a remoção de proteínas contaminantes que ao se desnaturarem precipitam. É de grande interesse quando se consegue remover proteases que comprometeriam a integridade da molécula alvo (produto). Como citado no caso de precipitação isoelétrica, é fundamental que esta molécula alvo seja termoestável na temperatura de precipitação (MIRANDA e BERGLUND, 1993).

Um dos métodos mais comuns de precipitação de proteínas, tanto em escala de bancada (pesquisa) como em larga escala, é a precipitação por sais.

2.2. Precipitação de proteínas com uso de sais

Um grande número de estudos teóricos e experimentais têm sido realizados para tentar explicar os efeitos dos sais na solubilidade de proteínas (ARAKAWA e

TIMASHEFF, 1985). A precipitação por adição de sal ocorre devido a um decréscimo líquido de solubilidade resultante de um efeito "salting-out" (hidrofóbico) ou da combinação de um efeito "salting-in" (eletrostático) com um efeito "salting-out". O efeito "salting-in" causa o aumento da solubilidade do soluto com o aumento da concentração de sal, enquanto o "salting-out" causa um decréscimo da solubilidade com aumento da concentração do mesmo (LADISH, 2001).

Segundo um artigo clássico de KAUZMANN (1959), na precipitação de proteínas por "salting-out", os íons salinos competem com a proteína pelas moléculas de água, e a solubilidade da proteína diminui uma vez que a camada de hidratação é parcialmente removida e as interações proteína-proteína, com destaque para as interações hidrofóbicas, se tornam relevantes. Outra teoria do fenômeno de "salting-out" foi sugerida por SINANOGLU *et al.* (1964) que leva em consideração o aumento da tensão superficial do líquido devido à adição de sal e o conseqüente aumento na energia livre da formação de uma cavidade para a dissolução da molécula de proteína (ARAKAWA e TIMASHEFF, 1984).

O sulfato de amônio é o sal mais utilizado em "salting-out" devido a sua alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções, à posição favorável de seus íons na série de Hofmeister com relação à efetividade de precipitação, à ausência de efeitos desnaturantes e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução (DEUTSCHER, 1990), além de ser de baixo custo mesmo em alta pureza (LADISH, 2001).

Uma desvantagem da precipitação com sais é a existência de sal em ambas as fases formadas. O sistema bifásico formado é constituído de uma fase líquida concentrada em eletrólito e uma fase composta que contém a proteína precipitada com grande proporção de fase líquida salina, podendo também conter sal na fase sólida intrinsicamente ligado a ela. Assim, são necessárias operações como a diálise ou diafiltração para a eliminação do sal da fase precipitado e processamento da fase líquida para sua reutilização ou descarte final. Esses tratamentos limitam em parte as aplicações do processo de precipitação por "salting-out" devido ao custo dos mesmos.

Conforme relatam GÖRGENYI *et al.* (2006) a precipitação por "salting-out" apresenta diversas possibilidades de aplicação, como por exemplo, modificar o comportamento físico da solução, tornar técnicas analíticas mais sensíveis, ser usado para fracionamento de soluções, entre outras. Como exemplos de aplicações de precipitação por "salting-out" utilizando-se sulfato de amônio, podemos citar a extração de sementes da planta indiana *Gelonium multiflorum* utilizada como possível limitadora do crescimento de células cancerígenas (ALAM *et al.*, 2008) e de DNA genômico de sangue no trabalho de NASIRI *et al.* (2005), a purificação da enzima enantioseletiva carbonil redutase com 90% de rendimento na etapa de precipitação (SONI *et al.*, 2007), a remoção de mais de 90% das impurezas (essencialmente RNA) durante a purificação da precipitação (FREITAS *et al.*, 2006) e a precipitação de proteínas utilizadas em vacinas animais, onde 81% de rendimento pode ser alcançado nessa etapa (MARANGA *et al.*, 2002).

2.2.1. Modelagem da precipitação de proteínas por "salting-out"

A precipitação de proteínas por "salting-out" é usualmente descrita matematicamente através da equação clássica de Setschenow (GÖRGÉNYI, 2006):

$$\log(S_0 / S) = \log \gamma = K_s \cdot (sal, soluto) \cdot I$$
(2.1)

em que S_0 é a solubilidade da proteína em água, S é a solubilidade da proteína na presença de um sal mas nas mesmas condições de temperatura e pH, γ é o coeficiente de atividade da proteína, K_s (sal, soluto) é a constante de Setschenow dependente do sal e da proteína em questão, também conhecida como constante de "salting-out", e I é a força iônica do sal conforme a equação 2.2, onde z_i é a carga elétrica do íon e m_i é a molalidade da espécie i. Na equação 2.1, a molalidade ou concentração também têm sido usadas ao invés da força iônica.

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum m_i \cdot z_i^2 \tag{2.2}$$

Arranjando matematicamente os termos da equação (2.1), chega-se à expressão (2.3) que representa a equação de COHN (1925):

$$\log\left(S\right) = \beta - K_s \cdot I \tag{2.3}$$

onde β é o log (S_0) que representa o logaritmo da concentração hipotética do soluto na força iônica zero.

MELANDER e HORVÁTH (1977) modelaram a precipitação como resultado do balanço de dois efeitos opostos: o efeito chamado "salting-in" relacionado às forças de interação eletrostáticas, que aumentam a solubilidade da proteína, e o efeito "salting-out" devido às interações hidrofóbicas que causam a diminuição da solubilidade da proteína. Estes dois efeitos antagônicos são representados na equação 2.4:

$$\log(S) = \beta + \Lambda \cdot I - \Omega \cdot \sigma \cdot I = \beta + (\Lambda - \Omega \cdot \sigma) \cdot I = \beta - (\Omega \cdot \sigma - \Lambda) \cdot I$$
(2.4)

Nesta equação, o termo Λ é um coeficiente de "salting-in", oriundo do modelo de Kirkwood (MELANDER e HORVÁTH, 1977) para a variação de energia livre na dissolução de um dipolo neutro e está relacionado às interações eletrostáticas entre o sal e a proteína. O valor de Λ é dado pela fórmula:

 $\Lambda = \mathsf{DM}/\mathsf{RT} \tag{2.5}$

em que M é o momento dipolo da proteína, R é a constante universal dos gases ideais, T é a temperatura em Kelvin e D é uma constante. A constante β da equação 2.4 é uma constante que depende da temperatura, do pH e da proteína em questão e está associada com o modelo de Debye – Hückel (MELANDER e HORVÁTH, 1977) para a variação de energia livre na dissolução de um íon. Também, implícitos nesta constante, se encontram termos dependentes de características físico-químicas intrínsecas à proteína, como o número de resíduos ácidos e básicos (que regem a carga líquida em baixas forças iônicas) e o ponto isoelétrico. O "salting-out" propriamente dito é regido pelo coeficiente - $\Omega \cdot \sigma$ da equação 2.4. O termo σ é o incremento na tensão superficial da solução com o aumento da molalidade do sal. O termo Ω é uma constante diretamente proporcional à área superficial hidrofóbica da proteína e do volume molar do solvente.

A natureza dos parâmetros Λ , $\beta \in \Omega \cdot \sigma$ é utilizada na descrição do comportamento de solubilidade de proteínas conforme se varia a força iônica: em faixas de baixa concentração salina, o efeito das forças eletrostáticas se sobrepõe ao das interações hidrofóbicas e o logaritmo da solubilidade aumenta com a força iônica. Para concentrações salinas maiores, contudo, os efeitos de "salting-in" se tornam desprezíveis em face ao "salting-out" e o logaritmo da solubilidade da proteína começa a decrescer linearmente com a concentração de sal. Assim, para concentrações salinas significativas, a precipitação de proteínas por "salting-out" é usualmente descrita por meio de um rearranjo simplificado da equação 2.4 de forma a se obter a constante de "salting-out" (K_s) formulada por COHN (1925) composta de um coeficiente de "salting-out" intrínseco ($\Omega \cdot \sigma$) e de um coeficiente de "salting-in" (- Λ), que estão correlacionados às interações hidrofóbicas e eletrostáticas, respectivamente, de acordo com a equação abaixo:

$$K_{\rm s} = \Omega \cdot \sigma - \Lambda \tag{2.6}$$

Esta constante constitui a base teórica para a série de Hofmeister e do chamado efeito liotrópico (MELANDER e HORVÁTH, 1977; BULL e BREESE, 1980) e representa a efetividade do sal na precipitação de uma dada proteína.

2.2.2. Precipitação de proteínas com uso de sais voláteis

O uso de eletrólitos voláteis se apresenta como uma alternativa ao processo de precipitação por sais convencionais, pois pode aumentar a sua viabilidade e diminuir o custo de produção, devido à menor complexidade na recuperação dos eletrólitos da solução-mãe e no precipitado. Os eletrólitos voláteis são sais que em soluções aquosas coexistem nas formas iônica e molecular (não dissociada), mas na fase vapor somente a forma molecular é encontrada (PRAUSNITZ *et al.*, 1999). Por elevação de temperatura ou abaixamento de pressão, a solubilidade da forma molecular em água

reduz-se drasticamente, diminuindo também a concentração das formas iônicas. Assim, o eletrólito converte-se à forma molecular gasosa sendo facilmente removido da solução, tendo o potencial de ser diretamente reutilizado, sem necessidade de purificação adicional.

EDWARDS *et al.* (1975) visavam a estabelecer uma modelagem termodinâmica para calcular as composições do equilíbrio líquido-vapor de soluções aquosas diluídas contendo eletrólitos voláteis comumente encontrados na indústria química (amônia, dióxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, dióxido de enxofre e cianeto de hidrogênio). Estes autores propuseram um modelo em que o equilíbrio de fases (setas verticais na Figura 2.1) era governado pela lei de Henry, enquanto que o equilíbrio químico (setas horizontais na mesma Figura) era governado pelas constantes de dissociação do eletrólito na fase líquida. Segundo estes autores, os sistemas que envolvem diversas espécies iônicas têm seu equilíbrio calculado através de reações de dissociação, sendo que os equilíbrios a serem considerados para as dissoluções da amônia e dióxido de carbono estão representados pelas equações seguintes:

$$NH_3^{(l)} + H_2O \longrightarrow NH_4^+ + OH^-$$
(2.7)

$$CO_2^{(1)} + H_2O \longrightarrow HCO_3^- + H^+$$
 (2.8)

$$HCO_3^{-1} \longrightarrow CO_3^{2^{-}} + H^+$$
(2.9)

Na dissolução simultânea de amônia e dióxido de carbono, deve-se levar em conta o equilíbrio de formação do íon carbamato:

$$NH_3^{(1)} + HCO_3^{-1} \longrightarrow NH_2COO^{-1} + H_2O$$
 (2.10)

Outras determinações experimentais de equilíbrio de fases em sistemas aquosos contendo amônio e dióxido de carbono foram obtidas por RUMPF *et al.* (1998) e por KURZ *et al.* (1995), que investigaram o equilíbrio sólido-líquido-vapor envolvido na precipitação do bicarbonato de amônio. As informações obtidas nestes trabalhos podem ser sintetizadas em função da razão entre as quantidades totais de nitrogênio e carbono (R_{N/C}) no sistema. Essa razão foi definida por VAN BERLO *et al.* (2000) como:

$$R_{N/C} = \underline{m(NH_3^{(l)}) + m(NH_4)^+ + m(NH_2COO^-)}$$

$$m(CO_2^{(l)}) + m(HCO_3^{-}) + m(CO_3^{2^-}) + m(NH_2COO^-)$$
(2.11)

em que *m* (i) é a molalidade da espécie i entre parêntesis.



Figura 2.1: Equilíbrio líquido-vapor de um sistema composto pela fase aquosa e um eletrólito volátil (EDWARDS *et al.*, 1975).

A Tabela 2.1 lista os valores desta razão para soluções de quatro espécimes de eletrólitos voláteis $CO_2 - NH_3$, de acordo com as reações de dissociação e a definição da razão $R_{N/C}$. A obtenção de cristais dos sais com fórmula molecular $(NH_4)_2CO_3$ (carbonato de amônio) ou $NH_4NH_2CO_2$ (carbamato de amônio) em graus de pureza significativos é um procedimento difícil, o que torna o seu custo alto. O carbonato de amônio comercial (P.A.) corresponde a uma mistura de bicarbonato e carbamato de amônio cuja fração de amônia é de aproximadamente 30% em massa. Sendo assim, o valor da razão $R_{N/C}$ de uma solução feita a partir deste sal é menor que 2,0, ao contrário do que poderia ser concluído através da análise de sua fórmula molecular.

Composto	Fórmula	R _{N/C}
Bicarbonato de amônio	NH4HCO2	1,0
Carbonato de amônio comercial (P.A.)	NH ₄ HCO ₂ + NH ₄ NH ₂ CO ₂ (30% de NH ₃)	1,4
Carbonato de amônio	(NH ₄) ₂ CO ₃	2,0
Carbamato de amônio	NH ₄ NH ₂ CO ₂	2,0

Tabela 2.1: Valores da razão $R_{N/C}$ para soluções feitas a partir de diferentes eletrólitos voláteis $CO_2 - NH_3$.

O estado de equilíbrio de uma solução depende da razão R_{N/C} e da quantidade de solutos adicionados (independente do estado em que os mesmos são adicionados à solução). Assim, uma solução de carbamato de amônio ou de carbonato de amônio, ambos em alto grau de pureza, é idêntica a uma solução que possua a razão R_{N/C} igual a 2,0 preparada a partir de bicarbonato de amônio e hidróxido de amônio, ou de carbonato de amônio analítico comercial (P.A.) e hidróxido de amônio. Desse modo, neste trabalho, assim como nos trabalhos de WATANABE et al. (2006) e LIMA (2006), as soluções de R_{N/C} igual a 2,0 serão tratadas como soluções de carbamato de amônio e referenciadas pela fórmula molecular do sal: NH₄NH₂CO₂, embora não sejam preparadas a partir da dissolução deste sal em forma cristalina. O uso de carbamato de amônio para a indução de precipitação por "salting-out" foi iniciado pelo nosso grupo de pesquisa, com a precipitação de tripsina suína (WATANABE et al., 2006), lisozima de clara de ovo de galinha, insulinas bovina e suína (LIMA, 2006), quimotripsina e IgG (PÊSSOA FILHO, 2006). Nos experimentos feitos por WATANABE et al. (2006) e LIMA (2006) foi utilizado o carbamato de amônio com $R_{N/C}$ igual a 2,0 e 2,5, porém estes autores verificaram que soluções com $R_{N/C}$ igual a 2,5 apresentaram um menor efeito na indução da precipitação de proteínas por "salting-out" do que soluções análogas com R_{N/C} igual a 2,0. VAN BERLO et al. (2000) sugerem que somente sais voláteis com R_{N/C} maior ou igual a 2,0 são efetivos para a separação de duas fases aquosas, e nota-se um aumento acentuado da solubilidade dos sais em função de R_{N/C}, de acordo com dados fornecidos pela BASF (1998, 1999, 2000), segundo os quais a solubilidade a
25 °C do carbamato de amônio ($R_{N/C}$ igual a 2,0) é de 790 g/L, do carbonato de amônio ($R_{N/C}$ igual a 1,4), 320 g/L e do bicarbonato de amônio ($R_{N/C}$ igual a 1,0) é de 220 g/L.

Uma explicação para a menor capacidade de indução ao "salting-out" de soluções de sal com $R_{N/C} = 2,5$ em relação às soluções análogas com $R_{N/C} = 2,0$ foi dada por WATANABE *et al.* (2006). Segundo estes autores, a concentração de íons carbonato é proporcionalmente maior para uma razão $R_{N/C}$ igual a 2,0, e o aumento da concentração de amônia com propósito de se aumentar o $R_{N/C}$ faz com que parte dos íons carbonato se converta a carbamato, o que em princípio faz com que a capacidade de induzir o "salting-out" diminua, devido à diminuição na densidade de cargas, pois o íon carbonato bivalente é convertido em carbamato monovalente.

Além dos estudos de precipitação realizados por WATANABE *et al.* (2006) e LIMA (2006), outros experimentos preliminares realizados pelo nosso grupo de pesquisa com albumina bovina (BSA), quimotripsina e insulina suína em bicarbonato de amônio ($R_{N/C}$ igual a 1,0) e carbonato de amônio comercial ($R_{N/C}$ igual a 1,4) evidenciaram que estes dois sais não apresentaram efeito de "salting-out" para estas proteínas. Uma explicação para este fato é de que para valores de $R_{N/C}$ menores que 2,0 a solubilidade do sal é tão baixa que eventualmente ocorre a formação de um precipitado sólido salino (PESSÔA FILHO, 2006).

Cálculos computacionais dos valores de pH de soluções de carbonato e carbamato de amônio foram realizadas por PESSÔA FILHO (2006). Este autor observou que um aumento da razão R_{N/C} traz como conseqüência um aumento de pH da solução devido ao acréscimo de amônia e como conseqüência, estas soluções são alcalinas. A variação dos valores de pH com a concentração total do sal volátil também foi determinada e mostrou-se bastante diversa para cada razão R_{N/C}. Segundo PESSÔA FILHO (2006), embora esta variação de pH exista, não é tão acentuada e decai com o aumento desta razão. Este aparente efeito tamponante se origina da composição do sistema que é formado a partir de uma base fraca (o hidróxido de amônio) com um sal de cátion comum (carbamato de amônio).

2.2.3. Carbamato de amônio – breve histórico e principais aplicações

O carbamato de amônio foi obtido pela primeira vez no início do século XIV a partir da destilação de chifres, casco e couro de animais cujo produto era a mistura deste sal com bicarbonato de amônio e carbonato de amônio. Esta mistura era utilizada como fermento para massas devido à sua decomposição em produtos gasosos e pela facilidade de manuseio (GERHARTZ, 1985).

Com o desenvolvimento industrial da síntese da amônia a partir do século XIX, o carbamato de amônio passou a ser produzido a partir de amônia e dióxido de carbono (BROOKS, 1946) e utilizado como inseticida para cereais, agente neutralizador na indústria química, fertilizante, como matéria-prima na síntese de uréia (LITVIC *et al.*, 2005) e na produção de carbonato de amônio (na maioria dos processos, estes dois sais são obtidos em misturas com outras espécies). Embora a produção mundial de carbamato de amônio ultrapasse poucos milhões de toneladas, este sal é raramente utilizado em sínteses orgânicas (LITVIC *et al.*, 2005).

Em pesquisa, o carbamato de amônio tem sido utilizado como eficiente fonte de amônia na preparação de ésters insaturados utilizados como matéria-prima para produção de compostos heterocíclicos usados no tratamento de aterosclerose e outras doenças coronárias (LITVIC *et al.*, 2005), em estudos de para aumentar a estabilidade operacional da lipase em síntese enantioseletiva (DU *et al.*, 2003), na síntese de glicosaminas a partir da reação de hexoses, pentoses ou dissacarídeos (LIKHOSHERSTOV *et al.*, 2002), em sistemas aquosos bifásicos na partição de aminoácidos (VAN BERLO *et al.*, 2000) e na produção de uréia (CLAUDEL *et al.*, 1986).

2.3. Estabilidade protéica

Quando uma proteína é sintetizada na célula ela começa a existir a partir de uma seqüência linear de resíduos de aminoácidos que deve se dobrar em torno da própria cadeia polipeptídica (enovelamento) durante as etapas seguintes para dar origem à sua estrutura nativa estável. A exposição das moléculas de proteínas a

condições diferentes daquelas em que foram produzidas faz com que estas tenham uma tendência a perder sua estrutura tridimensional e, portanto, as suas propriedades, em um processo que pode ser reversível ou irreversível. Este desnovelamento da maioria das proteínas globulares e a perda de suas atividades biológicas sem que haja rompimento de ligações covalentes no esqueleto polipeptídico, é o fenômeno denominado desnaturação. Inicialmente, o processo de desnaturação das proteínas era considerado irreversível. Entretanto, demonstrou-se que algumas proteínas globulares desnaturadas em decorrência do pH readquirem sua estrutura nativa e sua atividade biológica, desde que o pH retorne ao valor normal, sendo este processo denominado renaturação (LEHNINGER, 2005).

A desnaturação pode ser provocada por vários tipos de tratamentos que ocasionam o rompimento de ligações não covalentes no esqueleto polipeptídico e, portanto, são considerados tratamentos relativamente brandos. Como exemplos desses tratamentos temos o aquecimento e a exposição das moléculas a valores extremos de pH, compostos anfipáticos como detergentes e sabões, solventes orgânicos como álcool e acetona e certos solutos como uréia e hipocloreto de guanidina. O aquecimento causa alteração abrupta de propriedades conformacionais sensíveis, como rotação óptica, viscosidade e absorção de UV, que indicam que o polipeptídio se desenrola ou funde-se. As variações de pH alteram o estado iônico das cadeias laterais de aminoácidos, alterando a distribuição de cargas e a exigência de pontes de hidrogênio. Os detergentes associam-se com os resíduos apolares da proteína, competindo com as interações hidrofóbicas responsáveis pela estrutura nativa da mesma, esta associação se dá inicialmente através da interação entre a "cabeça" polar da molécula do detergente e resíduos carregados da proteína que pode causar a abertura da molécula protéica e através desta abertura permitir que a "cauda" apolar da estrutura do detergente interaja com os resíduos apolares da proteína. Os agentes caotrópicos, como o íon guanidina e uréia aumentam a solubilidade de substâncias apolares na água e possuem a habilidade de romper interações hidrofóbicas da proteína (LEHNINGER, 2005). Apesar dessa propensão que o íon guanidina tem para ser desnaturante de proteínas, o mesmo apresentou-se o mais efetivo agente para a recuperação e preservação da atividade de lisozima em sistemas com 0,1 mol/L de sais hipocloreto e tiocianeto de guanidina em comparação com soluções de KCI de mesma concentração (NAOE *et al.,* 2002).

Em relação à estabilidade conformacional das proteínas, têm-se entre os fatores importantes, os efeitos hidrofóbicos, as pontes de hidrogênio e as pontes salinas (DILL, 1990), porém, as estruturas das proteínas são regidas principalmente por efeitos hidrofóbicos, que faz com que as cadeias laterais apolares minimizem seus contatos com a água e se agreguem no interior da proteína (LEHNINGER, 2005). Em interiores muito agregados das proteínas nativas, forças de van der Walls, que são relativamente fracas, têm influência estabilizante importante porque atuam a pequenas distâncias, porém sua influência é perdida quando a proteína é desenrolada. As pontes de hidrogênio têm pequena contribuição na estabilidade de proteínas porque os grupos que formam essas ligações na proteína desenrolada formam ligações de hidrogênio energeticamente equivalentes com moléculas de água. A estabilização por ponte salina ou par iônico é feita através da associação de dois grupos iônicos de proteínas de carga oposta (em geral lisina e aspartato). Cerca de 75% dos resíduos com carga nas proteínas são membros de pares iônicos e estão localizados principalmente na superfície das mesmas (VOET, 2002). TAKANO et al. (2000) estudaram a contribuição que as pontes salinas têm para a estabilidade conformacional de lisozima e verificaram que na presença de uma solução 0,2 mol/L de sal KCI a pH 4,0 as pontes salinas com mais de 50% de acessibilidade ao solvente não contribuem para a estabilidade. Apesar das interações entre pares iônicos serem fortes, elas pouco contribuem para a estabilidade de proteínas nativas porque a energia livre das interações entre as cargas do par iônico normalmente não é suficiente para compensar a perda de entropia das cadeias laterais e a perda de energia livre de solvatação quando esses grupos com carga formam um par iônico (VOET, 2002).

As pontes dissulfeto intra e intermoleculares formam-se à medida que uma proteína se dobra para adquirir sua conformação nativa, e apesar delas serem individualmente mais fortes que interações hidrofóbicas e ligações hidrogênio, estas forças mais fracas são forças essenciais de estabilização por ocorrer em maior número. Porém, as pontes dissulfeto são importantes na manutenção de um padrão conformacional durante a mudança estrutural que ocorre na proteína quando ela passa

de seu estado distendido para sua forma nativa (LEHNINGER, 2005). Apesar destas forças não serem essenciais para a estabilização de proteínas, estudos realizados por MATSUMA *et al.* (1989) utilizando lisozimas mutantes com quantidades de pontes dissulfeto variando entre zero e três demonstraram que cada uma dessas pontes contribui para a estabilidade da proteína.

Vários dados experimentais e provenientes de simulações apontam para a estrutura secundária como fator importante para o alcance da resistência mecânica de biomoléculas na sua configuração nativa (ORTIZ *et al.*, 2005; WEST *et al.*, 2006). Um parâmetro que prediz a estabilidade mecânica de uma proteína baseada na sua topologia nativa conhecido como "contact order (CO)" foi introduzido por PLAXCO *et al.* (1998). O parâmetro CO foi analisado por LI (2007) para mais de 20 proteínas e através desse parâmetro LI pôde estimar a força de desnovelamento ("unfolding force", fu), que caracteriza a estabilidade mecânica de proteínas e é definida como a força máxima necessária para provocar a desnaturação das mesmas. A partir desses resultados, LI concluiu que, em geral, proteínas β e α/β apresentam maior estabilidade mecânica do que proteínas α . As proteínas β são proteínas cujo núcleo estrutural contém predominantemente β -folhas, enquanto que as proteínas α contém predominantemente α -hélices em sua estrutura. As proteínas α/β apresentam conteúdos significativos de ambas as estruturas secundárias em sua molécula.

A habilidade que uma enzima possui de catalisar uma reação é definida como atividade enzimática, enquanto que a estabilidade enzimática é medida pela atividade residual da enzima depois de um processo de inativação (SIRINIVAS e PANDA, 1998). Em qualquer processo industrial envolvendo o uso de uma enzima, a mesma está sujeita a variações de condições químicas e físicas do meio. A escolha de uma enzima é, portanto, ditada pela sua integridade e estabilidade funcional após passar pelas etapas necessárias do processo. Portanto, além de alta atividade, é necessário que a enzima apresente como características essenciais para seu uso em larga escala a estabilidade conformacional, térmica e cinética bastante altas. (KAMAL e BEHERE, 2008). Estas características são afetadas pelo pH, temperatura, ativadores e inibidores, cisalhamento, entre outros e é importante entender os tipos de alteração e interações moleculares que podem contribuir significantemente (positivamente ou negativamente) para manutenção destas características, que são inerentes à sua natureza protéica.

2.4. Características relevantes das enzimas estudadas

2.4.1. α-Amilase

A enzima α -amilase (1,4- α –D-Glucan glucanoidrolase, EC 3.1.1.3) hidrolisa amido, glicogênio e polissacarídeos pela quebra randômica das ligações glicosídicas internas α -1,4. Essas enzimas são amplamente distribuídas em várias bactérias, fungos, plantas superiores e animais e, nestes últimos têm sido encontradas especialmente no pâncreas, saliva, sangue e urina (BERNFELD, 1951). A α -amilase é usada nas indústrias têxtil e de papel, na indústria de alimentos para a produção de pães, cervejas e xaropes de açúcar, dentre outros produtos, e também da indústria de adesivos (RAO *et al.*, 2005). Precipitação de α -amilase com adição de sulfato de amônio é amplamente utilizada em escala de laboratório para concentração da proteína a partir de meios de cultura como relatado por RAO *et al.* (2005), HAGIHARA *et al.* (2001), KUMAR *et al.* (1998), IGARASHI *et al.* (1998) e SCHWIMMER (1949).

As enzimas α -amilase são enzimas multidomínio que possuem em comum um domínio catalítico na forma de barril (β/α)₈ constituída de oito folhas β paralelas rodeadas por oito hélices, chamado de domínio A (Figura 2.2). Na maioria das α -amilases, o domínio A ocorre na extremidade N-terminal da proteína, e está localizado na parte central da molécula, porém, vários outros membros da família têm um domínio N (de função indefinida) precedendo este domínio catalítico. O domínio B é uma estrutura folha β irregular que é uma protuberância entre a terceira folha e a terceira hélice do barril. O domínio C está posicionado do lado oposto ao domínio B e é constituído de folhas β . Supõe-se que o domínio C estabiliza o domínio catalítico por proteger os resíduos hidrofóbicos do domínio A do solvente (MacGREGOR, 2001), além de ser sugerido que esse domínio possa ser responsável pela ligação ao substrato (DAUTER *et al.*, 1999; LAWSON *et al.*, 1994).



Figura 2.2: Estrutura tridimensional da α-amilase proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens* (PDB Code 1E3X). Íons cálcio e íons sódio são mostrados como esferas amarelas e vermelhas, respectivamente.

A enzima α -amilase utilizada nesse trabalho é proveniente de *Bacillus sp.* e apresenta massa molecular que varia entre 50 e 55 kDa segundo o fornecedor (Sigma, EUA). Sabe-se que a atividade das enzimas provenientes de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* variam com o pH, sendo mais ativas entre pH 5,5 e 6,5 e entre pH 6,0 e 7,0, respectivamente (WELKER e CAMPBELL, 1967). NAJAF *et al.* (2005) relatam que α -amilase proveniente de *Bacillus subtilis* apresenta pl igual a 7,0.

2.4.2. Lisozima

Lisozima (1,4-β-N-acetilmuramidase, EC 3.2.1.17) é um polipeptídio de cadeia simples de 129 aminoácidos reticulada com quatro pontes dissulfeto (JOLLES, 1969) encontrada na lágrima, na secreção nasal, na saliva, no baço e em leucócitos. A enzima causa a lise de células bacterianas específicas por meio da hidrólise das ligações

glicosídicas de oligossacarídeos presentes nas paredes celulares das mesmas (LEHNINGER, 2005; HOLLER *et al.*,1975). Presumivelmente, devido a essa habilidade, essas enzimas estão presentes em grandes quantidades nos ovos de muitos pássaros, onde desempenham um importante papel na defesa do embrião contra infecção bacteriana (RUDNEY *et al.*, 1985). A lisozima é uma enzima muito usada como aditivo conservante nas indústrias alimentícia e farmacêutica (SU e CHIANG, 2006). A lisozima é uma das proteínas mais extensivamente estudadas nos processos de precipitação e cristalização devido à facilidade com que pode ser precipitada e cristalizada apresentando grande possibilidade de obtenção de múltiplos cristais (MORETTI *et al.*, 2000).

A lisozima utilizada nesse trabalho (Figura 2.3) é proveniente de clara de ovo de galinha e apresenta massa molecular de cerca de 14,3 kDa. A enzima é mais ativa entre pH 6,0 e 9,0, com pH ótimo de 6,2 e pl aproximadamente igual a 11,35 segundo o fornecedor (Sigma, EUA).



Figura 2.3: Estrutura tridimensional da lisozima de clara de ovo de galinha (PDB Code 1 AKI).

2.4.3. Celulase

O termo celulase se refere a um complexo enzimático no qual um grupo de enzimas, agindo juntas, hidrolisa as ligações β -(1-4) na celulose. O complexo é usualmente constituído de três enzimas que agem em sinergia: endoglucanase (1,4- β -D-Glucan glucanoidrolase, EC 3.2.1.4), exoglucanase (celobioidrolase, EC 3.2.1.91) e celobiase (β -glicosidase, EC 3.2.1.21). As duas primeiras agem diretamente sobre a

celulose formando principalmente glicose e celobiose como produtos. A celobiose é então hidrolisada a glicose pela celobiase (DINCER *et al.*, 2007; CAO E TAN, 2002).

Atualmente, as celulases têm sido utilizadas como biocatalisadores em uma série de processos industriais como: clarificação em cervejarias e vinícolas, formulação de ração animal, produção de detergentes e amaciantes para roupas, além de ser usada na agricultura (DINCER *et al.*, 2007; PAZARLIOGLU *et al.*, 2005; PELACH *et al.*, 2003). Porém, estas enzimas encontram aplicação mais específica na indústria têxtil e de papel e celulose, na modificação das propriedades processuais das fibras celulósicas comerciais (FILOS *et al.*, 2006; JANG *et al.*, 2003) e na reciclagem do papel, atuando eficientemente na remoção de tintas de impressão da superfície de fibras recicláveis (JEFFRIES *et al.*, 1994). Devido ao amplo uso dessas enzimas em aplicações industriais, o tempo de vida útil sob as condições de processo é uma importante característica, sendo essenciais estudos sobre a estrutura e estabilidade da proteína (ARUNACHALAM e KELLIS, 1996).

Trichoderma reesei é o microrganismo celulolítico que mais tem sido estudado (UUSITALO *et al.*, 1991). O complexo enzimático produzido a partir de *T. reesei*, utilizado neste trabalho, é um sistema multienzimático constituído por no mínimo três enzimas fisicamente e enzimaticamente distintas que são essenciais no processo global de conversão da celulose em glicose (KING e VESSAL, 1969): a celobiase ou β -glicosidase (BGL), as celobioidrolases (CBHs) e as endoglucanases (EGs) (TEERI, 1994; SALOHEIMO *et al.*, 1993)

No complexo celulásico secretado por *T. reesei* sabe-se que pelo menos cinco enzimas apresentam atividade endoglucanásica (EG I, EG II, EG III, EG V e EGV) e pelo menos duas são celobioidrolases (CBH I e CBH II), sendo estas últimas produzidas em maior quantidade que as demais. Alguns autores justificam a multiplicidade de endoglucanases como decorrente de modificações pós-translacionais como a glicosilação (MARTINS, 2005).

Os genes das enzimas CBHs e EGs foram identificados e isolados e descobriuse que todas estas enzimas possuem um domínio catalítico, um "linker" e um domínio de ligação (CBD), à exceção da EG III, que só possui o domínio catalítico

(ARUNACHALAM e KELLIS, 1996; TEERI, 1994; SALOHEIMO *et al.*, 1993). A massa molecular de cada uma das enzimas e os pontos isoelétricos de algumas estão apresentados na Tabela 2.2.

O pH ótimo do sistema multienzimático varia entre os limites de 4,2 a 5,2 de acordo com o substrato utilizado. A composição relativa das quatro celulases em maior concentração no complexo enzimático é de aproximadamente 60% de CBH I, 14% de CBH II, 5% de EG I e cerca de 1% de EG II (desconhece-se a composição dos restantes 20%). As estruturas destas quatro celulases estão representadas na Figura 2.4.

As celobioidrolases (CBHs) atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia da celulose produzindo principalmente celobiose, além de glicose e celotriose (ZANDONÁ, 2001). Estas enzimas não atuam sobre celuloses solúveis por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes, seja carboximetílico (CMC) ou hidroxietílico (HEC). As endoglucanases (EGs) hidrolisam as cadeias de celulose amorfa e modificada quimicamente (solúveis) de modo aleatório. O sítio catalítico das endoglucanases possui a forma de uma chave, possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose, reduzindo seu grau de polimerização de maneira considerável. As regiões da celulose de menor organização são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não são envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas (MARTINS, 2005).

Assim, ensaios de atividade sobre CMC são característicos para as endoglucanases, enquanto que as exoglucanases são caracterizadas por sua medida de atividade quando atuam sobre celulose microcristalina, tornando possível a diferenciação dessas enzimas. O sítio catalítico das celobioidrolases possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando majoritariamente celobiose.

As celobiases (β-glicosidases) possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas celobioidrolases e endoglucanases em glicose. Elas não são

Enzima	Тіро	Massa molecular (kDa)	(pl)	Referência
	-	23,5 - 58,0	-	BELDMAN <i>et al.</i> , 1985
		46,0	5,0	GAMERITH, 1992
	EGI	50,0 - 55,0	4,0 - 6,0	REINIKAINEN, 1994
Endoqlucanase		48,0	6,1	GAMERITH, 1992
Lindogiucanase	EG II –	48,0	5,5	REINIKAINEN, 1994
	EG III	25,0	7,5	REINIKAINEN, 1994
	EG VI	55,0	-	KARLSSON <i>et al.,</i> 2001
	EG V	23,0	-	REINIKAINEN, 1994
	-	57,0	-	SELBY, 1969
	-	42,0	-	BERGHEM et al., 1975
Fuerland	-	60,5 - 62,0	-	BELDMAN <i>et al.</i> , 1985
Exoglucanase (Celobioidrolase)		63,0	4,2	GAMERITH, 1992
	CBH I -	59,0 - 68,0	3,5 - 4,2	REINIKAINEN, 1994
	CBH II -	58,0	5,9	GAMERITH, 1992
		50,0 - 58,0	5,1 - 6,3	REINIKAINEN, 1994
	-	76,0	-	BELDMAN <i>et al</i> ., 1985
ß alioosidasa	-	42,0	-	BERGHEM et al., 1975
(Celobiase)	BGL I	75,0	8,7	REINIKAINEN, 1994
	BGL II	114,0	4,8	FOREMAN <i>et al.</i> , 2003, VIIKARI <i>et al.</i> , 2001

Tabela 2.2: Características das enzimas encontradas no complexo celulásico proveniente de Trichoderma reesei.



Figura 2.4: Estrutura tridimensional das celulase de *Trichoderma. reesei.* **A** - EG I (PDB Code 1EG1), **B** - EG II (PDB Code 1EG2), **C** - CBH 1 (PDB Code 1CBH), **D** - CBH II (PDB Code 1CB2).

consideradas celulases legítimas uma vez que agem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulase pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um inibidor competitivo das celobioidrolases (MEDVE, 1997).

AVELINO *et al.* (1999) já utilizaram "salting-out" com sulfato de amônio na presença de ésteres de celulose (metilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose) para a precipitação de celulase e recuperação das partículas formadas por flotação em coluna.

2.4.4. Peroxidase

Peroxidases (doador: peróxido de hidrogênio oxidoredutase, EC 1.11.1.7) são heme enzimas, ou seja, enzimas que contém um grupo heme prostético (protoporfirina de ferro IX) em sua molécula, no qual um átomo de ferro III é oxidado e forma a espécie ferro IV que se reduz quando oxida o substrato orgânico da peroxidase voltando ao seu estado de oxidação. Elas são encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais, e constituem um grupo de enzimas cuja principal função é a oxidação de diferentes substratos através do consumo de peróxido de oxigênio (H₂O₂). O grupo heme prostético de sua molécula é responsável pela catálise de reações químicas na forma:

 $ROOR' + doador de elétron (2e^-) + 2H^+ \rightarrow ROH + R'OH$ (2.12)

A peroxidase de rabanete ("horseradish peroxidase", HRP) (Figura 2.5), utilizada neste trabalho, apresenta sete isoenzimas em sua composição, conforme relatado por SHANNON *et al.* (1966), KAY *et al.* (1967) e SHIH *et al.* (1971). Ela é a peroxidase mais estudada e é utilizada como um biocatalisador em reações de polimerização de fenol, anilina e seus derivados, sendo uma glicoproteína contendo 21% de carboidratos e um grupo prostético heme que requer peróxido de hidrogênio para alcançar os estados de oxidação (VEITCH, 2004; BERGLUND, 2002).

De acordo com MAEHLY (1955) esta enzima apresenta massa molecular de 40,0 kDa, pH ótimo de 7,0 e pl de 7,2. Ela possui em sua molécula estruturas responsáveis pela sua estabilidade, o que inclui o grupo heme prostético (Fe (III) protoporfirina IX), quatro pontes dissulfeto, dois íons cálcio e oito glicanos.

Essas enzimas são utilizadas para oxidar compostos fenólicos e substâncias relacionadas (ROBINSON, 1991), além de participarem de processos como suberização e lignificação de células de plantas hospedeiras durante a reação de defesa contra agentes patogênicos (CHITTOOR *et al.*, 1999). Porém, a aplicação mais importante da peroxidase é em diagnósticos analíticos, onde são utilizadas como componente chave de biosensores e imunoensaios (KAMAL e BEHERE, 2008), sendo comum o uso desta enzima em ensaios de "Western blot" na etapa de detecção (CHAU e LU, 1995).

Devido também a sua alta resistência térmica e relativa simplicidade de ensaio de atividade, esta enzima é utilizada como monitora da adequacidade de processos térmicos e estabilidade de alimentos. Pesquisas também vêm focando o uso potencial de peroxidase em tratamento de efluentes para remoção de compostos aromáticos de água de tratamento de indústrias (MACHADO e SARAIVA, 2005; KARAM e NICELL,1997). O uso de sulfato de amônio sólido já foi utilizado na purificação parcial de peroxidases de *Salvia species* (DÖGAN, 2007).



Figura 2.5: Estrutura tridimensional de uma peroxidase de rabanete (PDB Code 2B12).

2.4.5. Lipase

Lipases (triacilglicerol acil hydrolase; EC 3.1.1.3) são enzimas pertencentes ao grupo das serino proteases que atuam sobre triglicerídeos (PASTORE *et al.*, 2003) e são capazes de catalisar diversas reações, entre elas hidrólise, esterificação e transesterificação (JAEGER e EGGERT, 2002). Essas enzimas, encontradas em células animais e vegetais, além de serem produzidas por microrganismos, se tornaram catalisadores em uma ampla variedade de processos químicos industriais, sendo produzidas em larga escala (KIRK *et al.*, 2002).

Entre as várias aplicações industriais das lipases tem-se a produção de biodiesel (PARK e PIZARRO, 2003), o uso da enzima como aditivo na fabricação do

sabão em pó e a utilização no tratamento de efluentes industriais com alta carga orgânica, como os efluentes de laticínios, indústrias de óleo e aviários. No sistema digestivo humano, ela tem como função, basicamente, transformar lipídeos em ácidos graxos e glicerol. Entre as aplicações de "salting-out" para essa enzima, tem-se a adição de sulfato de amônio no caldo de cultura objetivando-se sua precipitação e purificação (BEISSON *et al.*, 2000).

A enzima lipase utilizada nesse trabalho é proveniente de *Humicolas sp.* e apresenta massa molecular entre 30,0 e 40,0 kDa. A atividade da enzima varia com o pH, tendo pH ótimo de 7,5 e pl igual a 4,5. A estrutura tridimensional da lipase de *Humicola lanuginosa*, de massa molecular de aproximadamente 33,0 kDa, está apresentada na Figura 2.6.



Figura 2.6: Estrutura tridimensional de lipase de Humicola lanuginosa (PDB Code 1TIB).

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os materiais utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho, dentre os quais estão as enzimas, os reagentes químicos e os equipamentos necessários para a realização dos ensaios. A seguir, as metodologias empregadas para a determinação da concentração das proteínas, o preparo das soluções de sal volátil, as determinações de atividades enzimáticas incluindo a determinação das faixas da variáveis-respostas operacionais de cada método enzimático são relatadas assim como as metodologias empregadas para a caracterização das enzimas através de eletroforese SDS-PAGE. Em seguida, a verificação da influência dos sais carbamato de amônio e sulfato de amônio na medida de concentração da α-amilase por absorbância a 280 nm, a determinação da estabilidade das enzimas em soluções de sais, a estabilidade da peroxidase em tampão carbonato-bicarbonato, a precipitação das enzimas e a determinação dos balanços de massa e de atividade daquelas que precipitaram também serão descritas e estão representadas esquematicamente pela Figura 1.1.

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

Apresentam-se a seguir as fontes e principais características dos produtos enzimáticos utilizados neste trabalho. A Tabela 3.1 contém valores de parâmetros característicos destas enzimas, exceto para celulase para a qual dados similares foram sumarizados na Tabela 2.2.

A **α-amilase** utilizada neste trabalho era de *Bacillus sp.* presente em um pó correspondente ao meio fermentado bruto, produto tipo XI-A, A-1278 da Sigma (EUA).

A **lisozima** de clara de ovo de galinha era o produto L6876 da Sigma (EUA). Esta preparação enzimática tinha pureza de 90% após três cristalizações, diálise e liofilização, tendo como principais impurezas sais como acetato de sódio e cloreto de sódio.

A **celulase** aqui estudada tratava-se do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*, produto Celluclast 1.5L, obtido da Novozyme A/S, (Dinamarca) vendido como produto C2730 da Sigma (EUA).

A **peroxidase** de rabanete (HRP) foi adquirida da Sigma (EUA), produto P8000, e tinha pureza de aproximadamente 90%, segundo o fabricante.

A **lipase** era de *Humicola sp.* proveniente da Novo Nordisk (Dinamarca), produto 100L-EX.

Enzima pl		Massa molecular	pH ótimo	Referência	
		(kDa)			
		50,0 - 55,0 ^a	$6,0-7,0^{b}$	SIGMA	
α – Amilase	7,0 ^b	57,7 ^b	6,5 ^b	NAJAFI <i>et al.</i> , 2005	
		50,0 ^c	$5,5-6,5^{c}$	SIGMA	
Lisozima	11,35	14,3	6,2	SIGMA	
Peroxidase	7,2	40,0	7,0	MAEHLY,1955	
Lipase	4,4 ^d	31,7 ^d	7,0-11,0 ^d	WANNERBERGER <i>et al.,</i> 1997;	
				FERNANDES et al., 2004	

Tabela 3.1: Características de quatro enzimas estudadas.*

^a α – Amilase de *Bacillus sp*, ^b α – Amilase de *Bacillus subtilis*,^c α – Amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, ^d Lipase de *Humicola lanuginosa*

*Dados similares para celulase se encontram na Tabela 2.2.

3.1.2. Reagentes químicos

Para a preparação da solução de carbamato de amônio foi utilizado carbonato de amônio da Mallinckrodt Chemicals (Reino Unido) e solução de hidróxido de amônio da Labsynth (Brasil). Além disso, para o preparo de soluções tampão e de substratos foram utilizados: fosfato de sódio monobásico, fosfato de potássio monobásico, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, tartarato de sódio e potássio, glicose D(+) monohidratada (Dextrose/D-Glucose), hidróxido de potássio, goma arábica em pó (pura), ácido cítrico anidro, álcool etílico absoluto e acetona, todos obtidos da Labsynth (Brasil). Hidróxido de sódio foi adquirido da Nuclear (Brasil). O substrato amido solúvel de batata (EC 232-686-4, número de catálogo S2004, 9005-84-9) e o substrato células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (M3770), foram obtidos da Sigma (EUA). O substrato papel de filtro nº. 1 era da Whatman. O substrato pirogalol era da Mallinckrodt Chemicals (Reino Unido). O peróxido de hidrogênio foi adquirido da Labsynth (Brasil), Ácido 3,5-dinitrosalicílico e metabissulfito de sódio foram obtidos da Vetec Química Fina (Brasil) e azeite de oliva grau alimentício (Carbonell, Espanha), com 0,5% de acidez foi adquirido no mercado local. O hidroxipropilmetilcelulose (Combizel HK 70M) era da Denver Especialialidades Químicas (Brasil). Água ultrapura foi obtida com o equipamento Milli-Q System (Millipore, EUA). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

3.1.3. Outros materiais e equipamentos

Durante os ensaios, o pH das soluções foi medido através de pHmetro modelo 430 da Corning (EUA). Para a determinação da concentração de proteína e atividade enzimática, medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Beckman modelo DU650 (EUA). A remoção de água e sal volátil foi realizada através de liofilização em Lioalfa modelo 6-80 da Telstar (Espanha). As colunas de dessalinização foram colunas de permeação PD-10 obtidas da GE Healthcare (Suécia). Durante esses ensaios, a temperatura foi mantida constante com o auxílio de um banho Tecnal TE-2000 com precisão de 0,1 °C (Brasil). Para a manutenção da temperatura nos ensaios

de atividade da lipase foi utilizado um banho-maria metabólico termostatizado tipo Dubnoff, modelo TE053, marca Tecnal, Brasil. Centrífuga Eppendorf modelo 5804R (Alemanha) foi utilizada para a separação das fases sobrenadante e precipitado e para a obtenção dos perfis eletroforéticos foi utilizado o equipamento Mini-Protean III (BioRad, EUA)

3.2. Procedimentos

3.2.1. Determinação da concentração das proteínas

A determinação das concentrações de proteína total em solução foi feita através de medidas de absorbância a 280 nm e através do método proposto por BRADFORD (1976) com albumina de soro bovino (Sigma, EUA) como referência para a obtenção da curva padrão. Para as medidas feitas através de absorbância a 280 nm, os valores dos coeficientes de absorção (a²⁸⁰mg/ml) para as enzimas foram previamente determinados através da construção de uma curva padrão que relaciona medidas de absorbância a 280 nm com diferentes concentrações conhecidas da enzima de interesse em solução do agente tamponante específico. Porém, algumas das enzimas analisadas, como celulase e lipase eram fornecidas em solução de concentração desconhecida, sendo necessário determinar previamente a concentração de proteínas totais em soluções de diferentes concentrações através do método proposto por BRADFORD (1976), e relacionar estes valores com medidas de absorbância a 280 nm, construindo-se duas curvas de calibração, uma a partir do método de BRADFORD e outra de absorbância a 280 nm. No caso da enzima α-amilase, foram preparadas suspensões do pó correspondente ao meio fermentado bruto em tampão específico e essas suspensões foram homogeneizadas por inversão durante 3 h para solubilização da enzima. Após transcorrido este tempo, as suspensões eram centrifugadas por 15 min e o sobrenadante constituía-se de uma solução límpida, considerada neste trabalho como solução enzimática de α-amilase. Após obtida, esta solução enzimática estoque foi utilizada para construção das curvas padrão de BRADFORD e de absorbância a 280 nm, tal qual as enzimas celulase e lipase.

O procedimento do método de BRADFORD constitui-se em adicionar 1,00 mL de solução de reagente azul de Commassie previamente preparada em 100 µL de amostra a ser analisada e medir a absorbância a 595 nm desta mistura após 10 min.

3.2.2. Preparo das soluções de sal volátil

A solução de sal carbamato de amônio foi preparada a partir de hidróxido de amônio e do sal carbonato de amônio sólido, conforme procedimento apresentado por WATANABE *et al.* (2006): uma certa massa de carbonato de amônio sólido (uma mistura de bicarbonato de amônio e carbamato de amônio cuja fração de amônia é 30% em massa) dissolvida em água e um volume de solução de hidróxido de amônio previamente calculado foram combinados de modo que a razão entre nitrogênio e carbono fosse igual a 2,0, de acordo com VAN BERLO *et al.* (2000). O recipiente contendo o sal preparado era vedado e mantido sob agitação a temperatura ambiente até dissolução total do carbonato de amônio.

3.2.3. Determinação das atividades enzimáticas

3.2.3.1. α-Amilase

O método de determinação de atividade da α -amilase foi adaptado a partir do método apresentado por BERNFELD (1955) e baseia-se na quantificação do açúcar formado pela ação da enzima a partir de amido solúvel medido através da absorbância a 540 nm. Para a realização dos ensaios foram utilizados tubos de ensaio (13X100 mm) imersos em banho termostático mantido a 20,0°C, nos quais se adicionaram 250 µL de solução de amido solúvel de concentração fixa de 0,01 g/mL e 250 µL de solução enzimática a ser analisada, ambos preparados em 20 mmol/L de tampão fosfato de sódio pH 6,9 com 6,7 mmol/L de cloreto de sódio. Após 3 min de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 500 µL de reagente DNS preparado segundo SUMNER (1921). Em seguida, os tubos foram vedados e imersos em água fervente por 15 min, após o qual as amostras foram colocadas em banho de gelo por 5 min. Diluiuse as amostras com 5,0 mL de água e determinou-se a absorbância a 540 nm. Uma

unidade enzimática é a quantidade de enzima que libera 1,0 mg de glicose a partir do amido em 3 min nas condições do ensaio.

A atividade específica, expressa em termos de atividade por miligrama de proteína, foi calculada através da expressão:

Atividade Específica
$$(U/mg) = \frac{(\alpha * A_{540nm})(D)}{(C)} \left(\frac{V_{Total}}{V_{Enzima}}\right)$$
 (3.1)

em que $\alpha * A_{540nm}$ resulta na concentração (mg/mL) de açúcar determinada através da curva padrão em termos de glicose onde α é o coeficiente angular e A_{540nm} é a absorbância determinada a 540 nm; D é o fator de diluição; C é a concentração de proteína da solução enzimática (mg/mL); V_{Total} é o volume total do meio (mL) e V_{Enzima} é o volume de enzima (mL) adicionado na reação de hidrólise.

3.2.3.2. Lisozima

O método utilizado para determinação da atividade da lisozima foi adaptado a partir do método apresentado por SHUGAR (1952) e baseia-se na determinação da taxa de redução turbidimétrica de uma suspensão celular de *Micrococcus lysodeikticus* medida através da absorbância a 450 nm em função do tempo. Para a realização do ensaio, adicionou-se em uma cubeta de quartzo a 25,0°C, 2,5 mL de suspensão de *M. lysodeikticus* 0,15 mg/mL e 100 µL de solução enzimática, ambas preparadas em tampão fosfato de potássio 66 mmol/L pH 6,24. A enzima atua rompendo a membrana celular das bactérias e a suspensão que inicialmente é turva, torna-se límpida com o passar do tempo. Imediatamente após a adição do substrato e enzima, a agitação foi realizada por inversão e registrou-se o decréscimo da absorbância a 450 nm por aproximadamente 5 min. Uma unidade enzimática produz uma variação de absorbância de 0,001 por minuto nas condições do ensaio.

Para esta enzima, a atividade específica foi calculada através da expressão:

Atividade Específica
$$(U/mg) = \frac{((\Delta A_{450\,nm} (teste) - \Delta A_{450\,nm} (branco))/t)(D)}{(C) * 0,001 * V_{Enzima}}$$
 (3.2)

em que $((\Delta A_{450nm} (teste) - \Delta A_{450nm} (branco))/t)$ é a inclinação da curva da absorbância a 450 nm em função do tempo (descontando-se a diferença entre a inclinação para a amostra analisada e para seu branco); D é o fator de diluição; C é a concentração de proteína da solução enzimática (mg/mL); V_{Enzima} é o volume de enzima adicionado na reação (mL); 0,001 é a variação da absorbância a 450 nm por definição de unidade.

3.2.3.3. Celulase

O método de determinação de atividade da celulase utilizado foi adaptado do método apresentado por GHOSE (1987) no qual a atividade de celulase é calculada em termos de "filter-paper units" por mililitro de solução enzimática (FPU/mL). Este método baseia-se na quantificação através da redução do reagente DNS medida por absorbância a 540 nm da glicose liberada a partir da celulose. Para a determinação da atividade da celulase, 50 mg de papel de filtro Whatman nº. 1 e 1,0 mL de tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8 foram adicionados em tubos de ensaio (13X100 mm) e mantidos a 50,0°C por 5 min em banho termostático. A seguir, adicionaram-se 500 µL de solução enzimática. Após 60 min de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 3,0 mL de reagente DNS preparado de acordo com MILLER (1959). Em seguida, colocaram-se os tubos (previamente fechados) imersos em água fervente por 10 min, e transcorrido este tempo, os tubos foram imersos em banho de gelo por 5 min. Após mais 20 min, tempo suficiente para que o papel de filtro decantasse, 200 µL da mistura reacional de cada tubo foram colocados em cubetas e diluídos adicionando-se 2,5 mL de água. A seguir, mediu-se a absorbância a 540 nm da solução obtida. Uma unidade enzimática (FPU) é a quantidade de enzima que libera 2,0 mg de acúcar redutor como a glicose a partir de 50 mg de papel de filtro nas condições do ensaio.

Para o cálculo da atividade da celulase, expressa em termos de FPU por mililitro de proteína, foi utilizada a seguinte expressão:

Atividade Específica
$$(FPU/mL) = \frac{(C)}{(0,37)}$$
 (3.3)

em que (*C*) é a concentração de enzima (mg/mL) necessária para transformar 50 mg de substrato em 2 mg de glicose, ou seja, a concentração enzimática necessária para realizar 4% de conversão do substrato; o numerador 0,37 é derivado do fator de conversão de 2,0 mg de glicose gerados no ensaio por mmol de glicose, a partir do volume de enzima utilizado e do tempo requerido para geração dos açúcares redutores:

0,37
$$(\mu mol / \min mL) = \frac{[2,0 mg_{glicose} / (0,18016 mg_{glicose} / \mu mol)]}{0,5 mL_{enzima} \cdot 60 \min}$$
 (3.4)

Apesar da constante 0,37 ter seu cálculo baseado nas unidades internacionais de atividade do Sistema Internacional de medidas (S.I.), a celulase não tem sua atividade determinada nestas unidades devido que as mesmas são baseadas nas taxas iniciais de reação, portanto, esta enzima deve ter sua atividade expressa simplesmente como FPU.

Para a determinação da concentração de proteína que resultaria na geração de uma massa de glicose de 2,0 mg por ensaio, determina-se experimentalmente pelo menos duas concentrações de proteína que resultem em diferentes massas de glicose produzida, uma maior e outra menor que os 2,0 mg, fazendo-se uma interpolação para a concentração protéica relativa a 2,0 mg.

3.2.3.4. Peroxidase

O método utilizado para a determinação da atividade da peroxidase foi aquele apresentado por CHANCE e MAEHLY (1955), que se baseia na determinação da taxa de aumento da absorbância a 420 nm como conseqüência da conversão do substrato pirogalol em purpurogalina. Em uma cubeta de quartzo termostatizada a 20,0°C adicionaram-se 1050 µL de água destilada, 160 µL de tampão fosfato de potássio pH 6,0, 80 µL de peróxido de hidrogênio e 160 µL de pirogalol. A mistura da solução foi realizada por inversão e a solução foi mantida por 5 min a 20,0°C. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de solução enzimática e imediatamente misturou-se novamente por inversão e registrou-se a variação de absorbância a 420 nm por aproximadamente 5 min. Uma unidade enzimática forma 1,0 mg de purpurogalina a partir de pirogalol em 20 s nas condições do ensaio.

A atividade específica, expressa em termos de atividade por miligrama de proteína, foi calculada através da expressão:

Atividade Específica
$$(U/mg) = \frac{((\Delta A_{420nm} (teste) - \Delta A_{420nm} (branco))/t)(D)}{(C) * 12} \left(\frac{V_{Total}}{V_{Enzima}}\right)$$
 (3.4)

em que $(\Delta A_{420nm} (teste) - \Delta A_{420nm} (branco))/t)$ é a taxa de variação da absorbância a 420 nm da amostra analisada (descontando-se a variação de absorbância do seu branco) em 20 s; *D* é o fator de diluição; *C* é a concentração de proteína da solução enzimática (mg/mL); V_{Enzima} é o volume de enzima adicionado na reação (mL); V_{Total} é o volume total do meio (mL); 12 é o valor do coeficiente de extinção de 1 mg/mL de purpurogalina a 420 nm.

3.2.3.5. Lipase

O método utilizado para determinação da atividade da lipase baseia-se na hidrólise da emulsão do azeite de oliva de acordo com a metodologia apresentada por SOARES *et al.* (1999). Para a preparação da emulsão, adicionou-se em um béquer, 50 mL de solução 7% de goma arábica pura preparada com 2 dias de antecedência e 50 mL de azeite de oliva, e agitou-se por 1 min utilizando-se homogeneizador doméstico. A emulsão resultante ficou sob agitação constante, com auxílio de uma placa de agitação magnética até seu uso.

Para a determinação das atividades, foram adicionados 2000 µL da solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 e 5000 µL da emulsão previamente preparada em frascos Erlenmeyer de 50 mL. Em seguida, foram acrescidos 1000 µL de solução protéica. Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 37ºC por 20 min, em banho maria. Transcorrido o tempo de incubação, a reação foi parada pela adição de 10 mL de solução álcool - acetona (1:1) em cada um dos frascos Erlenmeyer. Os ácidos graxos liberados foram titulados com KOH 50 mmol/L usando 3 gotas de solução de

fenolftaleína 5% (em álcool) como indicador. A partir do volume de KOH utilizado, calculou-se a atividade hidrolítica da enzima. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que forma 1,0 µmol de ácido graxo livre por minuto nas condições do ensaio.

A atividade específica, expressa em termos de atividade por miligrama de proteína, foi calculada através da expressão:

Atividade Específica
$$(U/mg) = \frac{((\alpha)(V_{KOH}teste - V_{KOH}branco))}{(t)*(C)} \left(\frac{V_{Total}}{V_{Enzima}}\right)$$
 (3.5)

em que $((\alpha)(V_{KOH}teste - V_{KOH}branco))$ nos dá a concentração de ácido oléico através da curva padrão; *C* é a concentração de proteína da solução enzimática (mg/mL); V_{Enzima} é o volume de enzima adicionado na reação (mL); V_{Total} é o volume total do meio (mL) e *t* é o tempo de incubação (min).

3.2.4. Determinação das faixas de variáveis-respostas operacionais nas dosagens de atividades enzimáticas

Como parte da implementação do ensaio de atividade das proteínas, foi feita, para cada uma das enzimas estudadas, a determinação dos valores das variáveis respostas que limitam a faixa confiável na qual a atividade específica apresenta valores constantes. Valores muito altos para as variáveis respostas significam uma atividade muito alta na mistura reacional que pode levar ao consumo excessivo de substrato, o que reflete em atividade calculada menor que o devido. Valores muito baixos para as variáveis respostas indicam pouca enzima ativa na mistura reacional e o resultado obtido pode estar alterado devido aos erros experimentais se tornarem relativamente grandes, na ordem de grandeza da atividade medida. Estas variáveis respostas foram as determinações de valores de absorbância relacionadas com a formação de produto, as taxas de consumo de substrato ou formação de produto ou a determinação do volume de reagente necessário para neutralizar um produto específico.

3.2.5. Análise de perfil protéico por eletroforese SDS-PAGE

As análises de eletroforese para a obtenção dos perfis protéicos das enzimas estudadas foram realizadas utilizando-se gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes e redutoras de acordo com o protocolo descrito por LAEMMLI (1970). Soluções enzimáticas com concentração total de proteína de aproximadamente 0,5 mg/mL foram preparadas em tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) com ou sem a presença de β -mercaptoetanol e em seguida foram aquecidas de 5 - 7 min a 100°C para serem desnaturadas. Alíquotas de 15 μ L de cada amostra foram aplicadas nos géis de poliacrilamida que foram submetidos à voltagem constante de 180 V em cuba vertical. O procedimento de coloração foi realizado com solução de nitrato de prata segundo protocolo descrito por MORYSSEY (1981). Os marcadores de massa molecular usados foram albumina de soro bovino (66 kDa), ovalbumina de ovo de galinha (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24 kDa), inibidor de tripsina da soja (20 kDa) e α -lactalbumina de leite bovino (14,2 kDa).

As caracterizações das enzimas foram feitas comparando-se as bandas protéicas com dados da literatura e dos fornecedores.

3.2.6. Efeito dos sais na medida da concentração de α-amilase por A_{280 nm}

Um estudo da influência da concentração dos sais sulfato de amônio e carbamato de amônio no coeficiente de absorção da equação de reta utilizada para determinar a concentração protéica foi realizado para o caso da α-amilase. Para ambos os sais foi preparada uma solução enzimática de concentração pré-fixada, que foi combinada com diferentes concentrações de sal de tal forma que a concentração final da enzima fosse 0,04 mg/mL e 0,23 mg/mL para os sais sulfato de amônio e carbamato de amônio, respectivamente. As concentrações de sal utilizadas foram entre 0,0 e 3,5 molar para o sal convencional e entre 0,0 e 7,0 molal para o sal volátil. As medidas de absorbância foram realizadas à temperatura ambiente (25,0°C) e a solução utilizada

como branco nestes estudos foi o tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 6,9 com 6,7 mmol/L de cloreto de sódio. Assim, pôde ser observada a mudança do valor do coeficiente de absorção da reta em função da concentração de sal utilizada, mudança tal que não se destina a evidenciar possíveis modificações estruturais na proteína decorrentes do acréscimo do sal, mas sim, a ser fator de correção para a determinação da concentração da α-amilase em soluções contendo diferentes concentrações de sais convencional e volátil (por absorbância a 280 nm) sem que se faça necessário variar a concentração deste sal na célula de referência.

Para as demais enzimas não foram realizados estudos de influência da concentração de sais na absorção a 280 nm, o que será discutido posteriormente (seção A2.1), tendo sido determinados apenas os respectivos coeficientes de absorção em tampão específico.

3.2.7. Determinação da estabilidade das proteínas em solução de sais

Os tratamentos das diferentes enzimas com os diferentes sais foram realizados em batelada. Em frascos tipo Falcon de capacidade de 15 mL, colocou-se tampão específico (usado como agente tamponante no protocolo de medida de atividade de cada enzima) e um volume fixo de solução enzimática de concentração previamente estabelecida. Solução de sal foi adicionada de modo a produzir tratamentos de diferentes forças iônicas (1,0, 2,0, 3,0 e 5,0 molal). As misturas foram mantidas por 60 min a 4,0°C e foram imediatamente congeladas com nitrogênio líquido para posterior dessalinização através de secagem por liofilização (24 h a pressão entre 0,072 a 0,095 mbar), no caso do sal volátil carbamato de amônio, ou através de colunas de permeação em gel, no caso dos sais convencionais (sulfato de amônio e sulfato de sódio). Após a dessalinização, cada tratamento foi submetido à dissolução e diluição com agente tamponante e teve sua concentração de proteína e sua atividade específica determinadas.

Para o caso do sal volátil carbamato de amônio, além dos tratamentos salinos para cada uma das enzimas, foram feitos tratamentos controles. O tratamento nomeado

controle de liofilização foi feito substituindo-se o sal pelo agente tamponante específico de cada enzima. O controle de pH foi feito substituindo-se o sal por agente tamponante com valor de pH igual ao pH das soluções do sal volátil (agente tamponante de pH 10,20). O controle geral de atividade foi feito conforme o controle de liofilização descrito acima, mas sem ser submetido ao processo de liofilização. O objetivo do uso desses controles foi verificar a influência do processo de liofilização e do valor de pH da solução de sal volátil na desnaturação das enzimas através da comparação dos controles de liofilização e de pH com o controle geral. Nos tratamentos realizados com os sais convencionais, os controles estabelecidos foram o controle geral e controle de pH, porém o controle de pH foi realizado indiretamente através da adequação do valor de pH da solução de sulfato de sódio para o valor do pH da solução de sal volátil.

3.2.8. Efeito de diferentes íons e do processo de liofilização na estabilidade da peroxidase

Com o intuito de investigar o efeito dos ânions carbonato e bicarbonato e simultaneamente comprovar o efeito não desnaturante do ânion sulfato sobre a atividade da peroxidase, ensaios de estabilidade foram realizados adicionando-se em frascos tipo Falcon de capacidade de 15 mL, 300 µL de solução enzimática de concentração igual a 2,00 mg/mL e diferentes tampões de modo a produzir 3,0 mL de tratamentos de diferentes íons e diferentes pHs, já que o pH do tratamento controle é igual a 6,00 e o pH dos demais tratamentos estudados é 10,20, devido à adequação dos valores de pH ao valor do pH da solução de sal volátil. Após a dessalinização e deteminação das concentrações enzimáticas, cada tratamento foi devidamente diluído com tampão do protocolo de atividade e as atividades foram determinadas. Os três tampões analisados neste ensaio foram: fosfato de potássio 100 mM a pH 6,00 e a pH 10,20 e carbonato foi comparado com os efeitos dos tampões fosfato de potássio 100 mM a pH 6,0 (tampão de atividade), fosfato de potássio 100 mM a pH 10,2 e sulfato de sódio pH 10,2 (seção 3.2.7).

Deve-se evidenciar que nestes experimentos o processo de dessalinização foi realizado através de colunas de permeação em gel como meio de se comparar os resultados obtidos com os resultados da seção 3.2.7 (no qual o tratamento controle geral em tampão fosfato de potássio 100 mM a pH 6,00 foi dessalinizado através de liofilização) e, deste modo, avaliar o efeito do processo de liofilização sobre a atividade enzimática, já que aparentemente este processo, realizado conforme a seção anterior, levou à desnaturação da peroxidase. Nesta análise, a comparação realizada foi entre os tratamentos controle geral em tampão fosfato de potássio 100 mM a pH 6,00 mM a pH 6,00 desta seção e da seção anterior.

3.2.9. Precipitação das enzimas e determinação de seus balanços de massa e de atividade

Ensaios de precipitação das enzimas α-amilase, celulase, peroxidase e lipase foram realizados com o intuito de analisar o efeito do processo de precipitação na manutenção da atividade das mesmas. A lisozima não foi submetida à precipitação com sal volátil neste trabalho, pois dados da precipitação desta enzima já haviam sido determinados em trabalhos anteriores realizados por WATANABE (2007) e LIMA (2006).

Em frascos tipo Falcon de 15 mL, colocou-se tampão específico (usado como agente tamponante no protocolo de medida de atividade de cada enzima) e um volume fixo de solução enzimática de concentração previamente estabelecida. Solução de sal foi adicionada de modo a produzir 3,0 mL de misturas referentes a tratamentos de diferentes forças iônicas (9,0, 7,0 e 5,0 molal) que foram mantidos por 60 min a 4,0°C. Após transcorrido este tempo, foi verificada visualmente a presença ou ausência de fase precipitado nos tubos e os mesmos foram submetidos à centrifugação por 15 min a 5000 g para separação de fases. Em seguida os respectivos precipitado e sobrenadante de cada tratamento eram imediatamente submetidos à dessalinização através de colunas de permeação em gel. Através da determinação da concentração de massa do processo de precipitação e os precipitados e sobrenadantes foram diluídos

adequadamente com agente tamponante para que a atividade específica fosse determinada. Além dos tratamentos salinos para cada uma das enzimas, foi feito o tratamento controle que teve solução salina substituída por agente tamponante. Para efeitos de comparação, estes experimentos foram realizados a 4,0°C e com tempo de envelhecimento de 60 min, tal qual utilizados nos estudos de estabilidade anteriores.

O balanço de massa foi feito com a intenção de se avaliar as perdas de massa ocorridas durante a dessalinização por coluna de filtração em gel e também para se avaliar a confiabilidade dos resultados de atividade específica baseados nos resultados do balanço de atividade.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo apresentam-se os resultados deste trabalho e suas devidas discussões. Primeiramente, os perfis protéicos obtidos por eletroforese SDS-PAGE das enzimas são apresentados. A seguir, são mostrados os resultados das análises do efeito do sal carbamato de amônio na atividade catalítica das cinco enzimas estudadas e do efeito dos sais sulfatos de amônio e de sódio nas atividades de celulase e peroxidase. Resultados de atividade da peroxidase após contato com diferentes tampões em diferentes valores de pH também são apresentados, com destaque para a análise do efeito do processo de liofilização na atividade desta enzima. Por último, são exibidos os resultados dos ensaios de precipitação das enzimas com sal volátil e os balanços de massa e atividade para as enzimas que precipitaram (celulase e peroxidase).

4.1. Análise dos perfis protéicos por eletroforese SDS-PAGE

A fim de se avaliar a pureza das enzimas estudadas, os perfis das bandas protéicas destas enzimas foram obtidas através de eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.1). Para a celulase de *T. reesei* foram feitas 2 análises, uma com a celulase obtida da empresa Sigma (EUA) e outra com a celulase proveniente diretamente da Novozyme (Brasil).

Através da relação linear existente entre a mobilidade eletroforética das proteínas do marcador de massa molecular e o logaritmo de suas respectivas massas moleculares, pode-se fazer uma interpolação para determinar as massas moleculares

das enzimas estudadas a partir de suas respectivas mobilidades. Comparando-se as pistas 1 e 2 no gel A, observa-se que a enzima α -amilase apresenta uma concentração mais elevada de proteínas de massas entre 45 e 66 kDa. Segundo o fornecedor, a massa molecular da enzima ativa está entre 50 e 55 kDa. Além dessa enzima, existem na pista 2, outros compostos de massa molecular abaixo de 45 kDa em menor concentração. Como a α -amilase se trata de uma enzima em seu extrato bruto, este resultado era esperado. A banda mais nítida da pista 2 apresenta segundo os cálculos de mobilidade eletroforética, massa molecular de 54 kDa, correspondente à massa molecular da enzima α -amilase.



Figura 4.1: Perfil eletroforético (SDS-PAGE em gel 15%) de soluções enzimáticas em tampões de atividade. Tampão de desnaturação sem β -mercaptoetanol no gel A e com β -mercaptoetanol no gel B. Pista 1, marcadores de massa molecular; pista 2, solução de α -amilase; pista 3, solução de lisozima; pista 4, solução de celulase de *Trichoderma reesei* (adquirida da Sigma); pista 5, solução de celulase de *Trichoderma reesei* (obtida diretamente da Novozyme); pista 6, solução de peroxidase; pista 7, solução de lipase. Revelação feita com nitrato de prata.

Analisando a pista 3, pode-se verificar que a lisozima é uma enzima de alta pureza pois somente uma banda aparece nos géis. Através dos cálculos de mobilidade

eletroforética, esta enzima apresenta massa de 14,3 kDa, valor muito próximo do teórico (14,2 kDa segundo dados do fornecedor).

Nas pistas 4 e 5 do gel A observa-se o perfil da enzima celulase adquirida da Sigma (EUA) é praticamente o mesmo obtido para celulase da Novozyme, confirmando que se trata da mesma enzima conforme informação obtida do catálogo da Sigma, no que a qual esclarece-se enzima C2730 de Τ. reesei é a Celluclast 1.5 L proveniente da Novozyme. A partir da determinação da mobilidade eletroforéticas das cinco bandas mais nítidas deste complexo enzimático, encontraram-se no gel A as seguintes massas moleculares: 74, 60, 53, 45 e 31 kDa, estando a maior banda entre os limites de 43 e 63 kDa. Segundo BELDMAN et al. (1985) a enzima celobiase possui massa de 76,0 kDa enquanto que as celobioidrolases e endoglucanases têm massas entre 60,5 e 62,0 kDa e entre 23,5 e 58,0 kDa respectivamente. REINIKAINEN (1994) verificou em seu trabalho que a massa molecular da enzima celobiase é 75,0 kDa enquanto que as celobioidrolases CBH I e CBH II têm massas entre 59,0 e 68,0 kDa e entre 50,0 e 58,0 kDa, respectivamente. Segundo este autor as enzimas de características endoglucanásicas têm massas variando entre 23,0 e 55,0 kDa. Assim, a massa de 74 kDa determinada através da mobilidade eletroforética provavelmente é de uma celobiase e as massas entre 50 kDa e 66 kDa provavelmente são de enzimas celobioidrolases. As demais proteínas de massas moleculares abaixo da banda de 45,0 kDa devem ser as endoglucanases que além de serem menores estão presentes em menores quantidades (correspondente a aproximadamente 6% do total de enzimas do complexo).

A solução de enzima peroxidase (pista 6) apresenta-se como uma solução de composição bastante heterogênea. De acordo com MAEHLY (1955), esta enzima apresenta massa molecular de 40,0 kDa. Comparando-se as pistas 6 dos géis A e B observa-se que há no gel A uma quantidade grande de proteínas de massas moleculares entre 29 kDa e 45 kDa e outra grande quantidade com massa próxima de 20 kDa, além de duas bandas fortes nas regiões de 15 kDa e 10 kDa. No gel B, a banda de proteína de massa entre 29 kDa e 45 kDa e 45 kDa é menos intensa e as bandas de 20 kDa, 15 kDa e 10 kDa tornam-se mais nítidas.

A solução de enzima lipase é apresentada nas pistas 7 como uma banda forte na região entre 29 kDa e 36 kDa, tanto para a eletroforese feita na presença quanto na ausência de β -mercaptoetanol, tornando evidente que, dentre as enzimas estudadas, ela é uma das mais puras. A enzima lipase utilizada nesse trabalho é proveniente de *Humicola sp* e segundo a literatura, apresenta massa molecular entre 30,0 e 40,0 kDa.

4.2. Efeito do carbamato de amônio na atividade catalítica das enzimas

Os resultados das determinações de atividade das enzimas para todos os tratamentos com sal volátil e controles geral, de liofilização e de pH estão apresentados na Tabela 4.1. O efeito de cada tratamento realizado foi analisado através do teste t de Student para verificar quando as diferenças entre os resultados são estatisticamente significante: uma diferença é significante quando o valor de t calculado é maior do que o valor crítico de t encontrado numa tabela de distribuição de valores t, em um nível de significância de p = 0,05.

Observou-se que a enzima α-amilase teve em média uma perda de atividade específica de 8% para as amostras que ficaram em contato com o sal em relação ao controle geral, ou seja, a quantidade de atividade enzimática alimentada em cada tubo (considerando-se zero de perdas). Porém, análises estatísticas indicaram que estas diferenças não foram significantes sugerindo que as atividades específicas para estes tratamentos não foram significantemente afetadas pelo sal carbamato de amônio. Comparando-se todas as amostras com o controle geral, a única que apresentou diferença significativa no nível de significância de 5% foi o controle de liofilização.

Para a lisozima e a lipase, os tratamentos salinos não apresentaram perda de atividade em nenhuma das forças iônicas avaliadas, assim como não houve redução de atividade para os controles de liofilização e pH, sendo que, em alguns destes tratamentos, a atividade específica foi maior do que a esperada. Porém, as diferenças entre os valores das médias em comparação com o controle geral não foram estatisticamente significativas. Estes resultados sugerem que as soluções de sal carbamato de amônio não tiveram efeito sobre a atividade específica destas enzimas.

Tabela 4.1: Atividades específicas (valor médio \pm desvio padrão) para tratamentos de α -amilase, lisozima, celulase, peroxidase e lipase em solução de carbamato de amônio por 60 min a 4,0 °C. Concentrações iniciais das enzimas: α -amilase, lisozima, e peroxidase, 2,00 mg/mL; celulase e lipase, 0,32 mg/mL e 4,00 mg/mL, respectivamente.

Atividade específica(U/mg)											
Enzima	Controles de atividade			Tratamento com carbamato de amônio (força iônica, molal)							
	Geral	Liofilização	рН	5,0	3,0	2,0	1,0				
α-Amilase	826,7 ± 71,8 ₅ (100%)	912,7 ± 62,7 ₅ (110%)	815,7 ± 115,2 ₆ (99%)	758,1 ± 91,7 ₅ (92%)	754,7± 55,3 ₅ (91%)	*	774,9 ± 43,3 ₄ (94%)				
Lisozima	18348 ± 1068 ₄ (100%)	19832 ± 1611 ₇ (108%)	18945 ± 2615 ₆ (103%)	18789± 2272 ₅ (102%)	19324± 2238 ₆ (105%)	19435 ± 1893 ₅ (106%)	18191 ± 1696 ₆ (99%)				
Celulase ^a	2,14 ± 0,11 ₃ (100%)	2,17 ± 0,27 ₆ (101%)	1,94 ± 0,33 ₆ (91%)	1,21 ± 0,16 ₅ (57%)	0,93 ± 0,18 ₅ (43%)	0,87 ± 0,14 ₅ (40%)	0,84 ± 0,06 ₃ (39%)				
Peroxidase	22,3 ± 1,7 ₄ (100%)	18,6 ± 1,7 ₄ (83%)	18,6 ± 1,1 ₄ (83%)	11,5 ± 1,1 ₄ (51%)	13,1 ± 1,4 ₄ (59%)	13,0 ± 1,1 ₄ (58%)	12,9 ± 1,8 ₄ (58%)				
Lipase	46557 ± 7538 ₄ (100%)	47747 ± 6480 ₄ (103%)	46444 ± 7203 ₃ (100%)	49446 ± 7007 ₄ (106%)	51485 ± 4347 ₄ (111%)	*	48427 ± 4622 ₄ (100%)				

Subscritos indicam o número de replicatas.

a - atividade específica da celulase é dada em FPU/mg.

* Não foram realizados experimentos nesta força iônica para as enzimas α -amilase e lipase.

Controle Geral – solução enzimática em contato com tampão de atividade sem passar pelo processo de liofilização.

Controle de Liofilização - solução enzimática em contato com tampão de atividade passando pelo processo de liofilização.

Controle de pH - solução enzimática em tampão de pH simulando a presença do sal volátil passando pelo processo de liofilização.

Para a peroxidase, as perdas de atividade específica foram de 49% para o caso de concentração de 5 molal de sal e aproximadamente 42% para outras concentrações de sal, indicando que o sal é um agente desnaturante para esta enzima. Comparandose com o controle geral, os tratamentos controles de pH e liofilização mostraram uma redução de 17% na atividade específica, porém, como este controle também foi submetido ao processo de liofilização, estas perdas de atividade são provavelmente devido a este processo de secagem que pode ter também um efeito desnaturante parcial sobre os outros tratamentos. Portanto, a perda de atividade da peroxidase pode ser atribuída aos efeitos combinados do sal e do processo de liofilização, mas não atribuída aos altos valores de pH das soluções do sal. Contudo, a não influência dos altos valores de pH sobre a estabilidade desta enzima não era esperada, já que YAN et al. (2007) relataram que HRP é estável em ambientes fracamente ácidos, mas instável em soluções básicas. Estes autores também acreditam que nestas condições, ocorre uma transição na estrutura secundária da enzima, que é reversível acima de certa faixa de pH. HOLZBAUR et al. (1996) também mostraram que a HRP retém a conformação de seus sítios ativos em valores de pH entre 4 e 7, porém, em outros valores de pH fora desta faixa, estas conformações podem mudar. Segundo KAMAL e BEHERE (2008), a enzima HRP é uma enzima bastante complexa, tendo entre os fatores estabilizantes de sua molécula o grupo heme prostético, quatro pontes dissulfeto, dois íons cálcio e oito glicanas, sendo que os processos de inativação/reativação desta enzima podem estar relacionados, em parte, à dissociação/reassociação do grupo heme prostético da mesma, sendo o processo de dissociação deste grupo do centro ativo da enzima pH dependente e ocorrendo mais rapidamente a valores de pH menores que 5, com completa desagregação a pH 2,4 e 25,0°C, conforme relatado por WHITAKER (1972).

Em relação ao efeito desnaturante do sal na atividade da peroxidase, o trabalho de NUEVO *et al.* (1993) indica como causas a redução do átomo de ferro e a alteração do ambiente hidrofóbico ao redor do grupo heme. Segundo estes autores, a transferência de elétrons que ocorre no grupo heme durante a reação da enzima peroxidase é realizada de duas diferentes formas dependendo da força iônica. Estes autores concluíram que, a baixos valores de força iônica, o processo é dominado por forças eletrostáticas, enquanto que em altos valores de força iônica, as interações
hidrofóbicas são as forças dominantes e a reação de redução do radical triptofano ocorre anteriormente à redução do ferro IV proveniente da oxidação do ferro III, sendo que o ferro IV fica inativado para as próximas reações. Sendo assim, pode ter ocorrido a inativação do átomo de ferro da enzima devido à exposição da molécula a altas forças iônicas. Outra possibilidade é de que, devido à exposição das regiões hidrofóbicas que geralmente ocorre em virtude das altas forças iônicas do meio, a cavidade interior que contém o grupo prostético, predominantemente hidrofóbico, foi morfologicamente alterada. Segundo KAMAL e BEHERE (2008), quando o grupo heme se liga à histidina por uma ligação coordenada, se estabelecem ligações de hidrogênio, pares iônicos e interações de van de Walls nos aminoácidos ao redor. A ligação do grupo heme é equivalente à introdução de vários grupos hidrofóbicos na estrutura da enzima, que incrementam a região hidrofóbica no interior da mesma, promovendo rigidez à sua estrutura secundária, sendo que o aumento da hidrofobicidade e de interações iônicas na cavidade que contém o grupo prostético leva a uma maior estabilidade da enzima.

Outra possibilidade que deve ser levada em conta é a de inibição da enzima por parte do sal volátil. SARIRI *et al.* (2005) mostraram que a inibição da enzima ocorre devido à ligação entre os grupos doadores de elétrons da enzima e os inibidores. Possivelmente isso não ocorreu neste trabalho, já que os grupos doadores de elétrons se ligariam provavelmente ao cátion amônio, que de acordo com a série de Hofmeister é um cátion cosmotrópico com a tendência de estabilizar a estrutura de proteínas (LADISCH, 2001).

Em relação à morfologia da molécula, é sabido através de estudos de estrutura de raios-X e de modelagem computacional que a HRP é principalmente helicoidal, mas "loops" desordenados também estão presentes (SMELLER *et al.,* 2004). Devido à baixa compactação deste tipo de morfologia ocorre maior exposição da molécula ao meio, o que a torna mais suscetível à desnaturação.

Para celulase, houve diferenças significativas entre os valores médios dos diferentes tratamentos em comparação com o controle geral. Uma perda de aproximadamente 43%, 57%, 60% e 61% foi verificada para as forças iônicas 5,0, 3,0, 2,0 e 1,0 molal, respectivamente, demonstrando uma dependência inversamente

proporcional entre a perda de atividade e a força iônica. As diferenças entre o tratamento a 5,0 molal e os demais foram estatisticamente significantes, porém, os tratamentos a 3,0, 2,0 e 1,0 molal de força iônica não mostraram diferença estatística entre elas. O controle de pH teve em média, recuperação de atividade 9,0% menor do que o controle geral, o que não representa diferença estatística significante. Para esta enzima, de modo similar à enzima peroxidase, possivelmente a perda de atividade se deve ao sal volátil e o alto valor de pH aparentemente não teve efeito desnaturante sobre a mesma. Estes resultados não estão de acordo com a literatura. ARUNACHALAM e KELLIS (1996) mostraram que a EGIII do complexo enzimático de *T. reesei* teve sua estabilidade muito reduzida a valores de pH alcalino. Estes autores não analisaram o desnovelamento da molécula em valores de pH acima de 9,5, mas conjeturaram que em pH alcalino, o decréscimo na estabilidade conformacional é resultado de uma desprotonação da histidina 108 que resulta na desestabilização do estado nativo pela criação de uma pequena diferença na exposição ao solvente entre os estados nativo e desnovelado. Uma relação entre a estabilidade enzimática e a titulação dos grupos sobre a enzima celulase proveniente de Penicillium notatum foi realizada por PETTERSSON e ANDERSON (1968). Eles mostraram que a valores de pH acima de 9,5, essa enzima pode apresentar desnovelamento de sua estrutura.

Deve-se levar em conta, que as celulases constituem um complexo enzimático caracterizado por elevada sinergia, ou seja, as enzimas do complexo celulásico juntas apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais (LYND *et al.*, 2002). Sendo assim, a desnaturação de uma das enzimas do complexo leva à perda de atividade como um todo, já que o ensaio de atividade utilizado neste trabalho avalia a atividade sinérgica total do complexo. Outra característica deste complexo de *T. reesei* é que a maioria das celulases são constituídas estruturalmente por dois "domínios" que funcionam independentemente: um "domínio" catalítico e um "domínio" de ligação à celulose ("cellulose binding domain", CBD), os quais estão ligados entre si por um polipeptídio ligante. As celulases representam, assim, um tipo de enzima em que é requerida a presença de dois "domínios", um catalítico e outro de ligação ao substrato sólido, para exercer toda a sua atividade (TEERI *et al.*, 1990).

Considerando que todas as enzimas avaliadas estavam nas mesmas condições (4,0°C por 60 min) e que os agentes tamponantes não são agentes desnaturantes (eles são usados como agentes tamponantes em protocolos de atividade), a perda de atividade da celulase poderia ser atribuída à força iônica da solução de sal ou à natureza do ânion carbamato, enquanto a perda de atividade da peroxidase poderia ser atribuída a estes fatores e também ao processo de liofilização. O processo de liofilização compreende uma següência de etapas de congelamento, sublimação da água e dissolução, todas as quais são passíveis de causar desnaturação de proteínas em alguns casos, principalmente a baixas concentrações (menor que 0,1 mg/mL), podendo esta desnaturação ser ou não reversível. A reversibilidade de desnaturação para a enzima lisozima após ser liofilizada é mencionada no trabalho de KENDRICK et al. (1996). Outro exemplo de mudança reversível na estrutura secundária de proteínas após liofilização ocorreu com lipase proveniente de Humicola lanuginosa (KREILGAARD et al., 1999). Verificar cada um dos passos do processo de liofilização como fonte da desnaturação está fora do foco deste trabalho, mas experimentos posteriores foram conduzidos para tentar elucidar o papel dos íons e da força iônica na desnaturação da celulase e peroxidase.

4.3. Efeito dos sais convencionais na estabilidade da celulase e peroxidase

Com o objetivo de entender o papel dos íons na desnaturação da celulase e peroxidase, experimentos similares foram feitos com os sais sulfato de amônio e sulfato de sódio. O primeiro é o sal mais comumente utilizado em "salting-out", tem o mesmo cátion monovalente do carbamato de amônio e solução de pH ácido (5,30). O último tem o mesmo ânion divalente do sulfato de amônio e um pH da solução básico (10,10). Os tratamentos realizados com ambos os sais não alterou a atividade das enzimas (Tabela 4.2). Para todas as concentrações de sal, as atividades específicas da celulase e peroxidase foram as mesmas do controle geral relacionado. Assim, uma comparação entre os dados das Tabelas 4.1 e 4.2 leva à conclusão que o carbamato de amônio é a razão da perda de atividade específica destas enzimas.

Comparando-se os sais convencionais com o sal volátil carbamato de amônio, pode-se inferir que os cátions amônio e sódio e o ânion sulfato estão entre os íons mais efetivos em precipitação de proteínas de acordo com a série de Hofmeister, sendo íons cosmotrópicos, com a tendência de estabilizar a estrutura de proteínas enquanto o ânion carbamato não está classificado nesta série (LADISCH, 2001). De acordo com RETAILLEAU *et al.* (2002), os grandes ânions monovalentes (como carbamato) são menos hidratados do que os ânions divalentes (como sulfato) porque os primeiros têm uma baixa densidade de carga, aumentam a mobilidade das moléculas de água ao redor (sendo por isso chamados íons caotrópicos) e, consequentemente, adsorvem preferencialmente em superfícies apolares, com tendência de desnaturar proteínas.

Além das possíveis causas para a desnaturação da celulase e peroxidase já citadas na seção 4.1, pode ter ocorrido a adsorção do ânion carbamato monovalente sobre resíduos de aminoácidos essenciais na reação e estabilidade enzimática,

Tabela 4.2: Atividades específicas (valor médio \pm desvio padrão) da celulase e peroxidase a 4º C por 60 min. Concentrações iniciais da peroxidase e celulase eram 2,00 mg/mL e 1,50 mg/mL, respectivamente.

		Atividade específica(U/mg)						
Enzima	Sal em	Controlo gorol	Força iônica (molal)					
	Soluçao		5,0	3,0	1,0			
Celulase ^a	Sulfato de	2,23 ± 0,07 ₄ (100%)	2,34± 0,15 ₄ (105 %)	2,34± 0,17 ₄ (105%)	2,32± 0,24 ₄ (104%)			
Peroxidase	(pH 5,3)	22,0 ± 0,7 ₄ (100%)	21,9 ± 1,2 ₄ (99%)	22,0± 1,0 ₄ (100%)	22,4± 3,4 ₄ (102%)			
Celulase ^a	Sulfato de	3,00 ± 0,14 ₄ (100%)	*	2,87 ± 0,43 ⁴ (95%)	3,08 ± 0,51 ⁴ (102%)			
Peroxidase	(pH 10,1)	22,6± 2,7 ₄ (100%)	22,0±2,2 ₄ (97%)	22,4 ± 2,5 ₄ (99%)	22,7 ± 3,4 ₄ (100%)			

Subscritos indicam o número de replicatas.

* Valor não determinado devido à precipitação da enzima.

^a Atividade específica da celulase é dada em FPU/mg.

enquanto que os ânions divalentes dos sais convencionais foram mais fortemente hidratados e não adsorveram sobre as proteínas. Apesar dos baixos valores de pl das enzimas celulase e peroxidase (4,2 - 6,1 e 7,2, respectivamente) e o alto pH das soluções de carbamato de amônio, esta adsorção poderia acontecer devido à alta concentração do carbamato de amônio e à existência de grupos carregados positivamente sobre a superfície da molécula (embora as enzimas tenham carga líquida negativa nestas condições).

Por outro lado, é difícil que uma macromolécula, com carga líquida bastante negativa, adsorva ainda mais cargas negativas. Assim, há a possibilidade de que a desnaturação destas moléculas tenha ocorrido devido à sua carga líquida bastante negativa em conjunto com o possível caráter caotrópico do sal carbamato de amônio. Segundo FONSECA et al. (2006), o equilíbrio de estabilização de proteínas em soluções aguosas é diferente do equilíbrio em soluções aguosas de sais caotrópicos, sendo que neste último caso, prevalece o estado desnaturado em relação ao estado nativo da proteína devido à diminuição da energia livre do estado desnaturado em virtude da maior hidratação da proteína (que está menos compactada), que favorece o aumento significativo da solubilidade. Sabe-se que a molécula protéica tem várias cargas líquidas distribuídas, que se repelem. Nas condições experimentais deste trabalho, com exceção da lisozima, as enzimas estão com carga líquida negativa acentuada, o que aumenta a repulsão entre elas. Na presença do sal caotrópico em alta concentração, a camada de água de hidratação, que geralmente estabiliza as cargas iônicas do sal diminuiria, e a molécula protéica ficaria sem o contrabalanço de uma camada estabilizadora de água, podendo fazer com que houvesse repulsão suficiente para alterar a conformação da proteína.

4.4. Efeito de diferentes íons e do processo de liofilização na estabilidade da peroxidase

Com o intuito de investigar o efeito do processo de liofilização sobre a atividade da peroxidase nos experimentos da seção 4.2, experimentos similares foram feitos com o processo de dessalinização realizado por cromatografia de filtração em gel. Além do

tampão fosfato de potássio pH 6,0 (tampão do protocolo de atividade), foram utilizados como controles de pH o tampão fosfato de potássio e o tampão carbonato-bicarbonato de sódio, ambos a pH 10,2 (Tabela 4.3). Assim, os efeitos dos ânions carbonato e bicarbonato sobre a atividade desta enzima puderam ser verificados através da comparação destes resultados com os resultados das seções 4.1 e 4.2.

Tabela 4.3: Atividades específicas (valor médio ± desvio padrão) da peroxidase após contato de 60 min a 4ºC com diferentes tampões. Concentração inicial da peroxidase igual a 2,00 mg/mL. Concentração de todos os tampões igual a 100 mmol/L.

Agente tamponante utilizado	Atividade específica (U/mg) [%]			
Fosfato de potássio pH 6,0	25,30 ± 2,84 ₆ [100%]			
Fosfato de potássio pH 10,2	23,66 ± 1,93 ₆ [94%]			
Carbonato-bicarbonato de sódio pH 10,2	23,80 ± 3,49 ₆ [94%]			

Subscritos indicam o número de replicatas.

[]: Valores entre colchetes se referem à porcentagem relativa, onde a referência (100%) é o tratamento da enzima em tampão de atividade.

Ambos os tampões a pH 10,2 apresentaram redução de 6% na atividade específica em relação ao tratamento em tampão de atividade a pH 6,0, porém estas diferenças não são significantes, comprovando que a redução de 17% na atividade específica do tratamento controle de pH da Tabela 4.1 foi provavelmente causada somente pelo processo de liofilização sem influência do alto valor de pH. Os íons do tampão carbonato-bicarbonato de sódio também não ocasionaram a desnaturação desta enzima. Como mencionado anteriormente, o cátion sódio apresenta natureza cosmotrópica e está entre os mais efetivos íons na indução da precipitação por "salting-out". O carbonato e o bicarbonato não estão classificados na série de Holfmeister, contudo, GÖRGÉNYI *et al.* (2006), realizam um estudo no qual eles avaliaram o efeito "salting-out" de diferentes cátions e ânions em não eletrólitos, e, dentre os ânions

avaliados, o único com efeito "salting-in" foi o nitrato enquanto que os demais induziram o "salting-out" dos não eletrólitos analisados. Neste estudo, o ânion bicarbonato foi o que apresentou menor valor da constante de Setschenow (Ks entre 0.090 \pm 0.008) e o carbonato o ânion com maior valor desta constante (0.210 \pm 0.035), sendo ambos, ânions que induziram o "salting-out" dos não eletrólitos.

Levando em consideração que ânions com maior densidade de carga têm maior capacidade de estabilizar proteínas e comparando-se os efeitos do ânion carbamato nos experimentos anteriores (seção 4.1) com o efeito dos ânions carbonato e bicarbonato desta seção, verifica-se que a desnaturação da peroxidase nos experimentos anteriores se deu possivelmente devido ao ânion carbamato possuir menor densidade de carga que os demais ânions analisados no presente trabalho. Além disso, a peroxidase foi submetida a condições de forças iônicas mais elevadas nos ensaios anteriores, tornando ainda mais provável a desnaturação da enzima com o carbamato de amônio.

4.5. Precipitação das enzimas com sal volátil

Como forma de se tentar preservar a atividade catalítica das enzimas estudadas, ensaios de precipitação das mesmas foram conduzidos nas mesmas condições dos experimentos de avaliação do efeito de soluções de sal sobre a atividade das enzimas (seções 4.1 e 4.2) para efeitos de comparação. Geralmente a enzima na fase precipitado é menos vulnerável aos efeitos desnaturantes do sal, pois somente as moléculas na superfície em equilíbrio com a solução são expostas à fase líquida, enquanto que na fase sobrenadante todas as moléculas protéicas estão expostas à solução salina. A atividade enzimática foi analisada em termos de atividade específica, uma vez que os balanços de massa realizados mostraram perdas de massa em alguns ensaios. Também foram realizadas precipitações da enzima celulase com soluções de sal na presença de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), como forma de se tentar preservar a atividade enzimática, uma vez que a enzima fica protegida dos possíveis efeitos desnaturantes da solução salina por manter-se "encapsulada" no gel formado pelo polímero devido à afinidade existente entre este e a enzima (MIRANDA e

BERGLUND, 1993). Nestes ensaios (Tabela 4.4), as enzimas α -amilase e lipase não precipitaram e também não apresentaram redução de atividade específica a forças iônicas mais altas quando comparadas com os ensaios de estabilidade (Tabela 4.1), o que permite concluir que o sal volátil carbamato de amônio não tem efeito desnaturante sobre elas mesmo em altos valores de forças iônicas.

A enzima celulase apresentou precipitação apenas para a condição de força iônica de 9,0 molal, na qual as reduções de atividade específica foram de 3% e 15% para as fases sobrenadante e precipitado, respectivamente. No entanto, estudos estatísticos realizados através do teste t de "Student" mostraram que as diferenças não são estatisticamente significativas comparando-se o tratamento nesta força iônica com o tratamento controle. Para a força iônica de 7,0 molal (situação onde não se detectou precipitação) a redução na atividade específica foi de 22%, uma diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento controle. Para o tratamento a 5,0 molal (situação em que também não houve precipitação) não houve desnaturação.

Para a enzima celulase precipitada na presença de solução de HPMC, houve formação da fase precipitado para todas as forças iônicas avaliadas, indicando que a presença deste polímero auxilia na precipitação. A 5,0 molal e 9,0 molal não houve diferença estatística entre os tratamentos com sal e o tratamento controle, evidenciando que a enzima não teve perda de atividade específica nessas forças iônicas para ambas as fases. Entretanto, a 7,0 molal a enzima apresentou redução de atividade de 32% para a fase sobrenadante e 24% para a fase precipitado. Este resultado não era esperado, pois a probabilidade de um sal ter efeito desnaturante numa proteína é geralmente diretamente proporcional à sua força iônica, e neste caso, se não houve desnaturação a 9,0 molal, o previsto é que não houvesse a 7,0 molal.

No entanto, alguns fatores devem ser considerados para esta enzima, pois por se tratar de um complexo enzimático, uma dentre as enzimas pode não ter precipitado na totalidade que devia precipitar para manter a sinergia em relação às demais, sendo assim, limitadora do processo enzimático nesta fase. Consequentemente, as demais enzimas limitam o processo enzimático na fase sobrenadante e a atividade específica do complexo não equivale a atividade sinérgica total. Este possível comportamento Tabela 4.4: Atividades específicas (valor médio ± desvio padrão) para tratamentos de precipitação das enzimas αamilase, celulase, peroxidase e lipase em solução de carbamato de amônio por 60 min a 4 °C. Concentrações iniciais das enzimas: α-amilase, celulases da Sigma e Novozyme, peroxidase e lipase, 16,5 mg/mL; 3,20 mg/mL; 3,50 mg/mL, 15,30 mg/mL e 16,00 mg/mL, respectivamente.

	Atividade específica (U/mg)										
Enzima		Força iônica (molal)									
	Controle (sem sal)	5,0		7,0)	9,0	9,0				
		Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado				
α-Amilase	569,3 ± 86,6 ₂ (100%)	660,9 ± 37,8 ₂ (116%)	ppt⁻¹	658,8 ± 57,4 ₂ (116%)	ppt⁻¹	678,5 ± 46,6 ₂ (119%)	ppt⁻¹				
Celulase ^a	2,16 ± 0,29 ₆ (100%)	2,18 ± 0,11 ₄ (101%)	ppt⁻1	1,70 ± 0,41 ₆ (78%)	ppt⁻¹	2,10 ± 0,39 ₇ (97%)	1,84 ± 0,27 ₅ (85%)				
Celulase com HPMCª	2,22 ± 0,27 ₄ (100%)	2,31 ₂ (104%)	2,14 ± 0,21 ₂ (96%)	1,52 ± 0,46 ₃ (68%)	1,70 ± 0,32 ₃ (76%)	2,19 ± 0,34 ₄ (99%)	2,11 ± 0,55 ₄ (95%)				
Peroxidase	23,70 ± 3,3 ₂ (100%)	_		27,54 ± 2,7 ₂ (116%)	14,30 ± 2,4 ₂ (60%)	20,79 ± 0,5 ₂ (88%)	13,79 ± 1,6 ₂ (58%)				
Lipase	38062 ± 1922 ₂ (100%)	37382 ± 961 ₂ (98%)	ppt ⁻¹	40781± 3845 ₂ (107%)	ppt ⁻¹	40101 ± 2884 ₂ (105%)	ppt ⁻¹				

Subscritos indicam o número de replicatas.

ppt⁻¹: não houve formação de precipitado.

a: Atividade específica da celulase é dada em FPU/mg.

- Não foram realizados experimentos nesta força iônica devido à indisponibilidade desta enzima.

pode levar a conclusões errôneas na análise dos resultados, pois as enzimas podem ter sido individualmente poupadas de qualquer efeito desnaturante e apresentam como resultado a redução da atividade específica do complexo em ambas as fases indicando que não houve manutenção da atividade específica para esta enzima.

Uma outra hipótese é de ter ocorrido a desnaturação de alguma (s) das enzimas do complexo, o que de forma similar à hipótese anterior, limitaria o processo enzimático e, consequentemente, resultaria em perda de atividade específica para ambas as fases. Deve-se também levar em conta que a preservação da estrutura nativa da enzima após a precipitação com o carbamato de amônio depende de fatores limitantes como, por exemplo, o tempo de indução e a cinética de precipitação, ou seja, a decorrência de um maior intervalo de tempo entre a adição do sal e a precipitação pode implicar em uma maior exposição da molécula aos possíveis efeitos desnaturantes do sal à 7,0 molal quando comparado à força iônica de 9,0 molal.

A enzima peroxidase precipitou nas duas condições estudadas. Por questão de indisponibilidade de enzima a precipitação a 5,0 molal não foi avaliada. Para ambas as forças iônicas avaliadas (7,0 e 9,0 molal), houve redução de aproximadamente 40% de atividade específica para a fase precipitado. A fase sobrenadante apresentou redução de atividade específica de 12% a 9,0 molal e aumento de 16% a 7,0 molal. Estes resultados não eram esperados, visto que as enzimas estão teoricamente mais "protegidas" do efeito desnaturante do sal quando estão na fase precipitado.

No entanto, a perda de atividade específica desta enzima nos ensaios de precipitação não significa rigorosamente que houve desnaturação da mesma, uma vez que ela apresenta certos graus de impurezas em suas preparações, conforme verificado através dos perfis protéicos obtidos por eletroforese SDS-PAGE. Para auxiliar na análise dos resultados de precipitação, foram elaborados alguns esquemas deste fenômeno (Figura 4.2) que foram fundamentados na quantidade de bandas diferentes na caracterização da enzima peroxidase por eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.1), o que indica que outros elementos protéicos podem ter precipitado junto com a enzima de interesse, alterando os resultados de atividade específica para ambas as fases. Nas janelas 'a' da Figura 4.2, frações iguais de E (enzima de interesse) e de C



Figura 4.2: Esquema de precipitação de E (enzimas de interesse) e de C (contaminantes) em três proporções diferentes. **A**: com ocorrência de desnaturação de E (esferas sombreadas). **B**: sem ocorrência de desnaturação de E. AER: atividade específica relativa. Subscritos: p = precipitado, s = sobrenadante.

(contaminantes) precipitam e frações iguais de E e de C permanecem no sobrenadante. Assim, a atividade específica de E é menor que a unidade em ambas as fases no esquema **A** e igual à unidade em ambas as fases no esquema **B**, como pode ser visto pelo valor da atividade específica relativa (AER). Nas janelas '**b**', há uma maior precipitação de C e em decorrência disso, a atividade específica de E nessa fase é reduzida e, por conseqüência, sofre um aumento na fase sobrenadante. Se ocorrer desnaturação da enzima de interesse, além da maior redução da atividade específica na fase precipitado, o aumento da atividade na fase sobrenadante pode não ser percebido devido ao valor da atividade específica relativa se aproximar da unidade. Nas janelas '**c**' ocorre o oposto do que ocorre nas janelas '**b**'.

Fazendo-se uma confrontação entre os esquemas da Figura 4.2 e os resultados da Tabela 4.1 para a enzima peroxidase, pode-se estabelecer que possivelmente houve desnaturação da enzima a 9,0 molal e uma precipitação com quantidades proporcionalmente diferentes de enzima de interesse e de contaminantes em ambas as fases (Figura 4.2-**A**-b ou Figura 4.2-**A**-c). A 7,0 molal, a precipitação pode ter ocorrido com desnaturação (Figura 4.2-**A**-b) ou sem desnaturação (Figura 4.2-**B**-b).

Para a lisozima não foram realizados ensaios de precipitação, porém, dados de precipitação desta enzima com sal carbamato de amônio foram levantados por LIMA (2006) e WATANABE (2007). No trabalho de LIMA (2006) as curvas de solubilidade de lisozima em R_{N/C} igual a 2,0 mostraram uma diminuição da concentração de proteína na fase sobrenadante com o aumento da concentração de sal, evidenciando o efeito "salting-out" na precipitação da proteína em diferentes temperaturas, sendo que uma menor eficiência precipitante do sal foi sugerida de 5,0 a 15,0 °C em comparação com os ensaios realizados entre 20,0 e 25,0 °C. Estes autores sugerem que o comportamento da solubilidade em relação à temperatura esteja associado a alguma mudança conformacional da lisozima relacionada às concentrações salinas consideráveis e a possíveis efeitos desnaturantes dos eletrólitos voláteis. WATANABE (2007) também verificou o aumento da solubilidade retrógrada, que por enquanto tem razão desconhecida, porém, sabe-se que em uma solução deste sal os equilíbrios que se estabelecem são complexos e envolvem reações de ionização de amônia e

dióxido de carbono, bem como a reação simultânea destes dois componentes (Equações 2.7-2.10). Ainda no trabalho de WATANABE (2007), a lisozima teve sua atividade enzimática avaliada depois da precipitação com este sal volátil e os resultados mostraram a manutenção da atividade da enzima para as concentrações de sal entre 0,02 e 0,30 g de sal/ g de solução.

Comparando-se os resultados da Tabela 4.4 com os da Tabela 4.1, observa-se que houve maior estabilidade das enzimas celulase e peroxidase em contato com altas concentrações de sal (7,0 e 9,0 molal) em relação às forças iônicas mais baixas (Tabela 4.4), o que não era esperado, devido a altas forças iônicas apresentarem maior efeito desnaturante do que forças iônicas mais baixas, porém a concentração enzimática utilizada para o ensaio de precipitação foi de 10 vezes e de aproximadamente 7 vezes maior que nos ensaios preliminares de determinação de estabilidade enzimática, para a celulase e peroxidase, respectivamente, o que pode ter auxiliado na prevenção da desnaturação das mesmas através do aumento das interações proteína-proteína que poderia "proteger" dos efeitos desnaturantes do sal aminoácidos ou regiões importantes para a atividade catalítica.

É importante levar em consideração que apesar do sal volátil ter efeito desnaturante sobre as enzimas celulase e peroxidase, ele se mostrou eficaz como agente precipitante para estas enzimas. Segundo GÖRGÉNYI *et al.* (2006), apesar dos ânions com carga dupla ter maior efeito salting-out do que ânions monovalentes, o efeito salting-out é mais influenciado pelo cátion do que pelo ânion e os cátions são pouco afetados pelos ânions. Sendo assim, é provável que o cátion amônio tenha promovido a precipitação das enzimas ainda que o ânion carbamato não fosse um bom agente precipitante. Além disso, existe uma pequena quantidade de íons carbonato em solução.

4.6. Balanços de massa e atividade para as enzimas celulase e peroxidase

Os Balanços de massa e atividade das precipitações das enzimas celulase (Tabelas 4.5 e 4.6) e peroxidase (Tabela 4.7) foram feitos considerando-se como

Tabela 4.5: Balanços de massa e de atividade da celulase precipitada com carbamato de amônio a 4,0ºC, na ausência de HPMC. Concentração inicial da enzima: 3,20 mg/mL.

Concentração de sal	Fase Sobrenadante			Fa	se Precipita	Recuperação Total		
(mol/kg)	Atividade (FPU)	Massa (mg)	AE (FPU/mg)	Atividade (FPU)	Massa (mg)	AE (FPU/mg)	Atividade (FPU)	Massa (mg)
0,0	8,82± 1,88 ₆ (100%)	4,15 ± 0,36 ₆ (100%)	2,16 ± 0,29 ₆ (100%)	ppt ⁻¹	ppt ⁻¹	ppt ⁻¹	8,82 ± 1,88 ₆ (100%)	4,15 ± 0,36 ₆ (100%)
5,0	8,93 ± 0,53 ₃ (101%)	4,11 ± 0,37 ₃ (99%)	2,18 ± 0,11 ₄ (101%)	ppt ⁻¹	ppt ⁻¹	ppt ⁻¹	8,93 ± 0,53 ₃ (101%)	4,11 ± 0,37 ₃ (99%)
7,0	7,60 ± 2,08 ₆ (86%)	4,01 ± 0,40 ₇ (97%)	1,70 ± 0,41 ₆ (78%)	ppt ⁻¹	ppt ⁻¹	ppt ⁻¹	7,60 ± 2,08 ₆ (86%)	4,01 ± 0,40 ₇ (97%)
9,0	5,95 ± 1,18 ₇ (68%)	3,01 ± 0,50 ₇ (72%)	2,10 ± 0,39 ₇ (97%)	2,76 ± 1,42 ₅ (31%)	1,52 ± 0,98 ₇ (36%)	1,84 ± 0,27 ₅ (85%)	8,71 ± 1,07 ₅ (99%)	4,54 ± 1,29 ₇ (108%)

Subscritos indicam o número de replicatas. ppt⁻¹: não houve formação de precipitado.

Tabela 4.6: Balanços de massa e de atividade da celulase precipitada com carbamato de amônio a 4,0ºC, com HPMC. Concentração inicial da enzima: 3,20 mg/mL.

Concentração de sal	Fase Sobrenadante			Fa	se Precipita	Recuperação Total		
(mol/kg)	Atividade	Massa	AE	Atividade	Massa	AE	Atividade	Massa
	(FPU)	(mg)	(FPU/mg)	(FPU)	(mg)	(FPU/mg)	(FPU)	(mg)
0,0	6,81 ± 0,96 ₄ (100%)	3,04 ± 0,96 ₄ (100%)	2,22 ± 0,27 ₄ (100%)	ppt⁻ ¹	ppt⁻¹	ppt⁻¹	6,81 ± 0,96 ₄ (100%)	3,04 ± 0,96 ₄ (100%)
5,0	6,72 ₂	2,83 ₂	2,31 ₂	0,71 ₂	0,34 ₂	2,14 ± 0,21 ₂	7,43 ₂	3,16 ₂
	(99%)	(93%)	(104%)	(10%)	(11%)	(96%)	(109%)	(104%)
7,0	3,48 ± 0,93 ₃	2,43 ± 0,19 ₃	1,52 ± 0,46 ₃	2,34 ± 0,61 ₃	1,32 ± 0,50 ₃	1,70 ± 0,32 ₃	5,82 ± 1,91 ₃	3,75 ± 0,39 ₃
	(51%)	(80%)	(68%)	(34%)	(43%)	(76%)	(85%)	(123%)
9,0	3,46 ± 0,53 ₄	1,60 ± 0,50 ₄	2,19 ± 0,34 ₄	4,18 ± 0,67 ₄	2,13 ± 0,98 ₄	2,11 ± 0,55 ₄	7,64 ± 0,56 ₄	3,73 ± 0,39 ₄
	(51%)	(53%)	(99%)	(61%)	(70%)	(95%)	(112%)	(123%)

Subscritos indicam o número de replicatas. ppt⁻¹: não houve formação de precipitado.

Concentração de sal	Fase Sobrenadante			Fase Precipitado			Recuperação Total	
(mol/kg)	AT*	Massa	AE	AT*	Massa	AE	AT*	Massa
	U	(mg)	(U/mg)	U	(mg)	(U/mg)	U	(mg)
0,0	107,60 ₂ (100%)	4,56 ₂ (100%)	23,70 ₂ (100%)	ppt⁻¹	ppt ⁻¹	ppt ⁻¹	107,60 ₂ (100%)	4,56 ₂ (100%)
7,0	110,98 ₂	4,02 ₂	27,54 ₂	19,30 ₂	1,35 ₂	14,30 ₂	130,28 ₂	5,37 ₂
	(103%)	(88%)	(116%)	(18%)	(30%)	(60%)	(121%)	(118%)
9,0	49,60 ₂	2,40 ₂	20,79 ₂	6,30 ₂	0,45 ₂	13,79 ₂	55,91 ₂	2,85 ₂
	(92%)	(105%)	(88%)	(12%)	(20%)	(58%)	(104%)	(125%)

Tabela 4.7: Balanços de massa e de atividade da peroxidase precipitada com carbamato de amônio a 4,0°C. Concentração inicial da enzima: 15,30 mg/mL.

Subscritos indicam o número de replicatas.

ppt⁻¹: não houve formação de precipitado.

*AT: atividade.

valores de referência as massas e atividades totais obtidas por um ensaio controle (feito em 6 replicatas) que constituiu de um ensaio de cromatografia na coluna de dessalinização (usada para dessalinizar precipitados dissolvidos e sobrenadantes dos ensaios de precipitação) de uma solução de enzima. Há perdas de massa de enzima devido ao "corte" do pico dessalinizado. Assim, a passagem de solução enzimática (controle) pela coluna nos deu a referência para se realizar balanços de massa e atividade.

As porcentagens de recuperações de atividade para a celulase após precipitação com sal volátil nas forças iônicas avaliadas são próximas das recuperações de massa tanto na ausência quanto na presença de solução de HPMC, indicando que não houve desnaturação da enzima, com exceção da força iônica de 7,0 molal, onde houve maior recuperação de massa do que de atividade e portanto, perda de atividade específica tanto para o tratamento sem HPMC quanto para ambas as fases do tratamento com HPMC e também nos resultados de recuperação total, o que leva à conclusão de que houve desnaturação da enzima nesta força iônica.

Para a peroxidase, as porcentagens de recuperações de massa e de atividade são diferentes entre si analisando-se as fases sobrenadante e precipitado dos tratamentos salinos individualmente. A 7,0 molal, a recuperação de atividade foi maior que a recuperação de massa na fase sobrenadante, refletindo na atividade específica de 116% (maior que do tratamento controle). Já na fase precipitado desta mesma força iônica, ocorreu o inverso, resultando na perda de 40% de atividade específica. Porém, o resultado de recuperação total de massa e de atividade apresenta valores estatisticamente iguais, ou seja, provavelmente não houve desnaturação da enzima nesta força iônca. Para a força iônica de 9,0 molal houve maior perda de atividade do que de massa em ambas as fases. A recuperação total também mostrou maior recuperação de massa do que de atividade. Assim, a peroxidase provavelmente desnaturou nesta força iônica. Para que se alcançasse a força iônica desejada, a quantidade de enzima adicionada nos tratamentos a 9,0 molal foi equivalente à metade de enzima dos outros tratamentos. Essa redução de concentração enzimática pode ter assistido a intensificação do efeito desnaturante do sal sobre a enzima.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões

A principal conclusão deste trabalho é de que o papel do sal volátil carbamato de amônio na desnaturação em processos de precipitação de proteínas não pode ser explicado por um único mecanismo. Geralmente, sais de caráter cosmotrópico induzem a precipitação de proteínas e as previne de desnaturação, enquanto que, sais caotrópicos têm efeitos desnaturantes e não são bons agentes precipitantes. Porém, no presente trabalho, verificou-se que as enzimas celulase e peroxidase, que mostraram perda de atividade nos ensaios de estabilidade e nos ensaios de precipitação, foram as únicas que precipitaram, diferentemente da α -amilase e lipase que não precipitaram e não desnaturaram. Assim, dependendo da enzima, a precipitação e manutenção da atividade não estão diretamente associadas e o sal pode agir de diferentes formas.

A celulase e peroxidase não tiveram perda de atividade nos ensaios de estabilidade com sais convencionais. Assim, para estas enzimas, o carbamato de amônio teve efeito desnaturante, já que em ensaios similares com este sal, as mesmas apresentaram redução de atividade específica. Indícios de efeitos desnaturantes do carbamato de amônio haviam sido observados por WATANABE *et al.* (2006) para a tripsina suína e por LIMA (2006) para a lisozima e insulina bovina. No presente trabalho, com base na comparação entre os resultados dos ensaios de estabilidade com carbamato de amônio e sais convencionais, tornou-se remota a possibilidade das desnaturações enzimáticas terem ocorrido em virtude dos altos valores de pH,

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

concluindo-se que o sal tem efeitos desnaturantes devido à sua própria natureza, sugerindo-se que a interação entre seu ânion carbamato e resíduos específicos de aminoácidos das enzimas pode levar à desnaturação das mesmas enquanto que o ânion sulfato dos sais convencionais leva à estabilização das enzimas devido à sua natureza cosmotrópica. Para as enzimas α-amilase, lisozima e lipase não houve perda de atividade em soluções deste sal volátil, tanto nos ensaios de estabilidade quanto nos de precipitação. Além disso, este sal não se mostrou eficiente na indução da precipitação destas enzimas nas forças iônicas entre 5,0 e 9,0 molal para as concentrações enzimáticas estudadas.

Uma outra conclusão deste trabalho é que a adição de HPMC induziu a precipitação da celulase a 5,0, 7,0 e 9,0 molal de carbamato de amônio, enquanto que a mesma precipitou somente a 9,0 molal sem a presença deste polímero. Em relação ao uso do HPMC para a manutenção da atividade desta enzima obteve-se êxito para as forças iônicas de 5,0 e 9,0 molal, enquanto que a 7,0 molal a celulase apresentou perda de atividade. Este mesmo comportamento também foi verificado para esta enzima sem a presença de HPMC e ainda não foi elucidado.

Deve-se enfatizar que nos ensaios de precipitação, as reduções de atividade não necessariamente representam desnaturação das enzimas, visto que a peroxidase contém muitas impurezas em solução e que a celulase se trata de um complexo enzimático. Assim, para ajudar a entender o que ocorreu nestes ensaios, são necessárias determinações da estrutura das enzimas através de técnicas como espectroscopia de dicroísmo circular, por exemplo, para investigar se houve ou não alteração destas moléculas por conseqüência do contato das mesmas com o carbamato de amônio nestes ensaios.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Sugere-se a partir dos resultados apresentados nesta dissertação:

a) Dar continuidade aos estudos de atividade biológica de outras enzimas e proteínas com variadas características físico-químicas (diferentes valores de

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

hidrofobicidade, massa molecular, ponto isoelétrico, etc.) em contato com sais voláteis de forma que se possa encontrar características em comum entre as mesmas que ajude na elaboração de uma modelagem sobre o efeito do sal volátil na estabilidade e no "salting-out" de diferentes enzimas.

b) Estudar maneiras de se evitar a desnaturação das enzimas ou de torná-la reversível durante o processo de precipitação com uso de sais voláteis. Para isso, podem ser usadas concentrações mais altas de soluções enzimáticas para potencializar a agregação das enzimas e proteger o microambiente evitando a desnaturação da enzima pelo contato entre as soluções enzimáticas e de sal.

c) Pode-se também otimizar a remoção do sal volátil com enfoque na simplificação do processo e manutenção da atividade enzimática através do uso de colunas de filtração em gel ou adicionando-se aditivos lio e crioprotetores durante a liofilização.

d) Realizar estudos estruturais das enzimas antes e após as precipitações com sais voláteis, como forma de se tentar elucidar os efeitos dos mesmos na estrutura molecular destas enzimas, bem como de outras enzimas ou proteínas precipitadas com sais voláteis. Estes estudos podem ser realizados através da técnica de dicroísmo circular (CD), juntamente a outras técnicas (estudos com fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (DLS), calorimetria diferencial de varredura (DSC), dentre outros).

e) Verificar a atividade específica de enzimas em função do tempo como forma de se determinar se pode ter havido desnaturação reversível com o tempo, o que pode acontecer com algumas enzimas, como por exemplo, a peroxidase.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, A., NAKHURU, K. S., SINGHA, L. I. Carcinogenesis response modulation induced by gelonin encapsulated in liposome. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 315, p. 85-95, 2008.

ARAKAWA, T., TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent-cation salts - Balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, 23 (25), p. 5912-5923, 1984.

ARAKAWA, T., TIMASHEFF, S. N. Theory of protein solubility. *Methods in Enzymology*, 114, p. 49, 1985.

ARUNACHALAM, U., KELLIS, J. T. Folding and stability of endoglucanase III, singledomain cellulose from *Trichoderma reesei*. Biochemistry, 35 (35), p. 11379-11385, 1996.

AVELINO, S., AZZONI, A. R., ROSA, P. T. V., MIRANDA, E. A., SANTANA, C. C. Recovery of cellulase by HPMC-salt precipitation - Analysis by statistical experiment design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79, p. 807-815, 1999.

BASF A. G. Ammonium carbonate – Technical data sheet, Ludwigshafen, 1998.

BASF A. G. Ammonium carbonate – Technical data sheet, Ludwigshafen, 1999.

BASF A. G. Ammonium carbamate – Technical data Sheet, Ludwigshafen, 2002.

BEISSON, F., TISS, A., RIVIÈRE, C., VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *EuroPandan Journal of Lipid Science and Technology, 102 (2),* p. 133-153, 2000.

BELDMAN, G., SEARLEVANLEEUWEN, M., ROMBOUTS, F., VORAGEN, F. G. J. The cellulase of *Trichoderma viride* purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and beta-glucosidases, *EuroPandan Journal of Biochemistry*, 146 (2), p. 301-308, 1985.

BELTER, P. A., CUSSER, E. L. HU, W. S. Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons, New York, 1988.

BERGHEM, L., PETTERSSON, L. G., AXIOFREDRIKSSON, U. Mechanism of enzymatic cellulose degradation - characterization and enzymatic properties of a beta-1,4-glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *EuroPandan Journal of Biochemistry*, 53 (1), p. 55-62, 1975.

BERGLUND, G. I., CARLSSON, G. H., SMITH, A. T., SZOKE, H., HENRIKSEN, A., HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 417 (6887), p. 463-468, 2002.

BERNFELD, P. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, 12, p. 379-428, 1951.

BERNFELD, P. Amylases, α and β. *Methods in Enzymology*, 1, p. 149-158, 1955.

BONNERJEA, J., OH, S., HOARE, M., DUNNIL, P. Protein Purification: The right step at the right time. *Biotechnology*, 4, p. 954-958, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, p. 248-254, 1976.

BROOKS, L. A., AUDRETH, L. F. Ammonium Carbamate. *Inorganic Syntheses*, 2, p. 85-86, 1946.

BULL, H. B., BREESE, K. Protein solubility and the lyotropic series of ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 202, p. 116-120, 1980.

CAO, Y., TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. Carbohydrate Research, 337, p. 1291-1296, 2002.

CASTRO, ALINE MACHADO. *Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (Saccharum sp.)*. Rio de Janeiro: Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006. 217 p. Dissertação (Mestrado em Ciências).

CHANCE, B., MAEHLY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, II, p. 773-775, 1955.

CHAU, Y. P., LU, K. S. Investigation of the blood-ganglion barrier properties in rat sympathetic ganglia by using lanthanum ion and horseradish peroxidase as tracers. *Acta Anatomica*, 153 (2), p. 135-144, 1995.

CHITTOOR, J. M., L., FARIS, J. D., LEACH, J. E., HULBERT, S., LIU, D. J., CHEN, P. D., GILL, B. S. Genomic manning of defense response genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (2), p. 226-233, 1999.

CLAUDEL, B., BROUSSE, E., SHEHADEH, G. Novel thermodynamic and kinetic investigation of ammonium carbamate decomposition into urea and water. *Thermochimica Acta*, 102, p. 357-371, 1986.

CLONIS, Y., PLATIS, D., SOTRIFFER, C. A., LABROU, N. E. Lock-and-key motif as a concept for designing affinity adsorbents for protein purification. *Journal of Chromatography A*, 1128, p. 138-151, 2006.

COHN, E. J. The physical chemistry of the proteins. *Physiological Reviews*, 5, p. 349-428, 1925.

DAUTER, Z., DAUTER, M., BRZOZOWSKI, A. M., CHRISTENSEN, S., BORCHERT, T. V., BEIER, L., WILSON, K. S., DAVIES, G. J. X-ray structure of Novamyl, the fivedomain 'maltogenic' α-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry*, 38, p. 8385-8392, 1999.

DEUTSCHER, M. P. *Methods in Enzimology*, 182, San Diego: Academic Press, p. 285-306, 1990

DILL, K. A. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29 (31), p. 7133-7155, 1990.

DINCER, A., TELEFONCU, A. Improving the stability of cellulose by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan bead. *Journal Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 45 (1-2), p. 10-14, 2007.

DÖGAN, S., TURAN, P., DÖGAN, M., ARSLAN, O., ALKAN, M. Variations of peroxidase activity among *Salvia species*. *Journal of Food Engineering*, 79, p. 375-382, 2007.

DU, W., ZONG, M. H., GUO, Y., LIU, D. H. Lipase-catalysed enantioselective ammonolysis of phenylglycine methyl ester in organic solvent. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38, p. 107-110, 2003.

EDWARDS, T.J., NEWMAN, J., PRAUSNITZ, J. M. Thermodynamics of aqueous solutions containing volatile weak electrolytes. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 21, p. 248-259, 1975.

ENGLARD, S., SEIFTER, S. Precipitation Techniques. *Methods in Enzymology*, 182, p. 285-300, 1990.

FERNANDES, M. L. M., KRIEGER, N., BARON, A. M., ZAMORA, P. P., RAMOS, L. P., MITCHELL, D. A., Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginose* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of molecular catalysis B:* Enzymatic, 30, p. 43-49, 2004.

FILOS, G., TZIALA, T., LAGIOS, G., VYNIOS, D. H. Preparation of cross-linked celluloses and their application for the enzymatic production of glucose from municipal paper wastes. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 36 (2), p. 111-125, 2006.

FONSECA, L. C., CORRÊA, N. C. R., GARROTE-FILHO, M S., CUNHA, C. C., PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. *Química Nova*, 29 (3), P. 543-548, 2006

FREITAS, S. S., SANTOS, J. A. L., PRAZERES, D. M. F. Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA. *Biotechnology Progress*, 22 (4), p.1179 -1186, 2006. GAMERITH, G., GROICHER, R., ZEILINGER, S., HERZO, G. P., KUBICEK, C. P. Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on hemicellulose substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38 (3), p. 315-322, 1992.

GERHARTZ, W. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. ed., v. A2, Germany, p. 261-265, 1985.

GHOSE, T. K. Measurement of celulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, 59; p. 257 -268, 1987.

GÖRGÉNYI, M., DEWULF, J., VAN LANGENHOVE, H., HEBERGER, K. Aqueous salting-out effect of inorganic cations and anions on non-electrolytes. *Chemosphere*, 65 (5), p. 802-810, 2006.

HAGIHARA, H., IGARASHI, K., HAYASHI, Y., ENDO, K., IKAWA-KITAYAMA, K., OZAKI, K., KAWAI, S., ITO, S. Novel alpha-amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (4), p.1744-1750, 2001.

HOFLAND, G. W., DE RIJKE, R., THIERING, R., VAN DER WIELEN, L. A. M., WITKAMP, G. J. Isoeletric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile acid. *Journal of Chromatography B*, 743, p. 357-368, 2000.

HOLLER, E., RUPLEY, J. A., HESS, G. P. Productive and unproductive lysozymechitosaccharide complexes - equilibrium measurements. *Biochemistry*, 14 (5), p. 1088-1094, 1975.

HOLZBAUR, I. E., ENGLISH, A. M., ISMAIL, A. A. Infrared spectra of carbonyl horseradish peroxidase and its substrate complexes: characterization of pH-dependent conformers. *Journal of the American Chemical Society*, 118 (14), p. 3354-3359, 1996.

IGARASHI, K., HATADA, Y., HAGIHARA, H., SAEKI, K. TAKAIWA, M., UEMURA, T., ARA, K., OZAKI, K., KAWAI, S., KOBAYASHI, T., ITO, S. Enzymatic properties of a novel liquefying a-amylase from analkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9), p.3282-3289, 1998.

JAEGER, K. E., EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (4), p. 390-397, 2002.

JANG, H. D., CHEN, K. S. Production and characterization of thermoestable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19 (3), p. 263-268, 2003.

JEFFRIES, T. W., KLUNGNESS, J. H., SYKES, M. S. Comparison of enzyme enhanced with conventional deinking of xerographic and laser printed paper. *Tappi Journal*, 77 (4), p. 173-179, 1994.

JOLLES, P. Lysozymes - a chapter of molecular biology. *Angewete Chemie-International Edition*, 8 (4), p. 227, 1969.

KAMAL, J. K. A., BEHERE, D. V. Kinetic stabilities of soybean and horseradish peroxidases. *Biochemical Engineering Journal*, 38, p. 110-114, 2008.

KARAM, J., NICELL, J. A. Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal* of Chemical Technology and Biotechnology, 69 (2), p. 141-153, 1997.

KAUZMANN, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, 14, p. 1-63, 1959.

KAY, E., SHANNON, L. M., LEW, J. Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots .2. Catalytic Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 242 (10), p. 2470, 1967.

KELLER, K., FRIEDMANN, T., BOXMAN, A. The bioseparation needs for tomorrow. *Trends in Biotechonology*, 19 (11), p. 438-441, 2001.

KENDRICK, B. S.; CARPENTER, J. F., CHANG, B. S. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85 (12), p. 1325-1330,1996.

KING, K. W., VESSAL, M. I. Enzymes of celulase complex. *Advances in Chemistry Series*, 95, p. 7, 1969.

KIRK, O., BORCHERT, T. V., FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology,* v. 13, p. 345-351, 2002.

KREILGAARD, L.; FROKJAER, S.; FLINK, J. M., ET AL. Effects of additives on the stability of *Humicola lanuginosa* lipase during freeze-drying and storage in the dried solid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (3), p. 281-290, 1999.

KUMAR, A., GALAEV, I. Y., MATTIASSON, B. Isolation and separation of alphaamylase inhibitors I-1 and I-2 from seeds of ragi (Indian finger millet, Eleusine coracana) by metal chelate affinity precipitation. *Bioseparation*, 7 (3), p. 129-136, 1998.

KURZ, F. RUMPF, B., MAURER, G. Vapor-liquid-solid equilibria in the system NH₃-CO₂-H₂O from around 310 to 410 K: New experimental data and modeling. *Fluid Phase Equilibrium*, 104, p. 261-275, 1995.

LADISCH, M. R. *Bioseparations Engineering.* New York: Wiley-Interscience, 2001, 753 p.

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

LAWSON, C. L., VAN MONTFORT, R., STROKOPYTOV, B., ROZEBOOM, H. J., KALK, K. H., DE VRIES, G. E., PENNINGA, D., DIJKHUIZEN L., DIJKSTRA, B. W. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *Journal of Molecular Biology*, 236, p. 590-600, 1994.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX M. M. *Lehninger - Principles of biochemistry*. 4.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005.

LI, M. S. Secondary structure, mechanical stability, and location of transition state of proteins. Biophysical Journal, 93, p. 2644-2654, 2007.

LICHTFERS, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. Principes of Biochemistry, New York, Worth Publishers Inc., p. 147-177, 1993.

LIKHOSHERSTOV L.M., NOVIKOVA O. S., SHIBAEV V. N. New efficient synthesis of β -glucosylamines of mono and disaccharides with the use of ammonium carbamate, *Doklady Chemical*, v. 383, p. 89-92, 2002.

LIMA, LEONARDO HENRIQUE FRANÇA. *Precipitação de lisozima e insulinas bovina e suína por "salting-out" com o uso de eletrólitos voláteis*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 88 p. Dissertação (Mestrado).

LITVIC, M., FILIPAN, M., POGORELIC, I., CEPANEC I. Ammonium carbamate; mild, selective and efficient ammonia source for preparation of beta-amino-alpha, beta-unsaturated esters at room temperature. *Green Chemistry*, 7 (11), p. 771-774, 2005.

LOW, D., O'LEARY, R., PUJAR, N. S. Future of antibody purification. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 848, p. 48-63, 2007.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., Pretorius, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (3), p. 506, 2002.

MacGREGOR, E. A., JANECEK, S., SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - protein structure and molecular enzymology*, 1546 (1), p. 1-20, 2001.

MACHADO, M. F., SARAIVA, J. M. Thermal stability and activity regain of horseradish peroxidase in aqueous mixtures of imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnology Letters*, 27, p. 1233-1239, 2005.

MAEHLY, A. C. Plant peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, p. 801-813, 1955.

MARANGA L, RUEDA P, ANTONIS, A. F. G., VELA, C., LANGEVELD, J. P. M., CASAL, J. I., CARRONDO, M. J. T. Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (1), p. 45-50, 2002.

MARTINS, LEONARDO FARIA. *Caracterização do complexo celulásico de Penicillium echinulatum*. Curitiba: Faculdade de Química, Universidade Federal do Paraná, 2005. 121 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica).

MATSUMA, M., SIGNOR, G., MATTHEWS, B. W. Substancial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*, 342, p. 291-293, 1989.

MEDVE, J., STAHLBERG, J., TJERNELD, F. Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase landll from Trichoderma reesei on microcrystalline cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 66 (1), p. 39-56, 1997.

MELANDER, W. R., HORVÁTH, C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183, p. 200-215, 1977.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytica. Chemistry*, 31, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, E. A., BERGLUND, K. A. Evaluation of column flotation in the downstream processing of fermentation products: recovery of a genetically engineered α-amylase. *Biotechnology Progress*, 9, p. 411-420, 1993.

MORETTI, J. J., SELER, S. I., LENHOFF, A. M. Phase equilibria in the lysozymeammonium sulfate-water system. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, p. 498-506, 2000.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamine gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical* Biochemistry, 117, p. 307-310, 1981.

NAJAF, M. F., DEOBAGKAR, D., DEOBAGKAR D. Purification and characterization of an extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*, 41, p. 349-354, 2005.

NAOE, K., MURATA, M., ONO, C., KAWAGOE, M., IMAI, M. Efficacy of guanidium sals in protein recovery from reverse micellar organic media. *Biochemical Engineering Journal*, 10 (2), p. 137-142, 2002.

NASIRI, H., FOROUZANDEH, M., RASAEE, M. J., RAHBARIZADEH, F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 19, p. 229-232, 2005.

NETO, B. B., SCARMINO, I. S., BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.* 2. ed. Editora da Unicamp, Campinas, 401 p., 2002.

NUEVO, M. R., CHU, H., VITELLO, L. B., ERMAN, J. E. Salt-dependent switch in the pathway of electron transfer from cytochrome c to cytochrome c peroxidase compound I. *Journal of American Chemical Society*, 115, p. 5873-5874, 1993.

ORTIZ, V., NIELSEN, S. O. KLEIN, M. L., DISCHER, D. E. Unfolding a linker entre helical rePandats. *Journal of Molecular Biology*, 349, p. 638-647, 2005.

PARK, E. Y., PIZARRO, A. V. L. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*, 38 (7), p. 1077-1082, 2003.

PASTORE, G. M., DA COSTA, V. S. R., KOBLITZ, M. G. B. Production, partial purification and biochemical characterization of a novel *Rhizopus sp.* strain lipase. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 23(2), p. 135-140, 2003.

PAZARLIOGLU, N. K., SARIISIK, M., TELEFONCU, A. Treating denim fabrics with immobilized comercial celulases. *Process Biochemistry*, 40 (2), p. 767-771, 2005.

PELACH, M. A., PASTOR, F. J., PUIG, J., VILASECA F, MUTJE P. Enzymic deinking of old newspapers with celulase. *Process Biochemistry*, 38 (7), p. 1063-1067, 2003.

PESSOA JUNIOR, A., KILIKIAN, B. V. Introdução: Purificação de produtos biotecnológicos. In: Adalberto Pessoa Junior e Beatriz Vahan Kilikian. (Org.). Purificação de Produtos Biotecnológicos. Barueri/SP: Editora Manole Ltda, 2005, v. 1, p. 1-5.

PESSÔA FILHO, P. A. comunicação pessoal, 2006.

PETTERSSON, G., ANDERSON, L. Influence of hydrogen ions on the stability and structure of a celulase from *Penicillium notatum*. *Archives of Biochemistry and Biophysic*, 124 (1-3), p. 497, 1968.

83

PLAXCO, K. W., SIMON, K. T., BAKER, D. Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins. *Journal of Molecular Biology*, 277, p. 985-994, 1998.

PRAUSNITZ, J. M., LICHTENTHALER, R. N., AZEVEDO, E. G. *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*, 3[®] ed., New Jersey, Prentice Hall, 1999.

PRESS, W. H., FLANNERY, B. P., TEUKOLSKY, S. A., VETTERLING, W. T. *Numerical Recipes: the art of scientific computing*, Cambridge University Press, Cambridge, p. 818, 1986.

QUEIROZ, J. A., TOMAZ, C. T., CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, 87, p. 143-159, 2001.

RAO, M. D., RATNAM, B. V. V., RAMESH, D. V., AYYANNA, C. Rapid method for the affinity purification of thermoestável α-amylase from *Bacillus licheniformis. World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, p. 371-375, 2005.

REINIKAINEN, T., DIVNE, C., STAHLBERG, J., RUOHONEN, L., PETTERSSON, G., KNOWLES, J. K., TEERI, T. T., JONES, T. A. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei. Science*, 265 (5171), p. 524-528.

RETAILLEAU, P., DUCRUIX, A., RIÈS-KAUTT, M. Importance of the nature of anions in lysozyme crystallization correlated with protein net charge variation. *Acta Crystallization*, 58, p. 1576-1581, 2002.

ROBINSON, R. E., MOTTLEY, C., MASON, R. P. Free-radical formation in the oxidation of malondialdehyde and acetylacetone by peroxidase enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 289 (1), p. 153-160, 1991.

RUDNEY, J. D., KAJEER, K. C., SMITH, Q. T. Correlations among human salivary levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase and secretory immunoglobulin-a with different stimulatory states and over time. *Archives of Oral Biology*, 30 (11-12), p. 765-771, 1985.

RUMPF, G., WEYRICH, F., MAURER, G. Enthalpy changes upon partial evaporation of aqueous solutions containing ammonia and carbon dioxide. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 37, p. 2983-2995, 1998.

SALOHEIMO, A., NYYSSONEN, E., PENTTILA, M., HARKKI, A., KNOWLES, J. K. C., KERANEN, S. Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei. Bio-Technology*, 11 (5), p. 591-595, 1993.

SARIRI, R. SAJEDI, R. H., JAFARIAN, V. Inhibition of horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors. *Journal of Molecular Liquids*, 123, p. 20-23, 2006.

SCHWIMMER, S., BALLS, A. K. Isolation and properties of crystalline alpha-amylase from germinated barley. *Journal of Biological Chemistry*, 179 (3), p. 1063-1074, 1949.

SCOPES, R. K. *Protein purification*, 2^ª ed., New York, Springer-Verlag New York Inc., 41-71, 1988.

SELBY, K. Purification and properties of C1-component of celulase complex. *Advances in Chemistry Series*, 95, p. 34, 1969.

SHANNON, L. M., KAY, E., LEW, J. Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots .I. Isolation and physical properties. *Journal of Biological Chemistry*, 241 (9), p. 2166, 1966.

SHIH, J. H. C., SHANNON, L. M., KAY, E. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots .4. Structural Relationships. *Journal of Biological Chemistry*, 246 (14), p. 4546, 1971.

SHUGAR, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta,* 8, p. 302-309, 1952.

SILVA, R. B. V., FERREIRA, D. F. Alternatives for evaluating t test with heterogeneous variances by Monte Carlo simulation. Ciências agrotecnológicas, Lavras, 27 (1), p.185-191, 2003.

SIGMA Aldrich, α-Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* – *Product information sheet*, Saint Louis, Missouri, 2006.

SIGMA Aldrich, α-Amylase from *Bacillus sp – Product information sheet*, Saint Louis, Missouri, 2003.

SIGMA Aldrich, α-Amylase from *Bacillus subtilis* – *Product information sheet*, Saint Louis, Missouri, 2003.

SIGMA Aldrich, Chicken egg white lysozyme – *Product information sheet*, Saint Louis, Missouri, 1996.

SIGMA Aldrich, Peroxidase from horseradish – *Product information sheet*, Saint Louis, Missouri, 2000.

SIRINIVAS, R., PANDA, T. pH and thermal stability studies of carboxymethyl cellulose from intergeneric fusants of *Trichoderma reesei Saccharomyces cerevisae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21 (4-5), p. 178-183, 1998.

SMELLER, L., FIDY, J., HEREMANS, K. Protein folding, unfolding and aggregation. Pressure induced intermediate states on the refolding pathway of horseradish peroxidase. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16, p. S1053–S1058, 2004.

SOARES, C. M. F., DE CASTRO, H. F., DE MORAES, F. F., ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79, p. 745-757, 1999.

SONI, P., KANSAL, H., BANERJEE, U. C. Purification and characterization of an enantioselective carbonyl reductase from *Candida viswanathii* MTCC 5158. *Process Biochemistry*, 42, p.1632-1640, 2007.

SU, C. K., CHIANG, B. H. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*, 41 (2), p. 257-263, 2006.

SUMNER, J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biological Chemistry*, 47 (5), p. 287-290, 1921.

TAKANO, K., TSUCHIMORI, K., YAMAGATA, Y., YUTANI, K. Contribution of sal bridges near the surface of a protein to the conformational stability. *Biochemistry*, 39 (40), p.12375-12381, 2000.

TEERI, T. T., KOIVULA, A., REINIKAINEN, T., RUOHONEN, L., SRISODSUK, M., DIVNE, C., ROUVINEN, J., SZARDENINGS, M., JONES, T. A. Hydrolysis of crystalline cellulose by native and engineered *Trichoderma reesei* cellulase. *Abstracts of papers of the American Chemical Society*, p. 207 (21- Part 1), 1994.

TEERI, T., JONES, A., KRAULIS, P., ROUVINEN, J., PENTILLÄ, M., HARKKI, A.,NEVALAINEN, H., VANHANEM, S., SALOHEIMO, M. E KNOWLES, J. *Trichoderma reesei 7*3 *Cellulases: Biochemistry, Genetics, Physiology and Aplications*, Ed. Kubicek *et. al.*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 10, p. 156-167, 1990.

TOMASULA, P. M., CRAIG JR., J. C., BOSWELL, T. T., COOK, R. D., KURANTZ, M. J., MAXWELL, M. Preparation of casein using carbon dioxide. *Journal of Dairy Science*, 78, p. 506-514, 1995.

UUSITALO, J. M., NEVALAINEN, K. M. H., HARKKI, A. M. Enzyme-production by recombinant *Trichoderma reesei* strain. *Journal of Biotechnology*, 17 (1), p. 35-49, 1991

VAN BERLO, M., OTTENS, M., LUYBEN, K. C. A. M., VAN DER WOOLEN, L. A.M. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems with recyclable volatile sals. *Journal of Chromatography B*, 743, p. 317-325, 2000.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65 (3), p. 249-259, 2004

VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W. *Fundamentos da Bioquímica*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002, 931 p.

VOGEL, A. I., JEFFERY, G. H. *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis.* Harlow: Longman Science & Technology, 1989, 877 p.

WANNERBERGER, K., WELIN-KLINTSTRÖM, S., ARNEBRANT, T. Activity and adsorption of lipase from *Humicola lanuginosa* on surfaces with different wettabilities. *Langmuir*, 13, p. 784-790, 1997.

WATANABE, ÉRIKA OHTA. *Equilíbrio de fases na precipitação de lisozima e albumina de soro bovino com o uso de sais*. São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 174 p. Tese (Doutorado).

WATANABE, E. O., PESSÔA FILHO, P. A., MIRANDA, E. A., MOHAMED, R. S. Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: precipitation of porcine trypsin. *Biochemical Engineering Journal,* 30 (2), p. 124-129, 2006.

WELKER, N. E., CAMPBELL, L. L. Comparison of the alpha-amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 94, p. 1131-1135, 1967.

WEST, D. K., BROCKWELL, D. J. OLMSTED, P. D. RADFORD, S. E., PACI, E. Mechanical resistance of proteins explained using simple molecular models. *Biophysical Journal*, 90, p. 287-297, 2006.

WHITAKER, J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences, Marcel Dekker, New York, p. 8, 1972.

YAN, R., ZHAOA, F., LI, J., XIAO, F. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase in gelatin-hydrophobic ionic liquid gel films. *Electrochimica Acta*, 52, p. 7425-7431, 2007.

ZANDONÁ FILHO, A. *Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas*. Curitiba: Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2001. 193 p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos).

APÊNDICE 1

Neste Apêndice 1 têm-se os resultados dos ensaios preliminares, que consistiram na obtenção da curva padrão do método de dosagem de proteína por BRADFORD (1976) e a obtenção de coeficientes de absorção para a determinação das concentrações de proteínas por absorbância a 280 nm, além das curvas padrão necessárias para as determinações de atividade das enzimas. Estes ensaios foram realizados no mínimo em duplicata, sendo que para as curvas de absorção das enzimas celulase e lípase e para a curva padrão de açúcar para a celulase os pontos foram obtidos em quadruplicata.

A1.1. Determinação da concentração de proteína

A1.1.1. Método de Bradford

Para a determinação da concentração de proteína através do método de BRADFORD (1976) incubou-se 100 µL de amostra com 1000 µL de reagente de BRADFORD, a base do corante Coomassie blue BG-250 (Figura A1.1) por 5 min a temperatura ambiente. Após o tempo reacional, a absorbância da mistura foi determinada a 595 nm e correlacionada com uma curva padrão obtida utilizando-se albumina de soro bovino como padrão que correlaciona valores de absorbância ao conteúdo protéico total (Figura A1.2). Este método é baseado em uma mudança do comprimento de onda de máxima absorção de cor (de 465 para 595 nm) decorrente da interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas.


Figura A1.1: Estrutura do corante Coomassie blue BG-250 (CASTRO, 2006).



Figura A1.2: Curva padrão para dosagem de proteínas segundo BRADFORD (1976) usando solução de BSA em água como referência.

A1.1.2. Método de A280 nm

Para a determinação da concentração de proteína através da medida de absorbância a 280 nm foram previamente obtidas as curvas padrão para a determinação dos coeficientes de absorção específico para as enzimas estudadas (Figuras A1.3 - A1.7) que correlaciona a concentração de cada enzima com os valores de absorbância a 280 nm. Embora os ensaios de atividade, estabilidade e precipitação posteriores tenham sido realizados em diferentes temperaturas, as medidas da concentração bem como as curvas padrão para a determinação dos coeficientes de absorção das enzimas foram realizadas a 25,0°C.



Figura A1.3: Curva de absorção a 280 nm de solução de α -amilase em tampão fosfato de sódio 20,0 mmol/L com 6,7 mmol/L de cloreto de sódio pH 6,90.







Figura A1.5: Curva de absorção a 280 nm da solução de celulase em tampão citrato 50 mmol/L pH 4,80.



Figura A1.6: Curva de absorção a 280 nm da solução de peroxidase em tampão fosfato de potássio 100 mmol/L pH 6,0.



Figura A1.7: Curva de absorção a 280 nm da solução de lipase em tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0.

A1.2. Curvas padrão para determinação de açúcar e de ácido oléico

Para a determinação da concentração de açúcares liberados durante as reações de hidrólise pelas enzimas α -amilase e celulase, foram obtidas curvas padrão que relacionam a concentração de açúcar com a absorbância a 540 nm. A diferença entre o coeficiente angular dessas curvas (Figuras A1.8 e A1.9) deve-se ao uso de reagentes DNS formulados a partir de diferentes métodos: SUMNER (1921) e MILLER (1959), respectivamente.

Para a determinação da concentração de ácido oléico liberado pela lipase foi obtida uma curva padrão que relaciona o volume de solução de KOH 50 mmol/L necessário para neutralizar o ácido oléico produzido no ensaio (Figura A1.10).



Figura A1.8: Curva padrão de açúcar redutor em termos de glicose para ensaios de atividade de α -amilase, conforme método de SUMNER (1921)



Figura A1.9: Curva padrão de açúcar redutor em termos de glicose para ensaios de atividade de celulase, conforme método de MILLER (1959).



Figura A1.10: Curva padrão de concentração de ácido oléico relacionada com o volume de solução de KOH 50 mmol/L necessária para sua neutralização.

Verificação da influência dos sais carbamato de amônio e sulfato de amônio na determinação da concentração de α -amilase

Neste apêndice 2 têm-se os resultados dos ensaios preliminares de verificação da influência do sal volátil carbamato de amônio e do sal convencional sulfato de amônio na determinação da concentração de α-amilase através de medidas de absorbância a 280 nm.

Foram feitas análises dos efeitos dos sais sulfato de amônio e carbamato de amônio nas medidas de absorbância a 280 nm para determinação da concentração da enzima α-amilase, de forma que se pudesse corrigir os valores de absorbância encontrados para as soluções a diferentes concentrações de sal volátil, utilizando-se sempre como "branco" a solução na qual as amostras protéicas se encontravam originalmente em solução (tampão fosfato de sódio 20,0 mmol/L com 6,7 mmol/L de cloreto de sódio pH 6,90). Embora seja bem documentado que sais só apresentam influência no coeficiente de absorção de proteínas a concentrações extremas, usualmente acima de 30%, optou-se por realizar tais estudos devido ao fato do sal volátil ser um agente de "salting-out" e, portanto, passível de interagir ou mesmo modificar a estrutura tridimensional de proteínas, o que poderia acarretar em uma modificação do coeficiente de absorção. Para o sulfato de amônio, pode-se observar uma grande influência deste sal nas medidas de absorbância para concentrações salinas acima de 2,0 molal (Figura A2.1). A partir destes resultados, decidiu-se realizar um estudo mais detalhado desta influência, varrendo-se as concentrações de sal entre 0,0 e 2,0 molal para diferentes concentrações da enzima. Para cada concentração de sal foi obtida uma equação de reta da concentração de enzima em função da absorbância (Tabela A2.1). Através destes dados, pode-se traçar uma linha de tendência para a variação do coeficiente de absorção linear a 280 nm com a



Figura A2.1: Curva de absorbância a 280 nm em função da concentração de sal sulfato de amônio. Concentração de α -amilase = 0,04 mg/mL.

Concentração de sal (mol/L)	a (cm²⋅mg⁻¹)	R ²
0,00	6,1125	1,0000
0,25	6,1312	0,9999
0,50	6,2383	0,9998
0,75	6,3171	0,9999
1,00	6,2893	0,9998
1,25	6,3251	0,9998
1,50	6,3938	0,9997
1,75	6,4893	0,9994
2,00	6,6050	0,9994

Tabela A2.1: Efeito do sal sulfato de amônio nos parâmetros das curvas padrão de α -amilase.

a – coeficiente angular da reta que relaciona a concentração de enzima com a absorbância a
280 nm.

concentração de sal válida para concentrações de sulfato de amônio de 0,0 a 2,0 molal e para três diferentes concentrações de enzima na faixa entre 0,04 a 0,33 mg/mL. Este conjunto de dados aponta para um comportamento quase linear do coeficiente de absorção em relação à concentração molar de sulfato de amônio (Figura A2.2).



Figura A2.2: Influência da concentração de sulfato de amônio no coeficiente de absorção a 280 nm para soluções de α-amilase de concentração 0,04 mg/mL em tampão fosfato de sódio a pH 6,9..

Após o estudo da influência do sal convencional sulfato de amônio sobre a determinação da concentração enzimática, também foi feita a mesma análise para o sal volátil carbamato de amônio entre as concentrações de 0,0 a 7,0 molal para a concentração enzimática de α -amilase de 0,04 mg/mL. Pode-se observar na Figura A2.3 uma grande influência deste sal nas medidas de absorbância a 280 nm para a enzima α -amilase para todas as concentrações de sal estudadas, sendo que, para o gráfico **a**, o aumento de absorbância se deu mais significativamente para concentrações acima de 2,0 molal tendo seu valor máximo na concentração de 6,0 molal, que corresponde a um aumento de cerca de 60% no valor da absorbância. Assim, optou-se





Figura A2.3: Absorbância a 280 nm de soluções de α-amilase 0,04 mg de proteína/mL em função da concentração de carbamato de amônio.

por analisar a influência de concentrações menores deste sal na absorbância devido à possibilidade de diluição das amostras (durante os ensaios) antes das mesmas terem suas absorbâncias medidas. Porém, de forma similar, os valores de absorbância são bastante elevados para concentrações de sal até 2,0 molal e 0,25 molal chegando a valores até 35% e 25% maiores que o valor sem sal, respectivamente (gráficos **b** e **c**).

Portanto, devido à grande influência deste sal na determinação da concentração de α-amilase por medidas de absorbância, optou-se por fazer a remoção do sal através de liofilização para o caso do sal volátil e com uso de colunas de filtração em gel para os experimentos com sais convencionais e alguns experimentos com sal volátil.

Determinação das faixas de variáveis-respostas na determinação de atividades enzimáticas

A determinação dos valores das variáveis respostas que limitam a faixa confiável na qual a atividade específica apresenta valores constantes foi feita para cada uma das enzimas estudadas. Estas variáveis respostas foram as determinações de: valores de absorbância relacionadas com a formação de produto, as taxas de consumo de substrato ou formação de produto ou o volume de reagente necessário para neutralizar um produto formado por uma enzima específica.

A3.1. α-Amilase

Para a obtenção da variável resposta 'absorbância a 540 nm' que está relacionada com a quantidade de açúcar produzida pela enzima através da curva padrão de DNS, determinou-se a atividade específica da α -amilase (U/mg) que, independente da concentração da proteína, deve possuir valor constante. Os ensaios foram realizados em duplicata com alguns pontos em quadruplicata. A estimativa do erro experimental médio foi de 57,3 calculado conforme Equação A4.5 do Apêndice 4. Através da análise da curva de atividade em função da diluição de solução protéica de concentração 4,0 mg/mL (Figura A3.1) observou-se que a atividade específica da α -amilase se torna praticamente constante a 781,1 U/mg (média de 2 ensaios realizados em duplicata e em dias diferentes), com um desvio padrão de 7,7%, na faixa de diluição entre 3000 e 6000, correspondentes à absorbância a 540nm de 0,27 e 0,10, respectivamente. Desta maneira, a concentração de α -amilase escolhida para os ensaios de atividade deste trabalho foi de 0,01 mg/mL, correspondente à diluição de 4000 vezes da solução estoque.



Figura A3.1: Atividade específica da α -amilase em tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 6,9 a 20 °C em função da diluição da solução estoque de 4,00 mg de proteína/mL.

A3.2. Lisozima

Para a lisozima, determinou-se como variável resposta a 'variação da absorbância a 450 nm em 5 min' para diferentes valores de concentração da enzima. Esta variável resposta reflete a taxa de reação de degradação do substrato *Micrococcus lysodeitikus* cujo valor é usado para o cálculo de atividade específica da lisozima (U/mg) a partir da Equação 3.2. Os ensaios foram realizados em duplicata e a estimativa do erro experimental médio foi de 835 calculado conforme Equação A4.5 do Apêndice 4. Os valores de atividade específica se tornam praticamente constantes (Figura A3.2) a partir de aproximadamente 20000 U/mg (média de 2 ensaios realizados em duplicata e em dias diferentes), para a faixa de inclinação que vai de 0,02 a 0,16 unidades de adsorção a 450 nm por minuto, correspondente à concentração de enzima entre 0,02 a 0,08 mg/mL. Desta maneira, a concentração de lisozima escolhida para os ensaios de atividade deste trabalho, foi de 0,05 mg/mL.



Figura A3.2: Determinação da variável resposta taxa de consumo de substrato dada em termos de ($\Delta A_{450}/\Delta t$) e sua relação com a atividade específica da lisozima em tampão fosfato de potássio 60 mmol/L pH 6,24 a 25 °C.

A3.3. Celulase

Para a celulase, a variável resposta utilizada foi a 'absorbância a 540 nm' que está relacionada com a quantidade de açúcar formado a partir da hidrólise da celulose. Conforme o método de GHOSE (1987), a atividade da enzima (em unidade FPU/mL) é o valor da concentração de celulase que libera 2 mg de glicose através do consumo da celulose, dividida pela constante 0,37, determinada com base no Sistema Internacional de Medidas (S.I.). Para a determinação da concentração de celulase responsável pela produção dessa quantidade de açúcar redutor, construiu-se um gráfico de concentração de glicose liberada em função do logaritmo da concentração de enzima (Figura A3.3). Devido à dificuldade de determinação de um único valor para a concentração de celulase que libera exatamente 2,0 mg de glicose por 0,5 mL de enzima, determina-se no mínimo, dois valores de concentração enzimática correspondentes a formação de um valor acima e outro valor abaixo da concentração de glicose de 2,0 mg/ 0,5 mL.

Na Figura A3.3 têm-se seis pontos, cada um correspondente a uma concentração diferente de celulase, dos quais um deles está acima e cinco estão abaixo da concentração de glicose a ser alcançada para realização dos cálculos. Os ensaios foram realizados em duplicata e a estimativa do erro experimental médio foi de 0,14 calculado conforme Equação A4.5 do Apêndice 4. Através da Equação 3.3, determinou-se a concentração de enzima de 0,0047 mg/mL, correspondente a liberação de 2,0 mg/ 0,5 mL que corresponde à atividade de 78,61 FPU/mL. Essa concentração de enzima corresponde ao fator de diluição próximo de 200 vezes (média de 2 ensaios realizados em duplicata e em dias diferentes). Através dessa informação, pode-se padronizar o ensaio de atividade da celulase, fazendo-se as diluições de 150 e 300 vezes da solução enzimática estoque para determinação da reta utilizada para o cálculo de atividade. Para as diluições de 150 e 300, o valor da variável-resposta absorbância a 540 nm deve estar entre 0,3 e 0,6.



Concentração de glicose (mg/0,5 mL)

Figura A3.3: Relação entre a concentração de glicose liberada pela celulase e a concentração protéica da preparação de celulase utilizada no ensaio.

A3.4. Peroxidase

A variável resposta utilizada para a peroxidase foi a diferença entre os valores de 'absorbâncias a 420 nm' medidas entre o tempo inicial e após 20 s de reação. As diferenças entre esses valores encontrou-se na faixa entre 0,05 e 0,20 (Figura A3.4). Conforme proposto por CHANCE e MAEHLY (1955), essa faixa deve encontrar-se no intervalo entre 0,16 e 0,28. A inclinação de aproximadamente 0,20 era equivalente às concentrações de enzima de 0,020 e 0,028 mg/mL. Nesse trabalho, deu-se preferência em utilizar-se a concentração de 0,020 mg/mL, que está no intervalo entre 0,005 e 0,030 mg/mL, no qual a atividade específica se mantém relativamente constante. Nos ensaios de atividade realizados, o valor de atividade calculado para a concentração de enzima de 0,020 mg/mL foi em média 24,11 U/mg. Os ensaios foram realizados em duplicata com alguns pontos em quadruplicata. A estimativa do erro experimental médio foi de 2,0 calculado conforme Equação A4.5 do Apêndice 4.



Figura A3.4: Atividade específica da enzima peroxidase em função da diferença de absorbância (ΔA_{420} nm) entre o tempo inicial e o tempo de 20 s.

A3.5. Lipase

Para a lipase, a variável resposta utilizada no ensaio de atividade da enzima foi o 'volume de KOH 50 mmol/L' necessário para neutralização do ácido oléico que é produto da reação enzimática catalisada pela mesma. Para isto, procedeu-se à determinação dos volumes de solução de KOH utilizados para titular o meio reacional em função da concentração enzimática. A seguir, calculou-se a atividade enzimática para estes valores de concentração de enzima (Figura A3.5). A atividade específica da lipase se torna relativamente constante a aproximamente 56622,0 U/mg na faixa de diluição entre 4.000 e 10.000 (média de 2 ensaios realizados em duplicata e em dias diferentes), com um desvio padrão de aproximadamente 4,0% e a estimativa do erro experimental médio de 4795 foi calculado conforme Equação A4.5 do Apêndice 4.. Estas diluições correspondem às concentrações enzimáticas de 0,0048 e 0,0019 mg/mL e aos volumes de solução de KOH de 11,35 e 8,15mL, respectivamente. Desta maneira, a concentração de lipase escolhida para os ensaios de atividade deste trabalho foi de 0,0038 mg/mL, correspondente à diluição de 5000.



Figura A3.5: Determinação da atividade específica da lipase em tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0 a 37 °C em função da diluição da solução estoque de 19,00 mg de proteína/mL.

Neste apêndice 4 faz-se uma breve explanação sobre o teste estatístico utilizado na análise dos resultados e sobre a estimativa do erro experimental médio.

Teste-t de Student para comparação entre amostras

O teste-t de Student é um recurso estatístico cujo propósito é verificar a diferença ou igualdade entre duas médias de dois conjuntos de resultados, supondo normalidade das observações. Este teste é usado para amostras pequenas e o número 30 é freqüentemente usado com limitador de tamanho da amostra (VOGEL, 1989).

Para a aplicação desse teste, verifica-se se as variâncias dos dois grupos podem ser iguais ou diferentes, havendo alternativas de teste para as duas situações (Figura A4.1).



Figura A4.1: Algoritmo de realização do teste estatístico. z: teste de distribuição normal t: teste t de Student.

Nesse trabalho, comparamos as médias de duas distribuições normais, supondo que se trata de populações com médias possivelmente diferentes (amostras de proteínas sem e com sal em sua composição). Há interesse em verificar se o contato com o sal contribuiu para a desnaturação da proteína, ou seja, se a média de atividade depois do tratamento é menor do que a média de atividade antes do tratamento. Para isso, as variáveis diretamente relacionadas à estabilidade foram comparadas pelo testet independente, que é muito valioso quando a diferença sistemática entre duas amostras é causada por um único fator (NETO *et al.*, 2002). Para esse caso, existe uma pressuposição básica para garantir que o teste de t seja exato. Essa pressuposição refere-se à homocedasticia das variâncias populacionais, ou seja, $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$ (SILVA e FERREIRA, 2003). Para isso, aplica-se o teste *F* (Teste de Hartley) antes de usar o teste t (VOGEL, 1989). O valor de F é dado por:

$$F = \frac{s \ máx^2}{s \ m(n^2)}$$
(A4.1)

em que s é o desvio padrão.

Se o valor de *F* calculado for menor que o valor tabelado, as variâncias populacionais são iguais. Após essa etapa, estima-se o desvio padrão agrupado, que é determinado pelos desvios padrões das duas amostras pela expressão:

$$sp = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot {s_1}^2 + (n_2 - 1) \cdot {s_2}^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$
(A4.2)

em que n_1 e n_2 são as quantidades analisadas de cada amostra e s_1 e s_2 são os desvios padrões das duas amostras, estimados por:

$$\boldsymbol{s}_{i} = \sqrt{\frac{1}{n_{j} - 1} \cdot \sum_{j} (\boldsymbol{y}_{j} - \boldsymbol{\overline{y}})^{2}}$$
(A4.3)

em que n_j é o número de repetições realizadas, y_j o valor medido da amostra j e \overline{y} a média amostral dos n_j valores.

Em seguida, o valor de t é determinado pela fórmula:

$$t = \frac{\overline{x_1 - \overline{x}_2}}{sp \cdot \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$
(A4.4)

em que \overline{x}_1 e \overline{x}_2 são as médias amostrais.

O valor de t encontrado é relacionado a um conjunto de tabelas de valores nas quais se expressa a probabilidade do valor estar dentro de certos limites em função dos graus de liberdade e do nível de significância definido por p < 0,05 para um intervalo de confiança de 95%. A diferença é estatisticamente significativa quando o valor de t calculado está acima do valor de t crítico tabelado (PRESS *et al*, 1986).

Para o cálculo do erro experimental médio de cada série de experimentos foi utilizada a Equação (A4.5) que combina a variância de cada uma das repetições para gerar uma estimativa com um número maior de graus de liberdade (NETO *et al*, 2002). Para uma repetição de *n* vezes, o número de graus de liberdade da variância era v = n-1 e a estimativa do erro experimental foi dada por:

$$\boldsymbol{s} = \sqrt{\frac{\sum_{i} \boldsymbol{v}_{i} \cdot \boldsymbol{s}_{i}^{2}}{\sum_{i} \boldsymbol{v}_{i}}}$$
(A4.5)