

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos e Informática

OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE TRIPSINA EM SISTEMA DE MICELAS
REVERSAS ATRAVÉS DE ANÁLISE POR SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Douglas Alves Cassiano

Orientador: Elias Basile Tambourgi

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

Fevereiro de 1999

8015166



UNICAMP	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	C2730
V.	Es.
TOMBO BC/	38310
PRIMO.	229/99
	☐ ☐ ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/08/99
N.º OPD	

CM-00125691-0

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

C2730

Cassiano, Douglas Alves

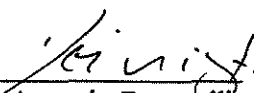
Otimização da separação de tripsina em sistema de micelas reversas através de análise por superfície de resposta. / Douglas Alves Cassiano.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Elias Basile Tambourgi

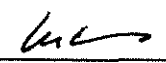
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Micelas. 2. Enzimas – Purificação. 3. Tripsina. 4. Separação (Tecnologia). 5. Superfícies de respostas (Estatística). 6. Massa – Transferência. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Mestrado , defendida por Douglas Alves Cassiano , em 20 de abril de 1999 e aprovada pela comissão julgadora composta pelos Profs Drs :



Leinig Antonio Perazoli
IQ-UNESP- Araraquara



Roger Josef Zemp
DESQ-FEQ-UNICAMP



Elias Basile Tambourgi
DESQ-FEQ-UNICAMP-orientador

Esta versão corresponde a redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pelo Eng. Douglas Alves Cassiano e aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de abril de 1999.



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
Orientador

Dedico aos amigos que me acompanharam durante este período; pelo companheirismo, pelas experiências trocadas e por tudo que aprendemos juntos

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo patrocínio financeiro à pesquisa brasileira; sem o qual este projeto não se concretizaria.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, pela oportunidade de trabalho, pela orientação, dedicação e principalmente pela amizade.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos e Informática da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, em particular ao Profs. Drs. João Alexandre F. Pereira, Roger Josef Zemp e Ana Maria Fratini Filetti.

Ao Prof. Dr. José Luís de Lima Filho do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, pelo apoio e boa vontade em disponibilizar os recursos e infraestrutura do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA - para execução deste trabalho.

Um agradecimento especial à Prof^a Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, pelo suporte que tornou viável grande parte deste projeto; pelo exemplo de dedicação e esforço, e pela amizade.

Aos professores e amigos do Departamento de Engenharia Química da FEI, em particular os Profs. Luiz Carlos Bertevello, Milton Caetano Ferreroni e Antônio Caramico pela amizade, apoio e incentivo.

A Ana Paula Brescancini Rabelo, pela amizade e pela parceria na execução deste projeto.

Aos professores, funcionários e alunos do LIKA, em especial à Keila, Cosme, Pedro, Francisca, Katarina, Mana, Carminha e Taciana pelo companheirismo, pelas discussões e pelo auxílio nas extensivas horas de trabalho.

Aos amigos da Unicamp e da FEI; Fábio, Andréa, Pedro, Sandra, Arcay, Sampei, Paulica, Frede, Marcone, César, Cláudio, Rubinho, Alon, Diego, Brô, Hosi, Jorge, Jesus, Rosana, Alerrandra, Kika, Fabiana, Fernandinha, Om, Chang, Dechechi, Urso e tantos outros por todo companheirismo e apoio durante a execução deste trabalho.

Ao amigo Cássio Martins da Cytec Brasil, pela amizade e por todo suporte técnico fornecido na área de tensoativos.

À amiga Soraia Teixeira da USP, pelo amizade e auxílio técnico.

Em especial à minha esposa e companheira Carla, por todo carinho, dedicação e paciência em todos os momentos que teve que dividir não somente o meu tempo como também o dela na execução deste projeto.

Índice

ÍNDICE

	Página
Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas	III
Glossário	IV
Resumo	VI
Abstract	VII
Palavras Chave/Keywords	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Tripsina	4
2.2 Micelas	5
2.3 Partição de proteínas em sistemas micelares	9
2.4 Influência dos parâmetros do sistema	10
2.4.1 Surfatante	10
2.4.2 Solvente orgânico	13
2.4.3 Sal	14
2.4.4 pH	15
2.5 Extração	16
2.6 Re-extração	17
2.7 Métodos estatísticos	18
2.7.1 Planejamento fatorial	18
2.7.2 Análise por superfície de resposta	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Definição das variáveis	22
3.2 Descrição dos experimentos	25

3.3 Planejamento fatorial para triagem das variáveis	26
3.4 Ensaios para determinação da superfície de resposta	30
3.5 Métodos analíticos	32
3.5.1 Análise da proteína total	33
3.5.2 Análise da atividade proteásica	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1 Triagem de variáveis	35
4.2 Evolução operacional da condição mais favorável	39
4.3 Investigação da superfície de resposta	41
4.3.1 Análise da superfície de resposta para o sistema	42
5. CONCLUSÕES	47
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
8. ANEXOS	59
ANEXO A: Absorbância <i>versus</i> concentração de proteína	59
ANEXO B: Absorbância <i>versus</i> atividade	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 - Diagrama ternário AOT/Isooctano/Água	6
Figura 4.1 - Superfície de resposta para região ótima do sistema	45
Figura 4.2 - Concentração de proteína na re-extração x F1 x F2	46

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1 - Lista de variáveis no processo de transferência de massa do sistema micelar	23
Tabela 3.2 - Tampão fosfato	24
Tabela 3.3 - Codificação das variáveis para algoritmo de triagem	26
Tabela 3.4 - Codificação das variáveis estudadas	27 e 28
Tabela 4.1 - Leitura da absorbância <i>versus</i> concentração de proteína	35
Tabela 4.2 - Atividade (relativa) <i>versus</i> concentração de enzima	35
Tabela 4.3 - Planejamento das variáveis da partição de tripsina no sistema micelar em dois níveis	36 e 37
Tabela 4.4 - Efeitos principais e de interação das variáveis	38
Tabela 4.5 - Investigação do ponto central do planejamento de triagem	40
Tabela 4.6 - Experimentos EVOP	40
Tabela 4.7 - Efeitos principais e secundários das variáveis EVOP	41
Tabela 4.8 - Codificação das variáveis do planejamento estrela	41
Tabela 4.9 - Matriz do planejamento estrela	43

GLOSSÁRIO

AOT - nome comercial do surfatante di-octil sulfosuccinato de sódio
CMC - concentração micelar crítica
 W_o - parâmetro água em óleo ("water-in-oil")
 r - raio micelar médio
 N_{ag} - número de agregação molecular de surfatante na micela
CM - concentração molar de micelas
RNM - ressonância magnética nuclear
Log P - logaritmo do coeficiente de partição
SI - salting in
SO - salting out
Fa_q - fase aquosa
Fo_{rg} - fase orgânica
F₁ - razão entre fases na extração
F₂ - razão entre fases na re-extração
T - tempo de contato entre fases na agitação por vórtex
 X - matriz de contraste para triagem
 X^t - matriz de contraste para triagem transposta
 y - vetor resposta de transferência de proteína para triagem
 e - vetor resultado dos efeitos
 d - vetor módulo da diferença dos ensaios
 d^t - transposto do vetor módulo de diferença dos ensaios
 s^2 - erro experimental da triagem
 $V_{(efeito)}$ - variância do efeito
BCA - ácido bicinconínico
EVOP - operações evolucionárias para determinação de um ponto ótimo
 X - matriz de contraste para superfície de resposta
 x_n - variáveis codificadas na superfície de resposta

s^2 - erro padrão das variáveis de superfície de resposta

b_n - parâmetros de ajuste do modelo para superfície de resposta

$V(b)$ - variância dos parâmetros de ajuste do modelo para superfície de resposta

y - resultado estimado do modelo de superfície de resposta

MQFaj - média quadrática da falta de ajuste

MQep - média quadrática do erro puro

RESUMO

No presente trabalho são apresentados estudos sistemáticos da influência conjunta que alguns parâmetros exercem sobre a transferência de massa entre as fases de um sistema de extração líquido-líquido com micelas reversas; nas etapas de extração e re-extração, para fins de caracterização, modelagem local e otimização.

Como o sistema é intrinsecamente multivariável, uma aproximação por modelagem mecanística ou fenomenológica seria de grande complexidade, e, até o presente momento a literatura sobre o assunto é ínfima; além de não explicar o sistema como um todo no concernente à transferência de massa.

Assim a proposta adotada é a construção de modelos matemáticos empíricos que combinem dados experimentais e artifícios estatísticos tais como o método de análise por superfície de resposta, afim de suplantar a escassez de dados e também pelo mesmo constituir uma metodologia rápida e prática na solução de sistemas de engenharia e projeto.

ABSTRACT

In this work, systematic studies are performed on the influence certain parameters have on mass transfer between the phases of a reversed micellar liquid-liquid extraction system, concerning forward and back extraction. The goal is the system mathematical characterization and to achieve optimal mass transfer conditions, under a certain region.

The system characteristics is to have a couple of variables having sinergetic influence on mass transfer; so a phenomelogical approach would be of great complexity. The evidence of this fact is that few literature exists in this field, and the previous studies are not overviewening nor describing the mass transfer process of the system efectively.

Facing these facts, the construction of mathematical models combining experimental data and statistical artifices such as response surface method would fit the multivariable requests of the system concerning mass transfer explanation. This approach also constitute a fast and practical methodology for solving the engineering and project requirements for the system.

PALAVRAS CHAVE

MICELAS

ENZIMAS - PURIFICAÇÃO

TRIPSINA

SEPARAÇÃO (TECNOLOGIA)

SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS (ESTATÍSTICA)

MASSA - TRANSFERÊNCIA

KEYWORDS

MICELLES

ENZYMES

TRYPSIN

SEPARATION (TECHNOLOGY)

SURFACE RESPONSES (STATISTICS)

MASS TRANSFER

1.Introdução

1 INTRODUÇÃO

Somente em 1995 o mercado de enzimas movimentou em torno de US\$ 30,000,000.00 (Godfrey e West, 1996), sendo estes resultados decorrentes de um mercado em franca expansão. Porém, os protocolos existentes para purificação de enzimas constituem-se na sua maioria de várias operações com baixos rendimentos, tornando o produto oneroso devido ao seu alto custo industrial. Neste sentido, o emprego da extração líquido-líquido vem eliminar ou sinergizar o uso de algumas destas operações com vantagens, pois ao contrário da maioria dos processos exclusivamente em batelada existentes tais como a cromatografia, os sistemas líquido-líquido podem ser aplicados em contínuo; ou até mesmo como etapa de pré-purificação cromatográfica (Giovenco *et al.*, 1987).

Os processos clássicos de extração líquido-líquido consistem na separação dos componentes de uma mistura por contato entre duas fases líquidas imiscíveis, explorando-se a diferença de potencial químico entre um dos solutos e os solventes para promover a transferência preferencial do mesmo entre uma fase e outra.

Embora tal processo possua um vasto histórico de aplicações em larga escala bem sucedidas nos mais variados segmentos industriais (como petroquímico e farmacêutico), apresenta contribuição ainda muito modesta na purificação de bioprodutos tais como proteínas. Algumas características específicas das proteínas como moléculas em relação a aplicação direta e exclusiva dos solventes orgânicos regularmente utilizados nos processos convencionais são responsáveis por este fato, tais como:

- as proteínas globulares em sua maioria são insolúveis nos solventes apolares;
- os solventes orgânicos apresentam baixa ou nenhuma seletividade em relação as proteínas e seus contaminantes;
- a exposição direta da proteína ao solvente pode causar sua desnaturação total ou parcial através de sua modificação estrutural.

Assim, uma das soluções apontadas para sanar estes problemas e viabilizar a extração líquido-líquido como processo de separação de proteínas foi proposta inicialmente por Luisi *et al.* (1977, 1979) e Martinek *et al.* (1978), através da utilização de sistemas biomiméticos, ou seja sistemas que tivessem características análogas ao comportamento das membranas celulares semi porosas dos seres vivos. O sistema proposto consiste na adaptação do solvente orgânico em combinação com características específicas de surfatantes, para que o ambiente criado forme microemulsões com propriedade de acondicionar as proteínas sem desnaturá-las; e ainda com as vantagens de conferir-lhe certa seletividade e manter a imiscibilidade com solventes polares. Estes sistemas foram batizados devido as suas particularidades de sistemas de micelas invertidas ou micelas reversas.

Em sistemas de micelas reversas, a transferência de uma fase a outra e a seletividade não está ligada principalmente ao potencial químico das substâncias constituintes, mas sim a uma diversa gama de fatores intrínsecos das macromoléculas protéicas frente ao meio, tais como diferença de cargas, hidrofobicidade e relação de tamanho proteína *versus* micela reversa.

Devido a complexidade dos vários fatores intrínsecos ao sistema e suas influências na transferência de massa no sistema de micelas reversas, o estudo por planejamento fatorial seguida da modelagem estatística e análise por superfície de resposta mostra-se como ferramenta atraente para rápida

caracterização destes sistemas em projetos de engenharia ou para obtenção de pontos operacionais otimizados.

2.Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRIPSINA

A tripsina é a mais abundante das proteases produzidas pelo pâncreas dos animais e do homem. Ela é sintetizada pelas células exócrinas do pâncreas na forma do zimógeno tripsinogênio. Sua ativação ocorre somente após sua secreção no lúmen intestinal pela ação catalítica da enzima enteroquinase a qual se encontra liberada na mucosa intestinal quando em contato com o quimo, em concentrações que variam de 200 a 800 g/l. O tripsinogênio também pode ser ativado de forma autocatalítica pela própria tripsina formada (Guyton, 1992).

A tripsina desdobra as proteínas total e parcialmente digeridas em peptídeos de vários tamanhos, porém somente em condições especiais irá clivá-las à aminoácidos livres. Sua ação de hidrólise é específica, atacando ligações peptídicas nas quais o grupo carboxílico é fornecido pela arginina ou lisina. O pH ótimo de atividade catalítica da tripsina é de 7,7 a 30 °C (Lehningher, 1970). Entretanto, na forma cristalina mantém até 20% da atividade catalítica máxima em solução aquosa na faixa limite de pH compreendida entre 6 e 9 (Asgeirsson, 1989). Seu ponto isoelétrico ou pI é de 10,8 (Walter e Johansson, 1994).

Há mais de 5 décadas utiliza-se tripsina em grande escala na indústria, o que tem gerado uma enorme gama de artigos e estudos de aplicação nos mais diferenciados graus de pureza. Destacando algumas aplicações das mais citadas, é utilizada em anti inflamatórios medicinais, como clarificadora de

cerveja, em pool enzimático para detergentes, no tratamento de lã e como auxiliar no desenvolvimento de membranas e biosensores (Bailey e Ollis, 1986).

2.2 MICELAS

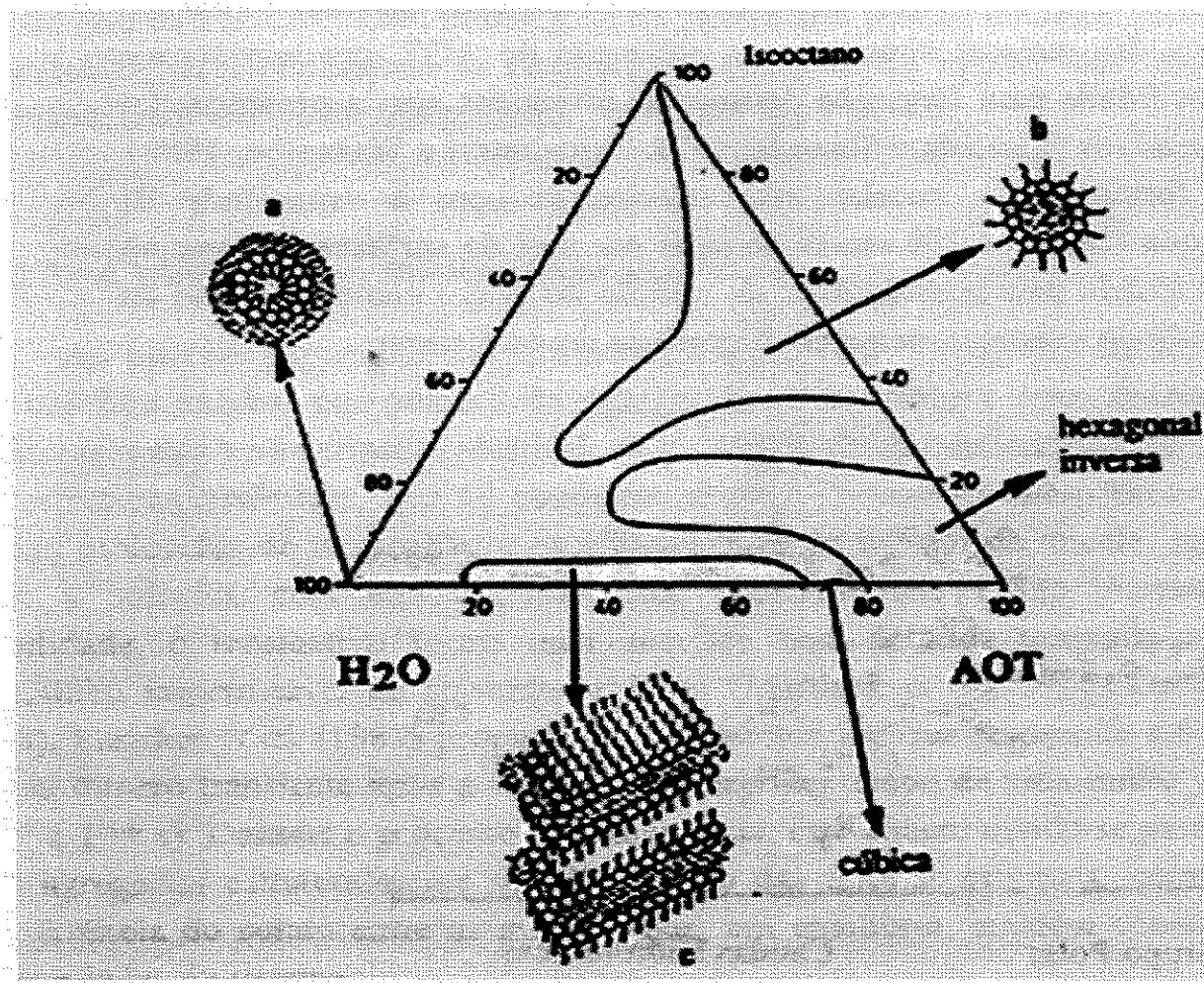
Surfatantes são moléculas que possuem características anfifílicas, ou seja, possuem na mesma molécula uma porção hidrofílica ou polar, denominada cabeça, e uma porção hidrofóbica ou apolar, a qual é referida como cauda.

Quando em meio aquoso, tendem, em determinadas condições e concentrações, a naturalmente autoorganizarem-se formando estruturas esféricas ou elipsoidais denominadas micelas; expondo suas porções hidrofílicas ao meio, e por conseguinte retraindo sua porção hidrofóbica ao interior das micelas (Volpe e Silva-Filho, 1995). Já na situação da solubilização de surfatantes em meio orgânico, ocorre devido as características apolares do meio a inversão da conformação micelar, ou seja, a estrutura micelar mantém-se. Porém, neste meio, a porção hidrofóbica é que fica exposta e a porção hidrofílica se retrai para o interior da micela Luisi *et.al* (1977). Nesta situação, temos a chamada micela reversa; aglomerados moleculares analogamente elipsoidais ou esféricos, cujo núcleo por suas características hidrofílicas pode em determinadas condições reter água, a qual fica parcialmente protegida do contato com o solvente orgânico pelo agregado de moléculas de surfatante. É neste núcleo, ou piscina como se referem muitos autores que a proteína pode ser acondicionada sem perda de atividade.

A auto-organização do surfatante em sistemas micelares para purificação de proteínas depende basicamente do equilíbrio em um sistema

ternário, constituído pelo solvente orgânico, água e surfatante; variando-os de maneira a atingir-se a concentração micelar crítica (CMC) ou seja, a faixa de concentrações onde ocorre a formação de micelas. Na figura 2.1 estão ilustradas as condições para ocorrência da CMC, assim como as demais aglomerações moleculares para o sistema AOT/Água/Iso octano.

Figura 2.1 Diagrama de fases com as variadas estruturas possíveis no sistema AOT/Iso octano/Água. **a** - micelas reversas; **b** - cristais líquidos lamelares; **c** - aglomerados de moléculas em estruturas hexagonais e cúbicas (adaptação de Stilbs e Lindman, 1984)



Do ponto de vista estrutural, define-se as micelas invertidas como sendo aglomerados moleculares relativamente ordenados, caracterizadas por um raio médio, um número de agregação e densidade de empacotamento bem definidos (Martinek *et.al.*,1989; Bordi e Cametti 1998). São estruturas dinâmicas, e não rígidas; que ao colidirem trocam moléculas de tensoativo e componentes do interior da micela entre si e entre a solução, com elevada velocidade (Luisi *et.al.*, 1988). Apesar desta mobilidade o tensoativo forma uma interface bem definida tornando o centro hidrofílico praticamente impermeável ao solvente orgânico (Martinek *et.al.*,1986; Luisi *et.al.*,1988).

A característica de retenção de água na micela também é importante, podendo-se medi-la através de um parâmetro conhecido como W_O , ou seja “water in oil”; definido como sendo a relação entre a concentração de água presente na piscina pela concentração de tensoativo:

$$W_O = \frac{[H_2O]}{[tensoativo]} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Para alguns autores, este parâmetro é de extrema importância no sistema de micelas invertidas pois determina a maioria das propriedades físicas e estruturais das micelas. Do valor deste parâmetro podem ser determinados o número de moléculas de surfatante por micela e o raio micelar. Ruckenstein e Karpe (1991) e Luisi *et.al.* (1988) à partir de considerações como assumir as micelas invertidas possuindo uma geometria esférica relacionaram teoricamente o parâmetro W_O com outros parâmetros estruturais das micelas como o raio micelar médio (r , em Angstroms) o número de agregação (N_{ag}) e a concentração molar de micelas (CM , em Moles.dm⁻³), a partir das equações 2.2, 2.3 e 2.4.

$$r = 1,64 W_o \quad (\text{Eq. 2.2})$$

$$Nag = 0,611 W_o \quad (\text{Eq. 2.3})$$

$$CM = 1,64 \frac{[AOT]}{W_o} \quad (\text{Eq. 2.4})$$

A validade destas equações foi testada por vários autores, apresentando boa aproximação. Castro e Cabral (1988) confirmaram os valores preditos através de análise com Raios-X, por espalhamento de luz (light scattering), por ultracentrifugação e por ressonância magnética nuclear (RNM). Lundgren *et.al.* (1998) testaram através de métodos fluorimétricos e por espectroscopia.

Obtido o valor do tamanho da micela, e conhecendo-se o tamanho da proteína pode-se verificar previamente se a mesma pode ser encapsulada; ou ainda, em que condições teríamos a expulsão da mesma da micela, pelo encolhimento desta última, o qual constitui fator importante na re-extração da proteína da fase orgânica.

Embora o mecanismo de solubilização e acondicionamento das proteínas nas micelas não esteja satisfatoriamente solucionado, alguns estudos e modelos já foram propostos (Martinek *et.al.*, 1986; Dungan *et.al.*,1991; Paradkar e Dordick, 1994; Mandal *et. al*, 1998). Embora os modelos não expliquem satisfatoriamente o processo de solubilização como um todo; desde os trabalhos de Göklen e Hatton (1985,1987) sabe-se que as proteínas podem ser eficientemente separadas e recuperadas por extração líquido-líquido utilizando sistemas de micelas reversas, apenas manipulando-se parâmetros do processo.

2.3 PARTIÇÃO DE PROTEÍNAS EM SISTEMAS MICELARES

A partição de proteínas em sistemas micelares tem como principal força motriz a utilização de tensoativos iônicos especiais em solução orgânica; contatando-se com uma solução aquosa, e regulando-se a transferência preferencial da proteína entre as fases pela alteração dos parâmetros do sistema.

A recuperação de proteínas neste tipo de sistema se dá através do contato de uma salmoura em pH controlado contendo a proteína com uma solução orgânica contendo o tensoativo. Nesta primeira operação, de extração, a proteína irá migrar da fase aquosa para a orgânica, o que em termos práticos é muito interessante pois esta fase aquosa poderia ser por exemplo o mosto aquoso de um meio de fermentação. Assim, em termos operacionais seria como se contatássemos o caldo fermentado diretamente com a fase orgânica, apenas acertando o pH e a força iônica do caldo aos níveis desejados.

Sendo o sistema micelar relativamente seletivo, muitos aminoácidos e resíduos celulares indesejáveis são já descartados nesta operação. A etapa seguinte constitui-se em recuperar da fase orgânica a proteína com um grau de pureza maior ou mais concentrada. A esta segunda etapa denomina-se re-extração, e constitui-se do contato da fase orgânica enriquecida com proteína com uma nova fase aquosa com força iônica e pH controlados de maneira que preferencialmente a proteína migre à esta nova fase aquosa.

Este tópico tem gerado inúmeros artigos, que em sua maioria investigam somente a primeira etapa, ou seja a extração. Poucos são os trabalhos que investigam o processo de maneira a englobar também a re-extração. Neste

sentido destacam-se os trabalhos de Dekker *et.al* (1986) e Carneiro-da-Cunha *et.al.* (1994).

Para obter-se a transferência entre fases de maneira a caracterizar e otimizar o processo de extração; faz-se necessário a compreensão de como alterar as propriedades do sistema para promover a partição de proteínas e assim manipular estes fatores em prol de se obter a transferência para a fase desejada. Assim é necessário primeiramente a investigação de como cada propriedade pode participar individualmente, contribuindo na modificação das características do sistema como um todo.

Diversos estudos de sistemas micelares já foram conduzidos, tanto tentando explicar a transferência de massa por aproximações de difusão clássica (Dekker *et.al.*, 1986; Dekker *et.al.*, 1989; Ruckenstein e Karpe, 1990; e Paradkar e Dordick, 1993), como modelagem mecanística e termodinâmica (Vlachy *et.al.*, 1993; Brandani *et.al.*, 1994). Porém os modelos apresentados ou não explicam o sistema satisfatoriamente, ou apresentam uma faixa de aplicação muito restrita ou então tem desvios muito grandes em relação à resultados obtidos experimentalmente.

2.4 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO SISTEMA

2.4.1 SURFATANTE

Quanto ao surfatante para sistemas micelares, é importante a classificação de acordo com a carga de sua porção hidrofílica, em catiônico, aniônico ou neutro. A escolha de qual surfatante será melhor aplicada ao

processo de separação dependerá de características da proteína e do sistema em si.

Dentro da categoria dos surfatantes aniônicos, um dos mais utilizados para a formação de micelas é o AOT (di-octil sulfosuccinato de sódio) ou Aerosol-OT, o qual será utilizado no presente trabalho. O AOT possui uma cabeça aniônica pequena e duas caudas hidrofóbicas, o que teoricamente lhe confere maior estabilidade na formação de micelas, solubilizando ou não proteínas (Albery *et al.*, 1987). Outra vantagem da utilização do AOT, em relação aos demais, é a facilidade para formação de micelas invertidas sem a presença dos chamados co-tensoativos. A espontaneidade de formação da micelas está relacionada com a capacidade de solubilização de água (cerca de 100 moles de água por mol de surfatante), que no caso de AOT é facilitada pela possibilidade de rotação do grupo etano em torno da ligação carbono-carbono existente na porção hidrofílica do surfatante.

Os tensoativos catiônicos constituem também uma vasta classe, compreendendo por exemplo a dos halogenetos de alquil-amônio (CTAB, TOMAC, TTAB); os fosfolipídeos, como a fosfatidilcolina e os surfatantes derivados de poli-óxidos de etileno (Tween, Span, Triton), somente para citar alguns. Necessariamente estes surfatantes necessitam um co-surfatante para a formação de micelas. Entretanto, como já descrito anteriormente, pode haver a necessidade imprescindível do uso dos mesmos de acordo com propriedades da proteína frente ao sistema.

A aplicação de tensoativos neutros, tais como o polietilenoglicol (PEG) está mais associado a um outro tipo de sistema que não o micelar; o sistema aquoso bifásico, onde as duas fases em contato constituem-se de água.

O ponto isoelétrico (pI) da proteína é quem definirá a escolha do tipo de surfatante para sistemas micelares, se aniônico ou catiônico. Para situações onde necessita-se trabalhar com a proteína em valores de pH abaixo de seu pI, a mesma apresentará distribuição de estado de ionização dos resíduos positiva; portanto para uma melhor transferência de massa preferencialmente escolheria-se um tensoativo aniônico. Para o caso contrário, ou seja, o pH do sistema acima do pI, o valor da distribuição de cargas na molécula de proteína seria negativa, portanto o surfatante preferencialmente escolhido para promoção de transferência entre as fases seria o catiônico.

Outro importante fator relacionado com tensoativos é a sua concentração. Göklen *et.al.* (1986) afirma que aumentando-se a concentração de tensoativo, aumenta-se a capacidade de retenção de água na fase orgânica e por conseguinte há um aumento no tamanho das micelas formadas, pelo aumento do número de agregação de moléculas de tensoativo; desde que se respeite os limites impostos pelo diagrama de equilíbrio do sistema.

Este fato pode vir a ser desejável ou não, pois o sistema em questão pode possuir proteínas indesejáveis de grande porte que poderiam vir a ser solubilizadas. Embora o mecanismo para explicar este tipo de efeito não esteja satisfatoriamente explicado, Chang *et.al.* (1994) constataram experimentalmente por análise de dispersão de luz que há um aumento significativo do raio micelar com o aumento da concentração de tensoativo na faixa estudada, compreendida entre 25 à 250 mM de tensoativo.

2.4.2 SOLVENTE ORGÂNICO

Com relação aos solventes, a premissa básica para a sua utilização no sistema de micelas invertidas é que seja imiscível com a água, pois além de

ser o meio mais convencionalmente utilizado em fermentações, a mesma constitui um dos solventes mais comuns da primeira etapa da maioria dos protocolos de purificação, a lixiviação.

Entre os solventes orgânicos utilizados como meio dispersivo na formação de micelas, destacam-se os hidrocarbonetos alifáticos, como o n-octano, isooctano e n-heptano; porém os aromáticos como o benzeno e o xileno e os halogenados como o clorofórmio também podem ser utilizados (Luisi *et.al.*,1988; Luisi e Magid,1986). Chang *et.al.* (1994) e Chang e Chen (1995) obtiveram bons resultados de recuperação e atividade enzimática, utilizando querosene como solvente orgânico para formação de micelas, sendo esta uma alternativa atraente em termos de redução de custos com reagentes.

Outra característica vital para a escolha de solventes orgânicos é que os mesmos não desnaturem a proteína quando utilizados em sistemas micelares. Trabalhos como os de Chang e Rhee (1990) e Han e Rhee (1986) investigaram a influência de vários solventes quanto a atividade enzimática, determinando empiricamente que para as enzimas estudadas o isooctano seria o solvente que menor influência teria na desnaturação.

Laane *et.al.*(1987) obtiveram empiricamente algumas regras para otimização da escolha do tipo de solvente orgânico em micelas invertidas, baseadas no logaritmo do coeficiente de partição do solvente ($\log P$). Segundo estes autores, a catálise enzimática é altamente favorecida em valores de $\log P$ maiores do que 4,0. A hipótese mais plausível é de que os solventes com maior grau de polaridade poderem interagir com a água intramicelar, desestabilizando as enzimas encapsuladas no interior das micelas. Para fins quantitativos, o isooctano por exemplo possui $\log P$ de 4,5.

Creagh *et.al* (1993) estudaram através de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétron o comportamento da alfa-quimiotripsina verificando que sistemas de micelas reversas de AOT/isooctano pouco afetam a enzima estruturalmente; e constataram que além da enzima manter sua atividade, em determinadas condições de extração até houve um aumento do poder catalítico da mesma.

2.4.3 SAL

Segundo alguns pesquisadores como Hatton *et.al.* (1987) e Liu *et.al.* (1998) os efeitos principais que podem ser inferidos sobre a atuação da força iônica são de modificação das interações eletrostáticas do sistema, causando efeitos como “salting in” (SI) ou “salting out” (SO), por exclusão ou inclusão molecular de acordo com a concentração de sal no sistema.

Porém, segundo estes mesmos pesquisadores, o principal efeito da ação salina se dá pela alteração na força iônica modificando o equilíbrio existentes entre as forças de repulsão eletrostáticas entre os grupos polares do surfatante, causando expansão ou retração do tamanho da micela.

Kennedy e Cabral (1993) porém afirmam que dependendo da concentração molar da solução tampão adicionada para controle de pH pode-se promover a separação de fases segundo os mesmos princípios, sem a necessidade intrínseca da adição de sal.

Não somente a concentração, mas também o tipo de sal pode vir a influenciar a transferência de massa entre fases. Marcozzi *et al.* (1991) e Leser *et al.* (1992) estudaram a influência de diferentes tipos de sal usados na fase

de extração e a influência global desta variável, comparando o rendimento obtido na re-extração.

2.4.4 pH

O valor de pH determina a taxa de dissociação dos resíduos carregados que compõe a estrutura primária da proteína, e assim a distribuição de cargas da molécula protéica em fase aquosa. Por conseguinte há o efeito da promoção de transferência da mesma entre as fases.

Porém, alguns autores (Luisi *et al.*, 1979; Castro *et al.*, 1988) obtiveram transferência de proteína em situações contrárias as já descritas, ou seja; trabalhando com a proteína apresentando sinal de distribuição de cargas idêntico ao da cabeça iônica do surfatante. Neste caso, a explicação mais plausível é de que a transferência para a fase micelar dos sistemas estudados seja controlada majoritariamente por interações hidrofóbicas da enzima frente ao meio.

Outro importante cuidado concernente ao pH seria a observação para que se operasse o sistema dentro da faixa em que a proteína não se desnatura. Esta observação primariamente observada para o solvente orgânico estende-se às concentrações de sal e de tensoativo, e constitui limites para os estudos de otimização do sistema.

2.5 EXTRAÇÃO

Fatores de ordem mecânica como velocidade de agitação, razão volumétrica entre as fases e método de contato exercem enorme influência na

transferência de enzima entre as fases; e são de extrema importância se o estudo do sistema tem a finalidade de resolução de projetos ou interesses de engenharia.

Poucos são os autores que focaram estes fatores na extração; destacando-se os trabalhos de Nishiki *et al.* (1993) que estudaram a influência da velocidade e tempo de agitação assim como a razão entre as fases orgânica e aquosa para a extração de várias enzimas em sistemas micelares; e de Matzke *et al.* (1992), que estudaram vários métodos de injeção e solubilização, inclusive contato da enzima em estado sólido com a fase orgânica. Regalado *et al.* (1994) também efetuaram estudos quanto a influência da transferência na extração quanto a razão entre fases.

Outro fator de relevância tanto na extração quanto na re-extração é a temperatura, principalmente se pretende-se operar o sistema em regiões onde a variação de temperatura seja muito acentuada. Para a maioria das enzimas, a faixa de atuação ideal é a compreendida entre 10 °C e 38 °C; entretanto isto não constitui uma regra geral, necessitando estudar-se cada caso particularmente. A tripsina por ser uma enzima de origem animal, em especial dos mamíferos, tem faixa de atividade catalítica próxima à faixa de temperatura corpórea dos mesmos.

Os cuidados mínimos quanto à temperatura é que a faixa de trabalho não esteja compreendida na região de desnaturação da enzima em questão. O ideal seria a operação na temperatura de máxima atividade catalítica da enzima, caso deseje-se utilizar diretamente a solução de re-extração.

2.6 RE-EXTRAÇÃO

Valem para a etapa de re-extração os mesmos comentários sobre a influência de fatores mecânicos mencionados anteriormente para a extração.

Segundo alguns autores, para muitas aplicações de enzimas o grau de pureza alcançado pelo emprego de sistemas de micelas reversas por si só já é satisfatório, não necessitando outras etapas posteriores de purificação.

Nitin e Luisi (1989), Leser *et.al* (1993), Dahuron e Cussler (1988) realizaram estudos modificando o procedimento clássico de re-extração em sistemas micelares, obtendo enzimas já na disposição final para uso como catalisadores. Respectivamente, eles imobilizaram a fase orgânica em gel de poliacrilamida; utilizaram esferas de sílica em contato com a fase orgânica e imobilizaram a fase orgânica em fibras semi-porosas.

Carlson e Nagarajan (1992) estudaram a adição à fase orgânica de substâncias desestabilizadoras de micelas, tais como álcoois, para liberação das enzimas na re-extração. No artigo são reportados fatores de recuperação de quase 100%, entretanto nada é mencionado quanto a atividade enzimática da proteína obtida por esse método. Este método é particularmente interessante, pois posteriormente o álcool pode ser separado do solvente orgânico por outra extração líquido-líquido, sendo estes reagentes reaproveitados no processo.

A constatação do fato que enzimas podem ser purificadas ou obtidas de maneira mais concentrada que na solução inicial pelo processo clássico de micelas reversas foi constatada por vários autores (Nishiki *et.al.*, 1995; Alves *et.al.* 1995). Vale citar o trabalho de Hentsch *et.al.* (1996), que investigou a eliminação de traços de AOT da fase aquosa de re-extração por simples

diálise. Como resultado deste estudo, chegou-se a conclusão que não apenas se ganharia em eficiência mas também em eficácia se as condições operacionais estivessem próximas da concentração de AOT mínima requerida por cada sistema; devido a menor contaminação de tensoativo.

2.7 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

2.7.1 PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento fatorial constitui uma ferramenta estatística para realização de estudos sobre um determinado fenômeno que possua muitas variáveis de maneira organizada e com objetivos bem planejados, reduzindo os experimentos a um número mínimo necessário.

Possibilita ainda a constatação de quais variáveis são de maior importância para determinados resultados do processo, sua influência individual e as interações que todas as variáveis possuem entre si, concernente a resposta global do fenômeno. Quando rigorosamente aplicado, o método gera a possibilidade de avaliar os erros experimentais e de regressão, e a modelagem matemática empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas, caracterizando assim o fenômeno. Toda a metodologia descrita a seguir é detalhadamente explicada por Box *et.al.*, (1978).

A construção de um planejamento fatorial começa pela escolha do número de níveis em que se deseja estudar para cada variável do sistema, e assim efetuar experimentos em todas as possíveis combinações. Por exemplo, se fosse decidido pelo estudo em dois níveis de “n” variáveis, teriam de ser efetuados 2^n experimentos. Se a opção fosse por três níveis, teríamos 3^n experimentos e assim por diante. Obviamente, se o pesquisador deseja

minimizar o número de experimentos, o estudo em 2 níveis é recomendado, sendo bastante eficaz para a maioria dos sistemas.

A segunda etapa do método é a escolha estratégica de um ponto de ensaio com valores definidos pela média intermediária entre os dois níveis escolhidos de cada variável; e a realização de ensaios em triplicata para este ponto. Assim, após a obtenção de todas as respostas pode-se:

- ajustar um modelo matemático de 1ª ordem para correlacionar variáveis e respostas;
- calcular os efeitos individuais e de interação das variáveis sobre a resposta;
- estimar os erros experimentais associados aos ensaios;
- determinar quais são os efeitos mais significativos sobre a resposta, comparando o valor do efeito com o do erro experimental estimado.

Para avaliar se os modelos empíricos apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais é necessária uma análise estatística, utilizando o coeficiente de correlação da regressão e o valor estimado para o teste F.

O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos pontos experimentais em relação ao modelo proposto, com a variância da própria população de pontos experimentais. Quando o valor do coeficiente é 1, a correlação entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais é perfeita. Quando este valor é zero não existe correlação. A análise dos valores intermediários não pode ser expressa de forma tão simples, mas em termos qualitativos, quanto mais próxima da unidade este valor for, melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais.

O teste F constitui a comparação do valor estimado para F à partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência. É possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O fundamento do teste F consiste em verificar se a hipótese nula é válida, isto é se as modificações introduzidas nas condições experimentais não tiveram nenhum efeito nos resultados obtidos. Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi devida exclusivamente a fatores aleatórios. Assim, consultando uma distribuição de referência, relevante para o sistema em estudo, se as variações nas respostas observadas experimentalmente apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não há razão para questionar a hipótese nula, do que se conclui que não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Por outro lado, se as variações observadas experimentalmente nas respostas forem muito grandes, a probabilidade de ocorrerem naturalmente na distribuição de referência será muito pequena. Neste caso, pode-se afirmar que uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada e os dados experimentais são representados pelo modelo proposto com um alto nível de confiança.

2.7.2 ANÁLISE POR SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Após a caracterização prévia do sistema pelo planejamento fatorial; para sua otimização, ou seja, pesquisa de regiões de máximo ou mínimos valores na resposta, pode-se recorrer ao método de análise por superfície de resposta.

Efetuem-se mais experimentos seguindo a tendência desejada apresentada pelas respostas do sistema em estudo, até obter-se uma inflexão nos valores de resposta ou que o coeficiente de correlação tenda a zero, ou

seja uma região onde o modelo de primeira ordem não seja válido. Nestas regiões são efetuados experimentos de modo a ajustar a resposta a um modelo de segunda ordem. Desde que seja testada a correlação dos modelos destas regiões, e os mesmos apresentem bons ajustes, pode-se inferir o ponto ótimo de resposta do sistema.

Alguns autores já utilizaram esta ferramenta estatística em sistemas de micelas reversas; porém curiosamente, não há notícias sobre a investigação ou caracterização da transferência de massa nas fases de extração e re-extração de uma maneira global explicada através dos estudos de seus parâmetros.

Dentre as aplicações da metodologia de superfície de respostas a sistemas micelares concernentes a transferência de massa, destacam-se os trabalhos de Bompensiere *et.al* (1998) que estudou a influência conjunta da concentração de tensoativo e concentração salina na purificação de uma enzima, e de Pyle *et.al*. (1994), obtendo dados sobre a ação conjunta exercida pelo pH e concentração salina para otimização de atividade.

3. Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a execução deste trabalho, os experimentos agruparam-se em duas etapas consecutivas: ensaios de triagem das variáveis e ensaios para confecção de superfície de respostas.

3.1 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS

Nesta etapa, utilizando um estudo por planejamento fatorial consegue-se estipular quais parâmetros são de relevância na transferência de massa em sistemas micelares. Observando o sistema, identificam-se as variáveis da tabela 3.1.

Como o sistema apresenta 20 variáveis, verifica-se que seriam necessários no mínimo 1.048.576 (2^{20}) experimentos para uma caracterização completa do sistema em dois níveis, o que seria de muito difícil execução prática e sem sentido para validação da metodologia. Assim, uma pré-triagem de variáveis com base em limitações das mesmas se torna interessante.

Por exemplo, para ambas etapas, o tipo de sal escolhido foi o NaCl, por seu baixo custo relativo e boa contribuição iônica. Como a faixa de pH operacional está abaixo do pI da proteína, o tensoativo escolhido deve preferencialmente ser aniônico; sendo o AOT uma opção bastante racional. A escolha do isooctano é explicada pelo custo e estabilidade na formação de micelas. A escolha da agitação por vórtex apresenta as vantagens de promoção de um íntimo contato entre as fases e fácil manuseio experimental. Na fase de re-extração é desejável que o pH se mantenha no valor de máxima

atividade da enzima; e na literatura, não há menção sobre influência marcante desta variável. A temperatura é um parâmetro comumente avaliado por outros trabalhos; entretanto, contribuições significativas só foram reportadas para valores próximos à zero Celsius ou em temperaturas próximas à faixa de desnaturação das proteínas.

TABELA 3.1 Lista de variáveis no processo de transferência de massa do sistema micelar

EXTRAÇÃO	RE-EXTRAÇÃO
1. Tipo de sal	1. Tipo de sal
2. [sal]	2. [sal]
3. Tipo de tensoativo	3. Tipo de tampão
4. [tensoativo]	4. pH
5. Tipo de tampão	5. Método de contatação
6. PH	6. Tempo de contatação
7. Método de contatação	7. Razão entre fases
8. Tempo de contatação	8. Temperatura
9. Tipo de solvente orgânico	
10. Razão entre fases	
11. [proteína]	
12. Temperatura	

O sistema escolhido para ensaios de extração ficou assim definido:

- Fase aquosa: NaCl, Tripsina (extrato cru de pâncreas suíno) e tampão fosfato, pela característica de boa afinidade deste com bioprodutos. A água utilizada foi deionizada através de tratamento em resina trocadora, em um deionizador marca Yamato modelo Autostil WA53. A tripsina utilizada em todos os ensaios era de extrato cru de pâncreas suíno, tipo II; e foi fornecida pela Sigma, código T8128, lote 70H0439. Os demais reagentes possuíam grau de pureza analítico, sendo que o NaCl foi

fornecido pela Nuclear e os componentes do tampão fosfato utilizados eram da Vetec. A preparação do tampão fosfato segue a metodologia descrita na tabela 3.2.

- Fase orgânica: AOT e iso-octano. O Aerosol OT utilizado era 100% puro, sólido; fornecido pela Cytec do Brasil (American Cyanamid Co.). O iso-octano utilizado possuía grau de pureza analítico, fornecido pela Vetec.

TABELA 3.2 Tampão fosfato (Deutscher, 1992). x = Fosfato monobásico de sódio 0,2M; y = Fosfato dibásico de sódio 0,2M. O pH tabelado é obtido pela diluição dos valores indicados em ml de x e y a um total de 200 ml de solução.

x	y	pH	X	y	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

Para a re-extração, ficou estabelecido o contato da fase orgânica proveniente da extração com uma solução aquosa de NaCl, tendo o pH controlado por tampão fosfato. A concentração de sal na fase de re-extração poderia vir a ser um fator de relevância; porém a pouca literatura existente a respeito não destaca esta variável como agente de significativa importância, e o acréscimo de mais uma variável ao sistema como será mostrado posteriormente acabaria adicionando mais ruído ao erro, podendo vir até a mascarar efeitos mais significativos. O mesmo raciocínio foi seguido para o tempo de contato nesta fase, mantido constante em 30 segundos.

3.2 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Nos experimentos de extração, misturaram-se alíquotas com volumes definidos das soluções aquosa e orgânica em eppendorfs de 1,6 ml. A agitação por vórtex foi efetuada em mixer marca Yamato modelo Touch Mixer MT-31, velocidade nível 2, controlando-se o tempo de contato. Logo após as amostras foram colocadas em uma centrífuga marca Eppendorf modelo 5415; ajustando-se a velocidade de rotação para 3000 rpm por 5 minutos para separação total das fases.

Retiraram-se então alíquotas de volume definido da fase orgânica; para contato com a fase aquosa de re-extração, seguida de agitação por vórtex no mixer, com tempo fixado em 30 segundos seguido de centrifuga à 3000 rpm por 5 minutos. Amostras da fase aquosa foram então retiradas para análises de proteína total e atividade.

Todos os experimentos foram conduzidos em ambiente condicionado, com temperatura mantida em $20 (\pm 2) ^\circ\text{C}$. Toda a preparação de soluções foi preparada em vidraria científica (balões volumétricos de 5ml; 10 ml; 25ml; 100ml; 500ml e tubos de ensaio de 5ml e 10 ml) da linha Pyrex®; e todas as pipetas automáticas utilizadas (5-40 μl ; 40-200 μl ; 200-1000 μl e 1-5 ml) foram da marca Labsystems modelo Finnpipette®.

Os experimentos foram conduzidos conforme descrito tanto na fase de triagem como na confecção da superfície de resposta.

3.3 PLANEJAMENTO FATORIAL PARA TRIAGEM DE VARIÁVEIS

Conforme descrito, as seguintes variáveis foram definidas para a investigação de triagem; na extração: tempo de contato; pH; [NaCl]; [AOT] e razão entre as fases. Na re-extração, optou-se por fixar todas as demais variáveis à exceção da razão entre fases.

Seguindo a metodologia do planejamento experimental descrita por Box *et al.* (1978) e Bruns *et al.* (1996), para investigação de cada uma das 6 variáveis estudadas em 2 níveis são necessários 64 experimentos. Como é de interesse o estudo da consistência das variáveis, todos os ensaios foram realizados em replicata para quantificação do erro experimental.

TABELA 3.3 Codificação das variáveis para algoritmo de triagem de variáveis. As unidades de medida são: Tempo de agitação em segundos; Concentração molar de NaCl; Concentração de surfatante em milimolar; Razão F1 (fase aquosa/fase orgânica) na extração entre as fases em μl ; e, Razão F2 (fase orgânica/fase aquosa) na re-extração entre as fases em μl .

Variável	nível -	nível +	Variável	nível -	nível +
a) Agitação	4	30	d) [AOT]	25	75
b) [NaCl]	0.1	0.3	e) razão F1	750/750	250/1250
c) pH	6	8	f) razão F2	500/500	500/1000

Os autores recomendam para redução de experimentos a realização de um planejamento fatorial fracionário, ou seja realizar apenas uma parcela dos 64 experimentos necessários. Apesar desta tática apresentar uma boa aproximação do fatorial completo, tem a desvantagem de ser menos acurada na mensuração de erros. Como não havia nenhuma outra argumentação negativa ao planejamento fatorial completo, optou-se pela adoção do mesmo para uma maior segurança nas respostas dos experimentos de triagem de variáveis.

TABELA 3.4 Codificação das variáveis estudadas

exp#	EXTRAÇÃO					RE-EXTRAÇÃO
	a	b	c	d	e	f
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-
6	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-
9	-	-	-	+	-	-
10	+	-	-	+	-	-
11	-	+	-	+	-	-
12	+	+	-	+	-	-
13	-	-	+	+	-	-
14	+	-	+	+	-	-
15	-	+	+	+	-	-
16	+	+	+	+	-	-
17	-	-	-	-	+	-
18	+	-	-	-	+	-
19	-	+	-	-	+	-
20	+	+	-	-	+	-
21	-	-	+	-	+	-
22	+	-	+	-	+	-
23	-	+	+	-	+	-
24	+	+	+	-	+	-
25	-	-	-	+	+	-
26	+	-	-	+	+	-
27	-	+	-	+	+	-
28	+	+	-	+	+	-
29	-	-	+	+	+	-
30	+	-	+	+	+	-
31	-	+	+	+	+	-
32	+	+	+	+	+	-

O algoritmo proposto para cálculo dos efeitos principais e de interação das variáveis sugere uma codificação em níveis + e -. Na tabela 3.3 temos os níveis adotados para o presente estudo.

TABELA 3.4 (continuação) Codificação das variáveis estudadas

exp#	EXTRAÇÃO					RE-EXTRAÇÃO
	a	b	c	d	e	f
33	-	-	-	-	-	+
34	+	-	-	-	-	+
35	-	+	-	-	-	+
36	+	+	-	-	-	+
37	-	-	+	-	-	+
38	+	-	+	-	-	+
39	-	+	+	-	-	+
40	+	+	+	-	-	+
41	-	-	-	+	-	+
42	+	-	-	+	-	+
43	-	+	-	+	-	+
44	+	+	-	+	-	+
45	-	-	+	+	-	+
46	+	-	+	+	-	+
47	-	+	+	+	-	+
48	+	+	+	+	-	+
49	-	-	-	-	+	+
50	+	-	-	-	+	+
51	-	+	-	-	+	+
52	+	+	-	-	+	+
53	-	-	+	-	+	+
54	+	-	+	-	+	+
55	-	+	+	-	+	+
56	+	+	+	-	+	+
57	-	-	-	+	+	+
58	+	-	-	+	+	+
59	-	+	-	+	+	+
60	+	+	-	+	+	+
61	-	-	+	+	+	+
62	+	-	+	+	+	+
63	-	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+	+

Para a confecção da matriz de coeficientes de contraste **X**, e cálculo dos efeitos principais e suas interações; as variáveis seguiram a organização de codificação apresentada na tabela 3.4. A numeração dos experimentos não representa a ordem em que os ensaios foram feitos, uma vez que os mesmos foram efetuados de forma aleatória.

Para a obtenção da matriz de coeficientes de contraste X em sua forma completa há a necessidade da inserção de mais uma coluna posicionada previamente à coluna da codificação do tempo de agitação e 57 colunas posicionadas posteriormente à coluna de re-extração; todas com 64 linhas. Assim, teremos a matriz X com a configuração 64x64.

A primeira coluna posicionada previamente à coluna da codificação do tempo de agitação somente conterá sinais positivos. A inserção desta coluna é um artifício utilizado para o cálculo da média global. As demais 57 colunas posicionadas posteriormente à coluna do efeito de re-extração servirão como auxiliares no cálculo da interação dos efeitos, e possuirão sinais resultantes da multiplicação dos sinais dos efeitos em questão naquela linha. Por exemplo a interação “ab” na linha 1 da matriz de coeficiente de contrastes apresenta os sinais negativo para “a” e negativo para “b”. Assim o sinal da interação “ab” nesta linha será positivo; sendo este produto realizado para todas interações de efeitos em todas as linhas da matriz. A sequência de interações dos efeitos para as colunas posicionadas após a coluna do efeito da re-extração (ou seja, após o efeito “f”), são respectivamente: ab, ac, ad, ae, af, bc, bd, be, bf, cd, ce, cf, de, df, ef, abc, abd, abe, abf, acd, ace, acf, ade, adf, aef, bcd, bce, bcf, bde, bdf, bef, cde, cdf, cef, def, abcd, abce, abcf, abde, abdf, abef, acde, acdf, acef, adef, bcde, bcdf, bcef, bdef, cdef, abcde, abcdf, abcef, abdef, acdef, bcdef, abcdef.

O cálculo dos efeitos e sua interações foi efetuado através da multiplicação da matriz X^t (transposta de X) pelo vetor y , composto pela resposta dos valores médios da quantidade de proteína total re-extraída. Temos assim o vetor e com o resultado dos efeitos. O efeito da média global será obtido pela divisão do valor na primeira linha do vetor e por 64; os demais efeitos serão obtidos pela divisão das demais linhas por 32 conforme algoritmo

descrito por Box *et al.* (1978).

$$\mathbf{e} = \mathbf{X}^t \cdot \mathbf{y} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Fazendo $\mathbf{d}$ o vetor coluna do módulo da diferença entre os ensaios e $\mathbf{d}^t$ sua transposta, o erro experimental é obtido através das equações:

$$s^2 = (1/2N) \cdot (\mathbf{d}^t \cdot \mathbf{d}) \quad (\text{Eq. 3.2})$$

$$V_{(\text{efeito})} = s^2/4 \quad (\text{Eq. 3.3})$$

3.4 ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Escolhidas as variáveis de maior consistência para o estudo, aplica-se a metodologia de operações evolucionárias, ou EVOP. A EVOP consiste em provocar perturbações no sistema na região de interesse, seja para maximizar ou minimizar uma resposta; e assim prosseguir até que obtenham-se valores característicos de inflexão.

Neste estudo, para investigação do ponto ótimo operacional do sistema, utilizou-se a EVOP, seguida da caracterização da região de inflexão através de um planejamento fatorial em estrela para confecção de uma superfície de resposta.

O planejamento em estrela consiste na confecção de uma malha de experimentos que circundem o ponto anterior à inflexão - que por ser objeto de nosso estudo será denominado ponto central - de modo que se possa ajustar um modelo estatístico de 2ª ordem ao fenômeno. Efetua-se um segundo planejamento experimental em torno do ponto central, adicionando pontos equidistantes em termos codificados (i.e. $-\sqrt{2}$ e $\sqrt{2}$) do ponto central. Assim,

para duas variáveis x_1 e x_2 em dois níveis, temos a matriz de contraste X para análise da superfície de resposta; onde também a 1ª coluna é preenchida apenas com valores unitários positivos, e os valores das demais colunas são determinados pela operação em questão efetuada para todas as linhas da matriz.

$$X = \begin{array}{c|cccccc} & & x_1 & x_2 & x_1^2 & x_2^2 & x_1 \cdot x_2 \\ \hline 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -\sqrt{2} & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & \sqrt{2} & 0 & 2 & 0 \\ 1 & 1 & \sqrt{2} & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & -\sqrt{2} & 0 & 2 & 0 \end{array} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Resolvendo a matriz X , através da equação 3.5, obtém-se os parâmetros de ajuste da expressão geral para os modelos quadráticos 3.7. Obtendo s^2 das observações experimentais do ponto central, e utilizando-se a equação 3.6 calcula-se o erro padrão dos parâmetros de ajuste.

$$b = (X^t \cdot X)^{-1} \cdot X^t \cdot y \quad (\text{Eq. 3.5})$$

$$V(b) = (X^t \cdot X)^{-1} \cdot s^2 \quad (\text{Eq. 3.6})$$

$$y = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_{11} \cdot x_1^2 + b_{22} \cdot x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (\text{Eq. 3.7})$$

Para validação do modelo quadrático ajustado, efetua-se uma análise de regressão para verificação da significância estatística através da comparação entre a equação 3.8 e o teste F para um determinado grau de confiança.

$$MQ_{faj}/MQ_{ep} \quad (\text{Eq. 3.8})$$

Onde MQ_{faj} é a média quadrática da falta de ajuste; calculada pelo somatório do quadrado das diferenças dos valores preditos pelo modelo para o fator em estudo subtraído de seu respectivo valor do ponto médio dividindo pelo seu número de graus de liberdade. Já a MQ_{ep} , ou média quadrática do erro puro obtém-se do somatório do quadrado das diferenças do valor observado experimentalmente para o fator em estudo subtraído de seu respectivo valor do ponto médio dividindo pelo seu número de graus de liberdade.

Para a MQ_{faj} o número de graus de liberdade é a diferença entre o número de níveis distintos e o número de parâmetros do modelo. O número de graus de liberdade da MQ_{ep} é obtido pela diferença entre o número total de observações e o número de parâmetros do modelo.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

A metodologia de análise descrita a seguir foi a utilizada em todos os ensaios realizados no decurso da execução deste trabalho. Todo o trabalho de investigação espectrofotométrica foi conduzida somente para a fase aquosa da re-extração, em um equipamento da marca Hitachi, modelo U1000.

3.5.1 ANÁLISE DE PROTEÍNA TOTAL

Para determinação da proteína total, utilizou-se a análise com ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985) por apresentar baixa sensibilidade ao surfatante. O método possui acuracidade para mensurar proteína total na faixa de concentração de 0,01 à 2,5 g/l.

O método constitui da preparação de uma solução de trabalho com 100 volumes de um reagente A e 2 volumes de um reagente B, a saber:

- Reagente A: 1 g de bicinconinato; 0,95 g de Na_2HCO_3 ; 0,16 g de tartarato de sódio; 2 g de Na_2CO_3 ; 0,4 g de NaOH trazidos à 100 ml com água deionizada. O pH é ajustado à 11,25 pela adição gota à gota de NaOH 10 M.
- Reagente B: 0,4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 10 ml de água.

A solução de trabalho possui coloração verde e é estável por uma semana quando preparada. Todos os reagentes possuíam grau de pureza analítico; o bicinconinato utilizado foi fornecido pela Sigma; o $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pela Ecibra e os demais reagentes pela Vetec.

O procedimento de mensuração constitui-se em adicionar à 20 μl de amostra 1 ml de solução de trabalho, agitando vigorosamente em seguida. Incubação por 30 minutos à 60 °C em equipamento de banho-maria da marca Fanem. A observação deste período é importante, pois as amostras tratadas desta maneira ficam estáveis para leitura por uma hora. Após a incubação as amostras são resfriadas à temperatura ambiente e analisadas em espectrofotômetro. A leitura da absorbância deve ser efetuada à 562 nm, podendo-se utilizar tanto cubetas de poliestireno como cristal. Para correlacionar os valores lidos, obteve-se uma curva padrão pela análise de

várias concentrações diferentes da proteína em estudo em cada conjunto de experimentos.

3.5.2 ANÁLISE DE ATIVIDADE PROTEÁSICA

O protocolo à seguir foi proposto por Leighton *et al.* (1973). À 250 µl de substrato de azocaseína 2% p/v, adiciona-se 150 µl da solução de protease a ser analisada. Entre as amostras, há a necessidade de se preparar uma análise em branco. Segue-se agitação vigorosa e acionamento do cronômetro, para incubação de 60 minutos. Imediatamente ao final deste período, é necessária a adição 1,2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10%, agitando vigorosamente. Precipitação da solução por 15 minutos, seguida de centrifugação à 8000 rpm por 5 minutos. Retira-se uma alíquota de 0,8 ml do sobrenadante, adicionando à mesma 1,4 ml de NaOH 1 M. A leitura da absorbância é efetuada à 410 nm em espectrofotômetro. A unidade de atividade é diretamente proporcional à absorbância.

A azocaseína foi fornecida pela Sigma. Os demais reagentes em grau de pureza analítico foram fornecidos pela Vetec.

4.Resultados e Discussões

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2 TRIAGEM DE VARIÁVEIS

As curvas de calibração para proteína total e atividade proteásica da enzima estão apresentadas nos anexos A e B, respectivamente. Estas curvas foram aproximadas dos dados obtidos experimentalmente com o programa GRAPHER® r.1.28 para a proteína em solução nas condições de re-extração; reportados nas tabelas 4.1 e 4.2.

TABELA 4.1 Leitura da absorbância *versus* Concentração de proteína

Tripsina (g/l)	2.000	1.660	1.330	1.000	0.667	0.333	0.067	0.033	0.000
Absorbância	1.548	1.527	1.490	1.421	1.175	0.959	0.507	0.486	0.470

A tabela 4.3 demonstra os resultados dos ensaios de triagem obtidos para as variáveis de tempo de contato durante agitação; pH; concentração de cloreto de sódio [NaCl]; concentração de tensoativo [AOT]; razão de fases na extração (Faq./Forg.) e razão entre fases nas re-extração (Forg./Faq.) em dois níveis. Os resultados obtidos para proteína total e atividade estão expressos em gramas por litro; ou seja, o resultado que se obteria se fosse utilizada uma solução de trabalho com o equivalente em concentração de tripsina.

TABELA 4.2 Leitura de Absorbância (Atividade relativa) *versus* Concentração de Enzima

Absorbância ($\times 10^3$)	392	379	368	357	317	275	139
Concentração (g/l)	2.0	1.66	1.33	1.0	0.66	0.33	0

4. Resultados e Discussões

Vale ressaltar que os números dos experimentos são apenas para fins ilustrativos e para facilitar a execução do algoritmo de cálculo; uma vez que os mesmos foram efetuados de maneira aleatória.

TABELA 4.3 Planejamento das variáveis da partição de tripsina no sistema micelar em dois níveis

exp.#	EXTRAÇÃO					RE-EXTRAÇÃO				
	tempo (seg.)	[NaCl] (M)	pH	[AOT] (mM)	Faq./Forg. (μl/μl)	Forg./Faq. (μl/μl)	Proteína Total			média ativ.
							replic.1	replic.2	média	
1	4	0.1	6	25	750/750	500/500	0.25	0.27	0.26	0.20
2	30	0.1	6	25	750/750	500/500	0.29	0.29	0.29	0.19
3	4	0.3	6	25	750/750	500/500	0.26	0.26	0.26	0.15
4	30	0.3	6	25	750/750	500/500	0.26	0.26	0.26	0.00
5	4	0.1	8	25	750/750	500/500	0.28	0.26	0.27	0.14
6	30	0.1	8	25	750/750	500/500	0.27	0.27	0.27	0.20
7	4	0.3	8	25	750/750	500/500	0.25	0.25	0.25	0.07
8	30	0.3	8	25	750/750	500/500	0.26	0.27	0.26	0.07
9	4	0.1	6	75	750/750	500/500	0.31	0.29	0.30	0.16
10	30	0.1	6	75	750/750	500/500	0.29	0.27	0.28	0.15
11	4	0.3	6	75	750/750	500/500	0.27	0.27	0.27	0.02
12	30	0.3	6	75	750/750	500/500	0.27	0.28	0.27	0.17
13	4	0.1	8	75	750/750	500/500	0.27	0.28	0.27	0.16
14	30	0.1	8	75	750/750	500/500	0.30	0.28	0.29	0.11
15	4	0.3	8	75	750/750	500/500	0.27	0.26	0.26	0.04
16	30	0.3	8	75	750/750	500/500	0.28	0.25	0.26	0.03
17	4	0.1	6	25	250/1250	500/500	0.24	0.25	0.25	0.12
18	30	0.1	6	25	250/1250	500/500	0.26	0.29	0.28	0.12
19	4	0.3	6	25	250/1250	500/500	0.23	0.26	0.24	0.01
20	30	0.3	6	25	250/1250	500/500	0.26	0.25	0.25	0.02
21	4	0.1	8	25	250/1250	500/500	0.26	0.24	0.25	0.14
22	30	0.1	8	25	250/1250	500/500	0.25	0.25	0.25	0.10
23	4	0.3	8	25	250/1250	500/500	0.27	0.25	0.26	0.17
24	30	0.3	8	25	250/1250	500/500	0.25	0.26	0.25	0.03
25	4	0.1	6	75	250/1250	500/500	0.28	0.26	0.27	0.01
26	30	0.1	6	75	250/1250	500/500	0.26	0.26	0.26	0.12
27	4	0.3	6	75	250/1250	500/500	0.25	0.25	0.25	0.06
28	30	0.3	6	75	250/1250	500/500	0.25	0.25	0.25	0.05
29	4	0.1	8	75	250/1250	500/500	0.27	0.26	0.27	0.04
30	30	0.1	8	75	250/1250	500/500	0.26	0.26	0.26	0.04
31	4	0.3	8	75	250/1250	500/500	0.25	0.25	0.25	0.06
32	30	0.3	8	75	250/1250	500/500	0.25	0.24	0.25	0.06

4. Resultados e Discussões

TABELA 4.3 (Continuação) Planejamento das variáveis da partição de tripsina no sistema micelar em dois níveis

EXTRAÇÃO						RE-EXTRAÇÃO				
exp.#	tempo (seg.)	[NaCl] (M)	pH	[AOT] (mM)	Faq./Forg. (μl/μl)	Forg./Faq. (μl/μl)	Proteína Total			média ativ.
							replic.1	replic.2	média	
33	4	0.1	6	25	750/750	500/1000	0.29	0.32	0.31	0.21
34	30	0.1	6	25	750/750	500/1000	0.41	0.40	0.41	0.20
35	4	0.3	6	25	750/750	500/1000	0.28	0.28	0.28	0.25
36	30	0.3	6	25	750/750	500/1000	0.37	0.36	0.37	0.26
37	4	0.1	8	25	750/750	500/1000	0.27	0.27	0.27	0.23
38	30	0.1	8	25	750/750	500/1000	0.28	0.29	0.29	0.22
39	4	0.3	8	25	750/750	500/1000	0.31	0.32	0.32	0.34
40	30	0.3	8	25	750/750	500/1000	0.35	0.37	0.36	0.20
41	4	0.1	6	75	750/750	500/1000	0.25	0.27	0.26	0.16
42	30	0.1	6	75	750/750	500/1000	0.32	0.34	0.33	0.19
43	4	0.3	6	75	750/750	500/1000	0.30	0.29	0.30	0.37
44	30	0.3	6	75	750/750	500/1000	0.34	0.36	0.35	0.21
45	4	0.1	8	75	750/750	500/1000	0.30	0.29	0.30	0.19
46	30	0.1	8	75	750/750	500/1000	0.29	0.31	0.30	0.19
47	4	0.3	8	75	750/750	500/1000	0.26	0.27	0.27	0.26
48	30	0.3	8	75	750/750	500/1000	0.29	0.29	0.29	0.23
49	4	0.1	6	25	250/1250	500/1000	0.26	0.25	0.26	0.06
50	30	0.1	6	25	250/1250	500/1000	0.26	0.25	0.25	0.05
51	4	0.3	6	25	250/1250	500/1000	0.25	0.25	0.25	0.05
52	30	0.3	6	25	250/1250	500/1000	0.26	0.26	0.26	0.07
53	4	0.1	8	25	250/1250	500/1000	0.24	0.25	0.25	0.05
54	30	0.1	8	25	250/1250	500/1000	0.25	0.25	0.25	0.08
55	4	0.3	8	25	250/1250	500/1000	0.25	0.25	0.25	0.03
56	30	0.3	8	25	250/1250	500/1000	0.25	0.24	0.25	0.08
57	4	0.1	6	75	250/1250	500/1000	0.26	0.27	0.27	0.03
58	30	0.1	6	75	250/1250	500/1000	0.26	0.26	0.26	0.10
59	4	0.3	6	75	250/1250	500/1000	0.26	0.24	0.25	0.01
60	30	0.3	6	75	250/1250	500/1000	0.26	0.26	0.26	0.05
61	4	0.1	8	75	250/1250	500/1000	0.26	0.26	0.26	0.01
62	30	0.1	8	75	250/1250	500/1000	0.26	0.26	0.26	0.04
63	4	0.3	8	75	250/1250	500/1000	0.29	0.27	0.28	0.05
64	30	0.3	8	75	250/1250	500/1000	0.23	0.25	0.24	0.05

TABELA 4.4 Efeitos principais e de interação das variáveis

Média = 0,2738	Interação 3 fatores	Interação 4 fatores
	abc = 0,0000	abcd = -0,0038
Efeitos principais	abd = 0,0006	abce = -0,0044
a = 0,0125	acd = 0,0031	abde = 0,0000
b = -0,0056	bcd = -0,0100	acde = -0,0025
c = -0,0094	abe = 0,0000	bcde = 0,0081
d = -0,0013	ace = 0,0038	abcf = -0,0006
e = -0,0356	bce = -0,0006	abdf = -0,0038
f = 0,0219	ade = 0,0019	acdf = -0,0038
	bde = 0,0000	bcdf = -0,0069
Interação 2 fatores	cde = 0,0000	abef = -0,0006
ab = -0,0006	abf = 0,0012	acef = 0,0081
ac = -0,0094	acf = -0,0075	bcef = -0,0038
bc = 0,0050	bcf = 0,0019	adef = 0,0025
ad = -0,0075	adf = -0,0019	bdef = 0,0006
bd = -0,0031	bdf = 0,0000	cdef = -0,0019
cd = 0,0019	cdf = 0,0025	
ae = -0,0144	aef = -0,0125	Interação 5 fatores
be = -0,0012	bef = -0,0044	abcde = 0,0006
ce = 0,0075	cef = -0,0044	abcdf = 0,0019
de = 0,0069	def = 0,0100	abcef = -0,0050
af = 0,0094		abdef = -0,0019
bf = 0,0088		acdef = -0,0019
cf = -0,0050		bcdef = 0,0112
df = -0,0081		
ef = -0,0213		Interação 6 fatores
		abcdef = -0,0037

A tabela 4.4 apresenta o resultado da aplicação dos algoritmos de cálculo para os efeitos principais e de interação das variáveis, concernente à transferência de massa. Para este fim, utilizou-se o programa FATORIAL.EXE.

O erro, obtido através das equações 3.2 e 3.3 para os efeitos principais e de interação é de 0,0003. Para a média o erro estimado é de 0,00015.

Da tabela 4.4 verifica-se que os efeitos de tempo de contato e as razões entre fases na extração e re-extração (efeitos “a”, “e” e “f” respectivamente) apresentam maior sensibilidade na resposta com sua variação; e serão analisados nos experimentos posteriores.

O ponto experimental 34 da tabela 4.3 apresentou a maior taxa de transferência de proteína; porém uma desnaturação relativa muito grande. O ponto 43 por sua vez teve o melhor índice de atividade, e taxa de transferência relativamente boa; porém a melhor relação de ganho de transferência com retenção de atividade foi apresentada pelo ponto 39.

A variável pH embora tenha apresentado efeito relativamente significativo na transferência de massa; possui tendência de variação contrária à da condição mais favorável.

4.2 EVOLUÇÃO OPERACIONAL DA CONDIÇÃO MAIS FAVORÁVEL

Inicialmente, investigou-se o ponto central experimental, para um mapeamento mais detalhado das respostas do sistema.

4. Resultados e Discussões

TABELA 4.5 Investigação do ponto central do planejamento de triagem

EXTRAÇÃO						RE-EXTRAÇÃO				
exp.#	tempo (seg.)	[NaCl] (M)	pH	[AOT] (mM)	Faq./Forg. (μl/μl)	Forg./Faq. (μl/μl)	Proteína Total			média ativ.
							replic.1	replic.2	média	
pc	17	0.2	7	50	500/1000	500/750	0.28	0.27	0.28	0.06

Os valores expressos na tabela 4.5 para proteína total e atividade também são referentes à concentração equivalente em g/l de uma solução de tripsina.

Definido as condições do experimento 39 como ponto de partida da EVOP e tendo o sentido orientado pela análise dos resultados do ponto central, foram efetuados experimentos de investigação conforme demonstrado na tabela 4.6. As variáveis F1 (fase aquosa/fase orgânica) e F2 (fase orgânica/fase aquosa) são as razões entre as fases na extração e re-extração respectivamente. Os valores de pH, [NaCl] e [AOT] do experimento 39 foram mantidos constantes nestes experimentos e nas investigações posteriores.

TABELA 4.6 Experimentos EVOP

Exp.	T (s)	F1 (μ l/ μ l)	F2 (μ l/ μ l)	Transferência (g/l)	Atividade (g/l)
I	2	600/750	400/1000	0.21	0.06
II	6	600/750	400/1000	0.23	0.18
III	2	720/600	400/1000	0.27	0.27
IV	6	720/600	400/1000	0.27	0.25
V	2	600/750	450/750	0.30	0.34
VI	6	600/750	450/750	0.31	0.31
VII	2	720/600	450/750	0.29	0.30
VIII	6	720/600	450/750	0.29	0.29

Uma observação preliminar indica que a variável tempo não apresenta contribuição significativa para os níveis estudados nos experimentos EVOP. Utilizando o programa FATORIAL.EXE para um estudo de sua contribuição, obtém-se os valores da tabela 4.7.

TABELA 4.7 Efeitos principais e secundários das variáveis EVOP

Média		Interação 2 fatores	
x	0.2713	T.F1	-0.0075
Efeito Principal		T.F2	-0.0175
T	0.0075	F1.F2	-0.0325
F1	0.0175	Interação 3 fatores	
F2	0.0525	T.F1.F2	0.0025

4.3 INVESTIGAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Para a confecção da matriz do planejamento estrela; níveis adicionais para as variáveis foram codificados, conforme demonstrado na tabela 4.8. Aproveitando os dados obtidos na expansão EVOP, obtemos a matriz da tabela 4.9.

TABELA 4.8 Codificação das variáveis do planejamento estrela

Fator	Codificação	-1.5	-1	0	1	1.5
T(s)	x_1	1	2	4	6	7
F1 (µl/µl)	x_2	560/800	600/750	750/750	720/600	780/600
F1 (µl/µl)	x_3	390/600	400/1000	500/1000	450/750	350/1000

Confirmando o estudo anterior, a variável tempo apresenta pequena contribuição para os níveis estudados. Entretanto, como um dos interesses da

modelagem do sistema seria a facilitação de estudos de engenharia, a caracterização com e sem a inclusão desta variável será apresentada.

4.3.1 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O SISTEMA

Utilizando o programa MODREG.EXE, com os dados da matriz do planejamento estrela, testou-se a modelagem linear e quadrática do sistema caracterizado pelas variáveis T, F1 e F2.

A equação 4.1a é o resultado da modelagem linear para o sistema. Logo abaixo da mesma e em parênteses os erros obtidos pela aplicação da equação 3.6.

$$y = 0.2824 + 0.0024x_1 + 0.0020x_2 + 0.0228x_3 \quad (\text{Eq. 4.1a})$$

(0.0243) (0.0094) (0.0094) (0.0094)

Verificando a validação dos parâmetros obtidos em comparação com seus respectivos erros, obtém-se a equação 4.1.

$$y = 0.2824 + 0.0228x_3 \quad (\text{Eq. 4.1a})$$

(0.0243) (0.0094)

O resultado obtido pela aplicação da equação 3.8 foi 37.6897, em comparação com o teste $F_{11,2}$ que é aproximadamente 19,405 (Bruns *et al.*, 1995). para 95% de confiança. Assim verifica-se que este modelo não ajusta-se adequadamente, pois contém ainda muitos resíduos da diferença entre os valores preditos para os fatores em estudo e seus pontos médio. Disso, concluí-se que a região estudada situa-se perto de um ponto de inflexão, ou ponto ótimo.

TABELA 4.9 Matriz do planejamento estrela

exp.	x_1	x_2	x_3	Transferência (g/l)	Atividade (g/l)
I	-1	-1	-1	0.21	0.06
II	1	-1	-1	0.23	0.18
III	-1	1	-1	0.27	0.27
IV	1	1	-1	0.27	0.25
V	-1	-1	1	0.30	0.34
VI	1	-1	1	0.31	0.31
VII	-1	1	1	0.29	0.30
VIII	1	1	1	0.29	0.29
IX	0	0	0	0.31	0.34
X	0	0	0	0.32	0.33
XI	0	0	0	0.32	0.29
XII	-1.5	0	0	0.32	0.30
XIII	1.5	0	0	0.32	0.33
XIV	0	-1.5	0	0.29	0.27
XV	0	1.5	0	0.26	0.23
XVI	0	0	-1.5	0.22	0.20
XVII	0	0	1.5	0.27	0.24

A modelagem quadrática obtida está apresentada na correlação 4.1a para a transferência. Os erros associados à cada termo estão discriminados abaixo entre parêntesis.

$$\begin{aligned}
 y = & 0.3158 + 0.0024x_1 + 0.0020x_2 + 0.0228x_3 + 0.0026x_1^2 - 0.0174x_2^2, \\
 & (0.008) \quad (0.004) \quad (0.004) \quad (0.004) \quad (0.005) \quad (0.005) \\
 & - 0.0307x_3^2, -0.0038 x_1x_2 - 0.0013 x_1x_3 - 0.0163x_2x_3 \quad (\text{Eq. 4.1a}) \\
 & (0.005) \quad (0.016) \quad (0.016) \quad (0.016)
 \end{aligned}$$

Levando em consideração os erros, temos a eliminação de alguns termos, obtendo a equação 4.1. Como já era esperado; a influência da variável tempo desapareceu.

$$y = 0.3158 + 0.0228x_3 - 0.0174x_2^2 - 0.0307x_3^2 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

(0.008) (0.004) (0.005) (0.005)

Para esta correlação, a aplicação da equação 3.8 apresentou o valor de 8.1402 em contraste com o teste $F_{5,2} = 19.30$ (Bruns *et al.*, 1995) para 95% de confiança; ou seja o modelo está bem ajustado.

Efetuando as derivadas parciais à equação 4.1 e igualando à zero, obtemos a região de máximo de transferência:

$$\delta y / \delta x_2 = -0.0348x_2 = 0;$$

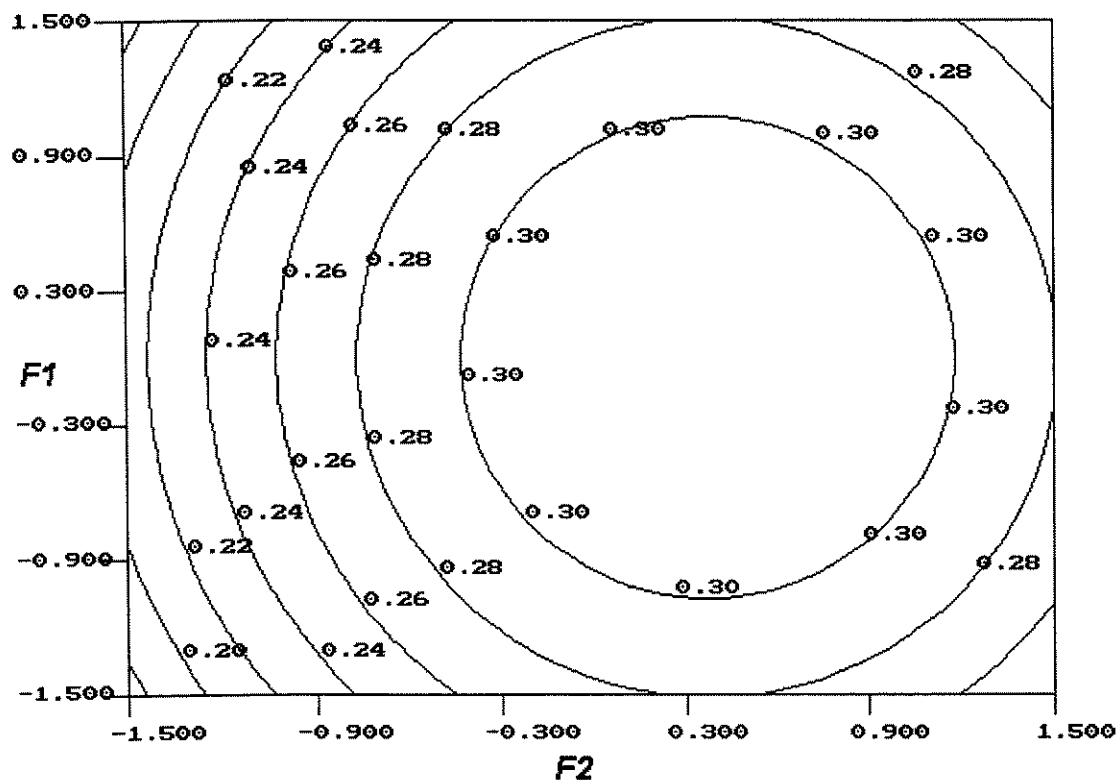
$$\delta y / \delta x_3 = 0.0228 - 0.0614x_3 = 0;$$

Portanto o ponto máximo ocorrerá para $x_2 = 0$; $x_3 = 0.3713$. Isto corresponderia à $F1 = 750/750$ ($\mu\text{l}/\mu\text{l}$) e $F2 = 0.537/1000$ ($\mu\text{l}/\mu\text{l}$), obtendo-se uma transferência da ordem de $y = 0.32$ (g/l).

Assim, para o modelo da equação 4.1, e utilizando o programa PLOT.EXE, obtemos a figura 4.1; e utilizando o programa MATLAB® obtemos a mesma superfície em 3D na figura 4.2.

Testando-se a condição de máximo de transferência de proteína obtida através das derivadas parciais, obteve-se o resultado de 0.32 (g/l), como média de 0.33 (g/l) e 0.31 (g/l) pelo processo de re-extração clássica. A média de atividade nesse caso foi de 0.34 (g/l).

FIGURA 4.1 Superfície de resposta para a região ótima do sistema



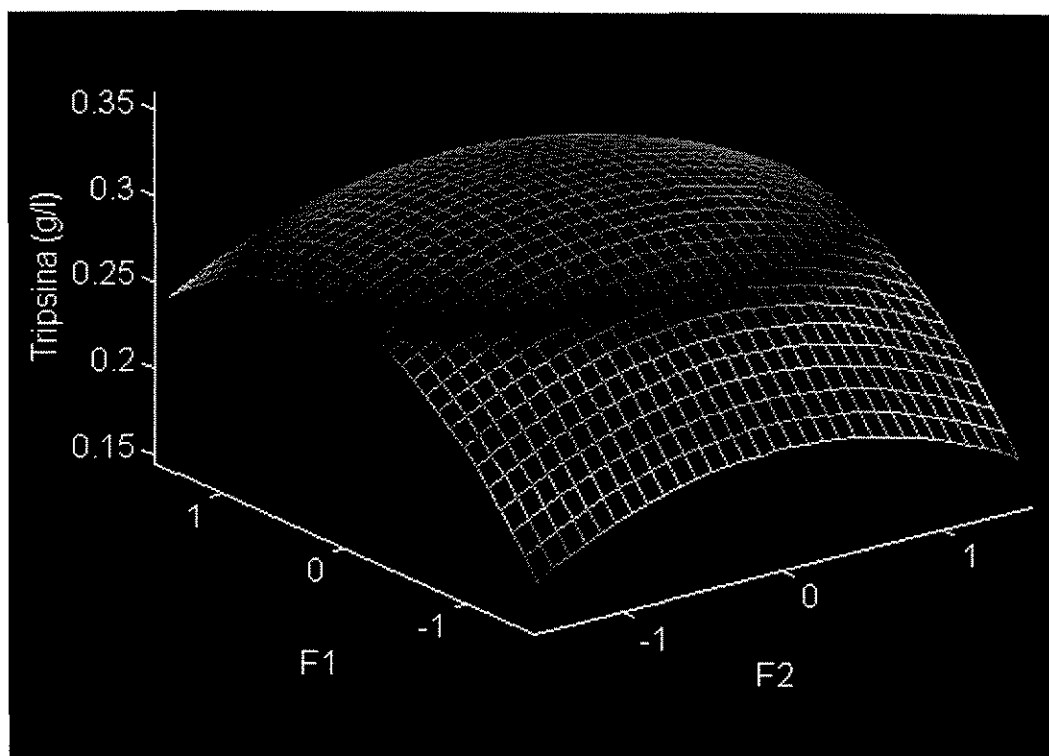
Entretanto, para as mesmas condições à exceção da adição de 125 μl de álcool isopropílico à fase orgânica na fase de re-extração, obteve-se a média de 0.26 (g/l) de dois valores idênticos de leitura de absorvância, com média de atividade de 0.30 (g/l).

A aproximação obtida apesar de correlacionar-se bem para a região em estudo demonstrou pouca precisão para extrapolação.

Os softwares Grapher® r1.28 e MATLAB® utilizados neste trabalho são cópias licenciadas para a UNICAMP. Os demais programas – FATORIAL.EXE,

MODREG.EXE e PLOT.EXE são parte integrante de Bruns *et al.* (1996), sendo de domínio público.

FIGURA 4.2 Superfície de resposta: Concentração de proteína na re-extração *versus* F1 *versus* F2



5. Conclusões

5. CONCLUSÕES

Mais uma vez comprovou-se que a partição de proteínas em sistemas de micelas reversas formadas por sistemas AOT-Água-Isooctano é possível. Entretanto, mesmo os resultados mais promissores de transferência de massa ficam deixando um pouco a desejar se comparados com o mesmo sistema em condições operacionais semelhantes reportados previamente na literatura; cujos resultados orbitam na faixa de 60 à 90% em sua grande maioria.

Todavia o fato de que a melhor condição não ultrapassa a marca de 16% de partição, e, em média, para uma ampla faixa de operação espera-se em torno de 13.7% não deve ser de todo desencorajador; deve-se levar em conta que o processo pode ter operacionalidade em contínuo e que estes valores são compatíveis com muitos outros processos, tais como a cromatografia.

O mesmo cuidado aplica-se à análise da atividade; se for somente observada a média dos 64 experimentos que cobrem a ampla faixa de triagem chega-se a conclusão de que a manutenção de 5.75% não validaria o sistema. Para poder cobrir uma extensa região de operação na fase de caracterização, muitos dos pontos estudados apresentavam condições agressivas à proteína. Se for tomada por base a região próxima ao ótimo na mesma fase de triagem (pontos 33 à 48), tem-se por média em torno de 12% de atividade para 15.5% de transferência; ou seja 77% de retenção de atividade catalítica.

Também em contradição à literatura previamente reportada; o uso de álcool isopropílico na re-extração não demonstrou ser uma operação eficaz frente aos resultados obtidos pelo processo clássico. Estranhamente a

atividade foi elevada acima da concentração em todos os experimentos efetuados; provavelmente por uma combinação do álcool que eventualmente dissolve-se na fase aquosa com o corante azo.

A investigação da influência de outras variáveis do sistema como pH, concentração de sal, etc. tanto na fase de extração ou re-extração deve ser efetuada mantendo-se as razões entre fases constantes, tempo e modo de contatação constantes, pois estes fatores tem influência muito mais determinante na transferência de massa.

O ideal para tal estudo de refinamento seria a operação com reduzida diferença de níveis para razão entre fases e contatação, para que o método mantenha seu caráter de ampla cobertura de influência de variáveis. Neste trabalho porém, como o objetivo versava mais servir como base para interesses de engenharia, o processo de transferência de massa e seu ótimo tinham que ser visualizados como um todo.

A aplicação de métodos estatísticos para estudo do sistema é perfeita; a modelagem apresentou ótima correlação, com desvios mínimos entre os valores previstos e obtidos experimentalmente.

Uma outra vantagem em destaque da análise por superfície de resposta é a rapidez com a qual se obtém os modelos. Esta vantagem compensa a incapacidade de extrapolação dos modelos obtidos para outra faixa de valores que não a geradora do mesmo e o problema da investigação de máximos locais.

6.Sugestões Para Trabalhos Futuros

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como propostas para dar continuidade ou complementar este estudo, pode-se citar:

- O modelo ou a metodologia poderia ser testado em uma coluna contínua de extração líquido-líquido, para obtenção de dados mais próximos a uma condição operacional industrial e para fins de scale-up de processo.
- Uma análise mais detalhada da proteína re-extraída, tal como a eletroforese em gel traria maiores informações sobre a seletividade do sistema.
- Uma análise mais acurada da influência das demais variáveis, tais como concentração e tipo de sal, pH, etc. visando refinar esta informação em detrimento das variáveis de maior impacto na transferência de massa, como a razão entre fases conforme descrito no capítulo cinco.
- Um estudo de protocolo completo para purificação da tripsina; lixiviando-se o pâncreas suíno, efetuando a extração líquido-líquido seguida pela cromatografia e liofilização da proteína.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albery, W. J.; Choudhery, R. A.; Atay, N. Z. e Robinson, B. H. "Rotating diffusion cell studies of microemulsion kinetics" *J. Chem. Society Faraday Trans.*, v. 183, pp 2407-2419, 1987
- Asgeirsson, B.; Fox, J.W.; Bjarnason, J.B.; *Eur. J. Biochem.*, n.180, pp 85-94, 1989
- Alves, J.R.S.; Fonseca, L.P.; Ramalho, L.T.; Cabral, J.M.S. "Separation and purification of penicillin acylase from *Escherichia Coli* using AOT reverse micelles" *Biotech. Techn.*, v. 9, n. 4, pp 265-270, 1995
- Bailey J.E., Ollis D.F.; *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Co., Singapore, 1986
- Bompensieri, S.; Mahler, G.F.; Castaneda, N.; Miranda, M.V.; Cascone, O.; Nudel, B.C. "Rapid purification of a lipase from *Acinetobacter calcoaceticus* by temperature-induced aqueous two-phase systems" *Biotechnology Techniques*, n.12, pp 611-613, 1998
- Bordi, F.; Cametti, C. "Water droplet charging process in water-in-oil microemulsions: an electrical conductivity study" *Colloid and Polymer Science*, n. 276, pp 1044-1049, 1998
- Box, G. E. P.; Hunter, W. G. e Hunter, J. S.; *Statistics for experimenters: An introduction to design, data analysis and model building*, Nova York, Wiley, 1978.

- Brandani, V.; Brandani, S.; Giacomo, G.; Spera, L. "A Thermodynamic model for protein partitioning in reversed micellar systems" *Cehm. Eng. Sci.*, v49, n 21, pp 3681-3684, 1994
- Bruns, R. E.; Barros-Neto, B. e Scarminio, I. S. *Planejamento e otimização de experimentos*, Editora da Unicamp, Campinas, 1996.
- Carlson, A.; Nagarajan, R.; "Release and Recovery of porcine pepsin and bovine chymosin from reverse micelles: a new technique based on isopropyl alcohol addition" *Biotech. Progress*, v.8, pp 85-90; 1992
- Carneiro-da-Cunha, M. G.; Tambourgi, E. B.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. "Recovery of a recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc contactor"; *Biotechnol. Tech.*, v.8, 1994
- Castro, M. J. M. e Cabral, J. M. S. "Reversed micelles in biotechnological processes", *Biotech. Adv.*, v.6, pp 151-167, 1988
- Chang, P. S. e Rhee, J. S. "Characteristics of *Chromobacterium viscosum* lipase-characterized glycerolysis of triglycerides in AOT-Isooctane reversed micelles" *Biocatalysis*, n.4, pp 253-335, 1990
- Chang, Q.; Chen, J. "Reversed micellar extraction of trypsin: effect of solvent on the protein transfer and activity recovery" *Biotech. Bioeng.*, v.46, pp 172-174, 1995
- Chang, Q. ; Liu, H. e Chen, J. "Extraction of lysozyme, α -chymotrypsin and pepsin into reverse micelles formed using an anionic surfactant, isooctane and water", *Enzyme Microb. Technol.*, n.16, pp 970-973, 1994

- Creagh, A.L.; Prausnitz, J.M.; Blanch, H. W. "Structural and catalytic properties of enzymes in reverse micelles", *Enzyme Microb. Technol.*, n.5, pp 383-392, 1993
- Dahuron, L.; Cussler, E. L. "Protein extractions with hollow fibers" *AIChE Journal*, v34, pp 130-136, 1988
- Dekker, M.; Van't Riet, K.; Baltussen, J. W. A.; Bisjsterboch, B. H. e Laane, C. "Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reversed micelles", *Chem. Eng. Journal*, 33, B27-B33, 1986
- Dekker, M.; Van't Riet, K.; Bijsterbosch, B.H.; Wolbert, R.B.G.; Hilhorst, R. "Modeling and optimization of the reversed micellar extraction of α -amylase" *AIChE Journal*, v.35, n2, pp 312-324, 1989
- Deutscher, M.P.; *Methods in Enzymology*, v. 182, Academic Press, San Diego, 1992
- Dungan, S. R.; Bausch, T.; Hatton, T. A.; Plucinski, P. e Nitsch, W. "Interfacial transport processes in the reversed micellar extraction of proteins" *J. Colloid Interface Sci.*, v.145, pp 33-50, 1991
- Giovenco, S.; Verheggen, F.; Laane, C. "Purification of intracellular enzymes from whole bacterial cells using reverse micelles" *Enzyme Microb. Technol.*, vol.9, pp470-473, 1987
- Godfrey, T.; West, S.; *Industrial Enzymology*, Macmillan Press, New York, 1996

- Göklen, K. E. e Hatton, T. A. "Protein extraction using reverse micelles", *Biotechnol. Prog.*, n.1, pp 69-74, 1985
- Göklen, K. E. e Hatton, T. A. "Líquid-líquid extraction of protein using reverse micelles" *In: Proceedings, ISEC'86*, Munich, v.3, pp 587-595, 1986
- Göklen, K. E. e Hatton, T. A. "Líquid-líquid extraction of low molecular weight proteins by selective solubilization in reversed micelles", *Separation Sci. Technol.*, v.22, pp 831-841 1987
- Guyton, A.; *Tratado de fisiologia médica*, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992
- Han, D. e Rhee, J. S. "Characteristics of lipase catalysed hidrolysis of olive oil in AOT-Isooctane reverse micelles" *Biotechnol. Bioeng.*, v.28, pp 1250-1256, 1986
- Hatton, T. A. "Extraction of proteins and amino acids using reversed micelles" *In: Ordered media in chemical separations ACS Symp. Series*, v. 342, pp 170-183, Hinze, W. L. e Armstrong, D. W. (Eds.), 1987
- Hentsch, M.; Warnery, P.; Renken, A; Flaschel, E.; "Study of the simultaneous partitioning of proteins and surfactant in reverse micellar two-phase systems – potential impact on purification efficiency" *Bioseparation*, n.6, pp 67-76, 1996
- Kennedy, J. F.; Cabral, J. M. S.; *Recovery processes for biological materials*, J.Wiley, London, 1993

- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K. e Veeger, C. "Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents" *Biotech. Bioeng.*, v.30, pp 81-87, 1987
- Lehninger, A. L.; *Princípios de Bioquímica vol.1*, Ed. Sarvier, Rio de Janeiro, 1970
- Leser, M. E.; Wei, G.; Luisi, L. P. e Maestro, M. "Application of reverse micelles for the extraction of proteins" *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 153, pp 629-635, 1992
- Leser, M.E.; Mrkoci, K.; Luisi, P.L. "Reverse micelles in protein separation: the use of. silica forthe back transfer process" *Biotech. Bioeng.*, v.41, pp 489-482, 1993
- Liu, D.J.; Ma, J.M.; Cheng, H.M.; Zhao, Z.G. "Investigation on the conductivity and microstructure of AOT non-ionic surfactants water n-heptane mixed reverse micelles" *Colloids and Surfaces*, n.135, pp 157-164, 1998
- Luisi, P. L.; Henninger, F.; Joppich, M.; Dossena, A. e Casnati, G. "Solubilization and spectroscopic properties of α -chymotripsyn in cyclohexane" *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 74, pp1384-1389, 1977
- Luisi, P. L.; Bonner, F. J.; Pellegrini, A. ; Wiget, P. e Wolf, R. "Micellar solubilization of proteins in aprotic solvents and their spectroscopic characterization" *Helv. Chim. Acta*, v 62, pp 740-752, 1979
- Luisi, P. L. e Magid, L. J. "Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions" *CRC Crit. Rev. Biochem.*, v.20, pp 409-474, 1986

- Luisi, P. L.; Giomani, M.; Pileni, M. P. e Robinson, P. H. "Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules" *Biochim. Biophys. Acta*, v. 947, pp209-246, 1988
- Lundgren, J.S.; Watkins, A.N.; Bright, F.V.; "Effects of water loading on the fluorescein/anti-fluorescein antibody system in aerosol-OT reverse micelles formed n-heptane" *Applied Spectroscopy*, n. 52, pp 96-100, 1998
- Mandal, D.; Datta, A.; Pal, S.K.; Bhattacharyya, K.; "Solvation dynamics of 4-aminophthalimide in water-in-oil microemulsion of Triton X-100 in mixed solvents" *Journal of Phys. Chem. B.*, v.45, n.102, pp 9070-9073, 1998
- Marcozzi, G.; Correa, N.; Luisi, P. L.; Caselli, M. "Protein extracion by reversed micelles: a study of the factors affecting the forward and backward transfer of α -chymotrypsin and its activity" *Biotech. Bioeng.*, v.38, pp 1239-1246, 1991
- Martinek, K.; Levashov, A. V.; Klyachko, N. L. e Berezin, L. V. "Catalysis by Water soluble enzymes in organic solvents. Stabilization of enzymes against desnaturacion (inactivation) trough their inclusion in reversed micelles of surfactants" *Doklad. Akad. Nauk. SSSR (Engl. Edit.)*, v. 236, pp 920-923, 1978
- Martinek, K.; Levashov, A.V., Klyachko, N.; Khmelnitsky, Y. L. e Berezin, L. V. "Micellar enzymology" *Eur.J.Biochem*, v.155, pp 453-468, 1986
- Martinek, K.; Klyachko, N.L.; Kabanov, A. V.; Khmelnitsky, Y. L. e Levashov, A. V. "Micellar enzymology: its relation to membranology" *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 981, pp 161-172, 1989

Matzke, S.F.; Creagh, A L.; Haynes, A C.; Prausnitz, J. M.; Blanch, H.W. "Mechanisms of protein solubilization in reverse micelles", *Biotech. Bioeng.*, v.40, pp 91-102, 1992

Nishiki, T.; Sato, I.; Kataoka, T. "Partitioning behavior and enrichment of proteins with reversed micellar extraction: I. Forward extraction of proteins from aqueous to reversed micellar phase" *Biotech. Bioeng.*, v.42, pp 596-600, 1993

Nishiki, T.; Muto, A.; Kataoka, T.; Kato, D. "Back extraction of proteins from reversed micellar to aqueous phase: partitioning behaviour and enrichment" *Chemical Engineering Journal and Biochemical Engineering Journal*, v. 59, pp 297-301, 1995

Nitin, W.F.; Luisi, P.L. "Immobilized enzymes in reverse micelles: studies with gel entrapped trypsin and α -chymotrypsin AOT reverse micelles" *Biotech. Bioeng.*, v.33, pp 1277-1282, 1989

Oliveira, A.C.; Rosa, M.F.; Cabral, J.M.S.; Aires-Barros, M.R. "Improvement of alcoholic fermentations by simultaneous extraction and enzymatic esterification of ethanol" *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, n. 5, pp 29-33, 1998

Paradkar, V. M. e Dordick, J. S. "Mechanisms of extraction of chymotrypsin into isooctane at very low concentrations of Aerosol-OT in absence or reverse micelles" *Biotech. Bioeng.*, v. 43, pp 529-540 1994

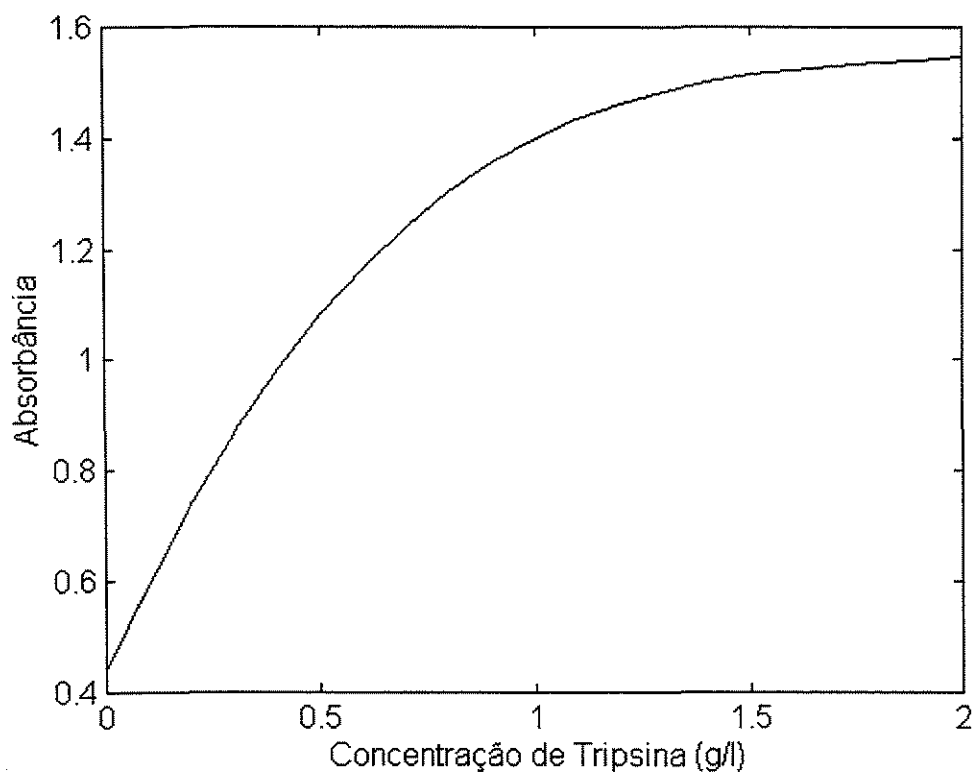
- Pyle, D.L.; Regalado, C.; Asenjo, J.A.; Trinca, L.A.; Gilmour, D. "Protein extraction by reverse micelles: horseradish peroxidase recovery maximization by surface response methodology and denaturation studies" *Food and Bioproducts Processing*, v. 72, pp 123-134, 1994
- Regalado, C.; Asenjo, J. A; Pyle, D. L. "Protein extraction by reverse micelles: studies on the recovery of horseradish peroxidase", *Biotech. Bioeng.*, v. 44, pp 674-681, 1994
- Ruckenstein, E.; Karpe, P. "On the enzymatic superactivity in ionic reverse micelles" *Journal of Colloid and Interface Sci.*, v. 139, n. 2, pp 408-436, 1990
- Ruckenstein, E. e Karpe, P. "Structural characterization of α -chymotrypsin containing AOT reversed micelles" *Journal of Phys. Chem.*, v.95, pp 1799-1811, 1991
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G. T.; Malia, A. K.; Garner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, C. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. e Klenk, D. C. "Measurement of protein using bicinchoninic acid" *Anal. Biochem.*, v.150, pp 76-85, 1985
- Stilbs, P.; Lindman, B. "Aerosol-OT aggregation in water and hydrocarbon solution from NMR self diffusion measurements" *Journal of Colloid Interface Science*, n.99, pp 290-293, 1984
- Volpe, P. L. O.; Silva-Filho, E. A. "Calorimetric study of. SDS micelle formation in water and in NaCl solution at 298 K" *Termochimica Acta*, n.257, pp 59-66, 1995

Vlachy, V.; Blanch, H.W.; Prausnitz, J.M. "Liquid-liquid phase separations in aqueous solutions of globular proteins" *AIChE Journal*, v.39, n. 2, pp 215-223

Walter, H.; Johansson,G.; *Methods in Enzymology*, v.228, Academic Press, San Diego, 1994

8. Anexos

ANEXO A Leitura da absorbância *versus* Concentração de proteína



ANEXO B Absorbância *versus* atividade

