

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SISTEMAS DE PROCESSOS
QUÍMICOS E INFORMÁTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

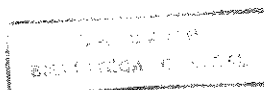
***EXTRAÇÃO DE TRIPSINA NUMA MICRO-
COLUNA AGITADA POR CAMPÂNULAS
PULSADAS***

Autora: Joseane Rodrigues Moro

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Abril - 1999

Campinas - SP - Brasil



9915163

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.º	
CONSL. Nº	38322
PROG.	229/99
O	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/08/99
N.º CPD	

CM-00125548-5

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

M828e

Moro, Joseane Rodrigues

Extração de tripsina numa micro-coluna agitada por
campânulas pulsadas. / Joseane Rodrigues Moro.—
Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Elias Basile Tambourgi

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

1. Tripsina. 2. Extração por solventes. 3. Micelas.
4. Solventes orgânicos. 5. Colunas. I. Tambourgi, Elias
Basile. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

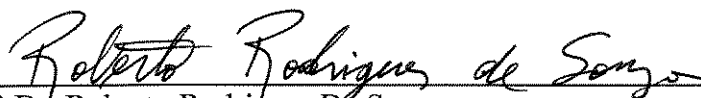
Dissertação de mestrado defendida e aprovada, em 28 de abril de 1999, pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

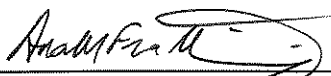
DESQ - FEQ - UNICAMP

Orientador



Prof. Dr. Roberto Rodrigues De Souza

Universidade Federal de Sergipe



Profª Drª Ana Maria Frattini Fileti

UNICAMP

Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Eng.(a) Joseane Rodrigues Moro e aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de abril de 1999.



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Elias Basile Tambourgi, pela amizade e orientação.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro, em forma de bolsa.

A Ana Paula, Eliana, Dorival, Arlan, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus pais Ernestina e João Alvir pela confiança, dedicação e carinho.

Especialmente ao Fernando pela correção, paciência, e pelo seu amor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1.0 - INTRODUÇÃO	1
2.0 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1- ASPECTOS GERAIS DE PROTEÍNAS	3
2.1.1- PROTEÍNAS	3
2.1.2- A COMPOSIÇÃO DAS PROTEÍNAS	3
2.1.3- A CONFORMAÇÃO DAS PROTEÍNAS	5
2.1.4- ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS	6
2.1.5- DESNATURAÇÃO	7
2.1.6- ENZIMAS	8
2.1.7- PROPRIEDADES GERAIS DAS ENZIMAS	9
2.1.8- CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA	10
2.1.9- ESPECIFICIDADE ENZIMÁTICA	10
2.1.10- EFICIÊNCIA CATALÍTICA	12
2.1.11- TRIPSINA	13
2.2- SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	14
2.2.1- DIÁLISE	15
2.2.2- FILTRAÇÃO EM GEL	16
2.2.3- ELETROFORESE	16
2.2.4- CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	17
2.2.5- EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	18
2.2.6- EQUIPAMENTOS PARA A EXTRAÇÃO LÍQUIDO- LÍQUIDO	21

2.3- EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM MICELAS REVERSAS	24
2.3.1- MICELAS	27
2.3.2- TIPOS DE TENSOATIVOS	30
2.3.3- SOLVENTE ORGÂNICO	33
2.3.4- SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	34
2.3.5- FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS POR MICELAS REVERSAS	37
2.3.5.1- EFEITO DO pH	37
2.3.5.2- EFEITO DA FORÇA IÔNICA	39
2.3.5.3- EFEITO DO SAL	40
2.3.5.4- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO	42
2.3.5.5- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	43
2.4- REEXTRAÇÃO	44
3.0- MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1- REAGENTES	46
3.2- PROTEÍNAS	46
3.3- TAMPÃO	47
3.4- TENSOATIVO	47
3.5- SAL	48
3.6- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (MÉTODO BCA)	48
3.7- DETERMINAÇÃO DA CONDUTIVIDADE	49
3.8- EXTRAÇÃO DESCONTÍNUA LÍQUIDO-LÍQUIDO DE TRIPSINA POR MICELAS REVERSAS (BATELADA)	50
3.9- EXTRAÇÃO CONTÍNUA LÍQUIDO-LÍQUIDO DE TRIPSINA POR MICELAS REVERSAS	51
3.10- REEXTRAÇÃO DESCONTÍNUA E CONTÍNUA	54

3.11- CÁLCULO DA EXTRAÇÃO E REEXTRAÇÃO	54
3.12- CÁLCULO DO “HOLD-UP”	55
4.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1- EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM BATELADA	57
4.1.1- PARÂMETROS EXPERIMENTAIS	58
4.1.2- EFEITO DO pH	60
4.1.3- EFEITO DA FORÇA IÔNICA	63
4.1.4- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AOT	66
4.2- REEXTRAÇÃO	69
4.3- EXTRAÇÃO CONTÍNUA	70
4.3.1- REEXTRAÇÃO	76
4.3.2- EXTRAÇÃO CONTÍNUA COM “BY PASS”	80
4.3.3- REEXTRAÇÃO CONTÍNUA COM “BY PASS”	85
4.4- EFEITO DA VELOCIDADE DE PULSAÇÃO SOB A FRAÇÃO RETIDA DA FASE DISPERSA (FASE ORGÂNICA) “HOLD UP”	88
5.0- CONCLUSÃO	91
6.0- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Estrutura geral dos aminoácidos	5
Figura 2.2	O centro ativo da enzima tem estrutura espacial específica: a ligação com o substrato ajusta a conformação enzimática, tornando-a ideal para a catálise.	11
Figura 2.3	Diálise	15
Figura 2.4	Filtração em gel	16
Figura 2.5	Eletroforese	17
Figura 2.6	Cromatografia de afinidade	18
Figura 2.7	Misturadores - Decantadores	22
Figura 2.8	Representação esquemática da estrutura micelar	
	a) molécula do agente tensoativo	
	b) monocamada de agente tensoativo	
	c) dupla camada de agente tensoativo	
	d) micelas reversas (em solvente apolar)	
	e) micela normal (em solvente polar)	28
Figura 2.9	Diagrama de fases típico para o sistema AOT/água/isooctano	29
Figura 2.10	Esquema de uma molécula de tensoativo	30
Figura 2.11	Aerossol OT	31
Figura 2.12	Representação esquemática de uma micela reversa contendo	
	a) proteína hidrofílica;	
	b) proteína ativa a nível de superfície;	
	c) proteína hidrofóbica;	36
Figura 2.13	Efeito da concentração de KCl na solubilização da ribonuclease A (+), citocromo C (●) e lisozima em soluções micelares de AOT em isooctano (■)	39

Figura 3.1 Extração descontínua da tripsina.

- a) adição da fase aquosa, com tripsina;
- b) agitação em vórtex por 1 minuto;
- c) separação das fases após 20 horas de decantação (estando a maior parte da tripsina na fase orgânica)
- d) retirada da fase orgânica, contendo micelas;
- e) aplicação do método BCA na fase aquosa.

51

53

Figura 3.2 Esquema da micro-coluna de campânulas pulsada

Figura 4.1 Efeito do pH na extração de tripsina (30 μ M) em micelas reversas, em solução orgânica de 50mM de AOT em isooctano, e soluções aquosas de 0.1M KCl; 0.1M tampão; 0.2M tampão.

60

Figura 4.2 Porcentagem de extração de tripsina (30 μ M) em relação às soluções aquosas de 0.1M tampão, 0.2M tampão, 0.1M de KCl.

64

Figura 4.3 Porcentagem de extração de tripsina em 50mM; 100mM; 150mM de AOT em isooctano em pH's 5.7; 6.0; 6.5; 7.0.

67

Figura 4.4 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna.

72

Figura 4.5 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), em relação ao tempo de operação da coluna.

73

Figura 4.6 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 0.20 pulso/segundo (Pulso 1/5), em relação ao tempo de operação da coluna.

74

Figura 4.7 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), em relação ao tempo de operação da coluna.

74

- Figura 4.8** Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulsos: 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna. 75
- Figura 4.9** Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna. 76
- Figura 4.10** Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), em relação ao tempo de operação da coluna. 77
- Figura 4.11** Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), em relação ao tempo de operação da coluna. 78
- Figura 4.12** Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), em relação ao tempo de operação da coluna. 79
- Figura 4.13** Porcentagem de extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna. 80
- Figura 4.14** Porcentagem de extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), em relação ao tempo de operação da coluna. 81

- Figura 4.15** Porcentagem de extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), em relação ao tempo de operação da coluna. 82
- Figura 4.16** Porcentagem de extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), em relação ao tempo de operação da coluna 83
- Figura 4.17** Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulsos: 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna. 84
- Figura 4.18** Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna. 85
- Figura 4.19** Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), em relação ao tempo de operação da coluna. 86
- Figura 4.20** Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), em relação ao tempo de operação da coluna. 86
- Figura 4.21** Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), em relação ao tempo de operação da coluna. 87

- Figura 4.22** Fração retida da fase orgânica “Hold up” em relação à frequência de pulsação. 89
- Figura 4.23** Fração retida da fase orgânica “Hold up” em relação à frequência de pulsação, com a utilização de “by pass”. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Abreviações dos Aminoácidos	4
Tabela 2.2 Reações catalisadas por diferentes classes de enzimas	10
Tabela 2.3 Pesos moleculares aproximados de enzimas e de seus substratos	11
Tabela 2.4 pH ótimo de algumas enzimas	13
Tabela 2.5 Ponto isoelétrico de algumas proteínas	15
Tabela 3.1 Reagentes utilizados nos métodos analíticos	46
Tabela 4.1 Resultados da extração de tripsina em micelas reversas em batelada.	59
Tabela 4.2 Porcentagem de extração de tripsina em micelas reversas em diferentes pH's e soluções aquosas.	60
Tabela 4.3 Soluções aquosas 0.1M tampão, 0.2M tampão, 0.1M de KCl; com 30 μ M de tripsina em pH 6.0, em sistema de extração com 50mM de AOT em isooctano.	63
Tabela 4.4 Condutividade, em mS/cm, das soluções aquosas de 0.1M tampão, 0.2M tampão, 0.1M de KCl, em pH's 5.7, 6.0, 6.5, 7.0.	64
Tabela 4.5 Efeito da concentração de AOT na extração de tripsina (30 μ M) em micelas reversas em vários pH's: 5.7; 6.0; 6.5; 7.0 em solução 0,1M tampão fosfato.	66
Tabela 4.6 Dados da fração retida da fase orgânica (Hold up) na micro-coluna de campânulas pulsadas.	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AOT	Diocilsulfosuccinato de sódio
CMC	Concentração micelar crítica
Fig.	Figura
min.	Minutos
pH	Potencial hidrogeniônico ($-\log [\text{H}_3\text{O}^+]$)
pI	Ponto isoeletrico
PRDC	Coluna de discos rotativos perfurados
Wo	Razão molar das concentrações de água e tensoativo
PEG	Polietileno Glicol

RESUMO

A viabilidade da produção e comercialização de substâncias obtidas por meio de processos biotecnológicos depende das técnicas de separação empregadas na purificação dos compostos desejados. Algumas características das misturas envolvidas nesses processos, tais quais baixa concentração inicial, necessidade de produtos de alto grau de pureza, sensibilidade térmica e necessidade de preservar as propriedades dos compostos, fazem com que a etapa de purificação exija um processo econômico e que seja biologicamente compatível com os produtos envolvidos. Neste sentido, a extração líquido-líquido por micelas reversas se apresenta como uma técnica de separação extremamente interessante.

Tendo-se em vista o desenvolvimento de extratores mais eficientes, é fundamental o estudo da hidrodinâmica e dos mecanismos de transferência de massa no interior dos extratores.

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo de uma micro-coluna agitada por campânulas perfuradas pulsadas que foi usada para extração de proteína. O sistema de agitação formado pelas campânulas pulsadas tem como objetivo promover uma melhor mistura dos líquidos no interior da coluna e assim, aumentar a transferência de massa. O sistema de extração foi formado por proteína modelo (tripsina - que se encontra em meio aquoso), e dioctilsulfossuccinato de sódio (AOT) em isooctano, que formam um sistema de micelas reversas. A primeira parte deste trabalho foi realizada em tubos de ensaio para encontrar os parâmetros ótimos das soluções envolvidas, como pH ótimo, força iônica e concentração de AOT, para operação da coluna. A segunda parte do trabalho consistiu na utilização destas condições ótimas na coluna, em regime de operação contínua, estudando as variáveis como frequência de pulsações, vazões de alimentação da fase orgânica, e reextração.

Pode-se concluir que a coluna de extração testada teve um rendimento superior de proteína extraída que os encontrados nos tubos de ensaio, e é adequada para a utilização em sistemas biotecnológicos.

ABSTRACT

The production and commercialization suitability of substances obtained by means of biotechnological processes depend on the separation techniques used for the purification of the desired compounds. Some features of the mixtures involved in these processes, such as low initial concentration, high purity level products desired, thermal sensitivity and the need of preserving the compounds' properties, require a purification step that must be economical and biologically compatible with the chemicals involved. As a matter of fact, liquid-liquid extraction by reversed micelles is presented as an outstanding separation technique.

The hydrodynamics and the mass transfer mechanism in the interior of the extractors are fundamental for the development of more efficient equipment.

The main goal of this work was the study of a micro-column stirred by bell-shaped meshes for the extraction of a protein. The stirring system composed by the bell-shaped meshes promotes a better mixture of the fluids in the inner side of the column and, as a result, increase the mass transfer. The extraction system was composed of a model protein (trypsin, which is in aqueous medium), and sodium dioctylsulfosuccinate (AOT) dissolved in iso-octane, that is a reversed micellar system. The first part of this work was conducted in sampling tubes to find the optimum parameters of the chemical solutions involved, such as pH, ionic strength and AOT concentration, for the column operation. The second part was based on the use of these optimum criteria in the column, as a continuous process, in which variables such as pulsating frequencies, organic feed rate and backward extraction were studied.

As a conclusion, the extraction apparatus tested here had a much better yield of protein recovery than the observed in the batch system, what makes it suitable for use in biotechnological systems.

1. INTRODUÇÃO

Devido à modernização dos processos industriais e à necessidade de se obterem produtos de melhor qualidade e mais vantajosos economicamente, existe uma grande procura por tecnologias alternativas que sejam econômica e tecnicamente mais viáveis que as técnicas convencionais. Neste sentido, a extração líquido-líquido aplicada à biotecnologia é um campo tecnológico extremamente interessante.

A utilização da extração líquido-líquido para a recuperação de proteínas usando micelas reversas tem recebido atenção crescente desde que se mostrou que as proteínas podem ser solubilizadas em solventes orgânicos com surfactantes, mantendo-se suas propriedades funcionais, ao serem transferidas de uma solução aquosa para uma fase orgânica contendo micelas reversas.

Diversos estudos são apresentados na literatura com diversas geometrias de coluna e condições operacionais, mostrando-se adequado para presente trabalho.

A técnica de separação de proteína por micelas reversas utilizando uma coluna de extração líquido-líquido foi descrita por Carneiro da Cunha (1995), que empregou uma coluna de disco rotativo perfurado na extração de uma cutinase recombinante com uma fase micelar de AOT em isooctano. O rendimento obtido foi de 54,5% na extração da proteína na presença de fragmentos celulares.

Tong e Furusaki (1995) estudaram um contator de disco rotativo de 38 mm de diâmetro, na extração e purificação de proteínas e outras moléculas usando sistemas de micelas reversas, utilizando o diâmetro médio de gota e a distribuição de diâmetro de gotas de uma fase micelar reversa dispersa .

Lye *et al.* (1996) verificaram a cinética de particionamento de proteínas para extração semicontínua de lisozima em uma coluna “spray” em escala de laboratório. A fase orgânica, de

isooctano, formada por micelas reversas de surfactante aniônico, AOT, foi utilizada para a extração da proteína na fase aquosa. Os experimentos foram realizados em uma faixa de taxas de fluxo da fase dispersa para os casos de dispersão da fase orgânica ou aquosa. Demonstraram que a extração de proteína utilizando micelas reversas numa coluna “spray” pode ser empregada.

O desempenho da transferência de massa e a modelagem matemática da extração por micelas reversas de lisozima foi investigada em um contator em disco rotativo (RDC) por Tong e Furusaki (1997). O modelo foi resolvido numericamente mudando-se os parâmetros para se ajustarem aos perfis de concentração bifásicos e os coeficientes de transferência de massa global baseados na fase contínua no RDC.

Rabelo *et al.* (1998) utilizaram uma coluna de campânulas pulsadas para a extração do citocromo b5 num sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato de potássio, obtendo uma extração máxima de 80% e uma extração em torno de 70% no estado estacionário, na frequência de pulsação 1 pulso/segundo.

Este trabalho vem aplicar o sistema de micelas reversas como uma técnica de bioseparação para isolamento e purificação de uma proteína, verificando parâmetros que afetam a solubilização da proteína em micelas reversas, tanto na extração como reextração no regime em batelada.

A partir dos parâmetros ótimos de extração da proteína em micelas reversas em batelada, utilizamos estes dados para a extração contínua numa micro-coluna agitada por campânulas pulsadas, verificando assim a viabilidade desta coluna na separação e purificação de proteínas como método alternativo e eficaz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DE PROTEÍNAS

2.1.1 PROTEÍNAS

Berzelius cunhou a palavra proteína em 1838, para salientar a importância dessa classe de moléculas. Proteína vem do grego *Proteios*, que significa “o que vem em primeiro lugar”, sendo responsáveis pelo funcionamento das funções vitais dos organismos animais, nos quais são alguns dos principais constituintes.

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células e constituem 50% ou mais de seu peso seco. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada para uma função biológica diferente. Além disso, a maior parte da informação genética é expressa pelas proteínas.

2.1.2 A COMPOSIÇÃO DAS PROTEÍNAS

Muitas proteínas foram isoladas em forma cristalina pura. Todas contêm carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, e quase todas contêm elementos adicionais, particularmente fósforo, ferro, zinco e cobre. Os pesos moleculares das proteínas são extremamente elevados, porém, por hidrólise ácida, as moléculas proteicas liberam uma série de compostos orgânicos simples de baixo peso molecular, os α -aminoácidos.

Existem 20 aminoácidos diferentes como mostrado na (Tabela 2.1). Todavia, as possibilidades de formar proteínas diferentes constituídas por esse número reduzido de monômeros são espantosamente grandes. Utilizando-se apenas um aminoácido de cada tipo, podem ser obtidas

$2,4 \times 10^{18}$ moléculas diferentes. Como as proteínas são compostas por centenas de aminoácidos e cada um deles podendo estar presente mais de uma vez, a probabilidade de construção de moléculas diferentes, é, naturalmente, muito maior.

Tabela 2.1 - Abreviações dos Aminoácidos

Aminoácido	Abreviação de três letras	Abreviação de uma letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Todos os vinte aminoácidos encontrados em proteínas têm em comum um grupo carboxila e um grupo amina, ligados ao mesmo átomo de carbono_α (Figura 2.1), ao qual também se liga um átomo de hidrogênio e um grupo variável chamado cadeia lateral ou grupo R:

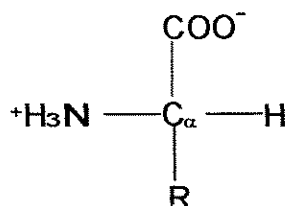


Figura 2.1 - Estrutura geral dos aminoácidos

As propriedades das cadeias laterais dos aminoácidos, as quais variam em estrutura, tamanho, carga elétrica e solubilidade em água, são importantes para a conformação das proteínas e, portanto, para sua função.

Nas moléculas de proteínas, os resíduos sucessivos de aminoácidos estão unidos entre si por ligações covalentes denominadas ligações peptídicas formando cadeias longas não ramificadas chamadas de polipeptídeos. Essas cadeias podem ter de 100 a várias centenas de unidades de aminoácidos ou resíduos. Entretanto, as proteínas não são meros polímeros casuais de vários comprimentos. Todas as moléculas de uma dada espécie de proteína são idênticas em composição, sequência e comprimento de sua cadeia polipeptídica.

Algumas proteínas possuem apenas uma cadeia polipeptídica, mas outras, chamadas proteínas oligoméricas, têm duas ou mais cadeias polipeptídicas. Por exemplo, a ribonuclease (que é a enzima que catalisa a hidrólise do ácido ribonucleico), tem uma cadeia polipeptídica simples, enquanto a hemoglobina (que é o pigmento transportador de oxigênio dos glóbulos vermelhos), tem quatro cadeias polipeptídicas.

2.1.3 A CONFORMAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Cada tipo de molécula protéica tem, em seu estado nativo, uma configuração tridimensional peculiar, designada conformação. Dependendo de sua conformação, as proteínas podem ser classificadas em duas classes principais, como segue:

As **proteínas fibrosas** são materiais insolúveis em água e soluções salinas diluídas e fisicamente resistentes. São constituídas de cadeias polipeptídicas dispostas paralelamente ao longo de um único eixo, formando longas fibras ou lâminas. As proteínas fibrosas são os elementos estruturais básicos do tecido conjuntivo dos animais superiores. São exemplos: o colágeno dos tendões e da matriz óssea, a α -queratina dos cabelos, chifres, pele, unha e penas, e a elastina do tecido conjuntivo elástico.

As **proteínas globulares** são solúveis em sistemas aquosos e se difundem rapidamente. Suas cadeias polipeptídicas são firmemente arranjadas em forma esférica ou globular compacta. As proteínas globulares usualmente tem uma função móvel e dinâmica. Quase todas as enzimas, por exemplo, são proteínas globulares, como o são as proteínas plasmáticas com função transportadora, como a soroalbumina e a hemoglobina.

2.1.4 ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS

Os termos específicos comumente usados para indicar os diferentes aspectos ou níveis da estrutura protéica serão definidos a seguir:

Estrutura primária: refere-se ao esqueleto covalente da cadeia polipeptídica e à sequência de seus resíduos de aminoácidos;

Estrutura secundária: refere-se ao arranjo regular, repetitivo no espaço da cadeia polipeptídica ao longo de uma dimensão. A estrutura secundária é particularmente evidente nas proteínas fibrosas, em que as cadeias polipeptídicas apresentam uma conformação estendida ou espiralada longitudinal; ela ocorre também em segmentos das cadeias polipeptídicas nas proteínas globulares.

Estrutura terciária: refere-se à maneira pela qual a cadeia polipeptídica encurva-se ou dobra-se em três dimensões, formando a estrutura compacta firmemente enovelada das proteínas globulares.

Estrutura quaternária: indica a maneira pela qual as cadeias polipeptídicas individuais de uma proteína que possua duas ou mais cadeias dispostas em relação umas às outras. A maioria das grandes proteínas é formadas por duas ou mais cadeias polipeptídicas, geralmente sem ligações entre

elas. O termo conformação, mais geral, é usado para a combinação das estruturas secundária e terciária das proteínas.

2.1.5 DESNATURAÇÃO

Todas as moléculas de uma mesma proteína apresentam, em condições fisiológicas, a mesma conformação, que é denominada *nativa*. Esta é a conformação mais estável que a molécula pode assumir naquelas condições e reflete um equilíbrio delicado entre as interações ocorridas no interior da molécula protéica e entre esta e seu meio ambiente.

Ao se proceder ao isolamento e purificação de uma proteína, são introduzidas alterações físicas e químicas no seu meio ambiente, que podem afetar sua estrutura espacial a ponto de ocasionar a perda de sua função biológica. A proteína é dita, então, *desnaturada*. A desnaturação pode ser provocada por vários tipos de tratamentos. O aquecimento da proteína nativa provoca rompimento de ligações não-covalentes. Valores de pH muito baixos ou muito altos, afetando a ionização dos grupamentos da proteína conferem à molécula uma elevada carga positiva (ou negativa), ocasionando repulsão intramolecular, com exposição do interior hidrofóbico. A adição de solventes orgânicos polares (álcoois, por exemplo) ou de compostos com grandes capacidade de formar pontes de hidrogênio (uréia, por exemplo) determina a desnaturação da proteína, porque estes últimos agentes estabelecem pontes de hidrogênio com radicais da proteína, substituindo ligações que mantinham a estrutura nativa.

Os solventes orgânicos diminuem a solvatação dos radicais polares situados na superfície da proteína. A desnaturação também pode ser ocasionada por detergentes. Uma molécula típica de detergente é composta por uma cadeia longa apolar ligada a um grupo terminal carregado eletricamente. Estes agentes são desnaturantes porque a introdução de sua cauda hidrofóbica (apolar) no interior da proteína rompe interações hidrofóbicas.

Também ocorre desnaturação quando a agitação térmica faz com que a estrutura nativa enovelada sofra um desnovelamento ou desenrolamento. Passando a uma cadeia casualmente dobrada, a proteína perde sua atividade biológica. Ainda que cada tipo de proteína possua uma composição e uma seqüência fixas de aminoácidos durante a biossíntese, a seqüência de aminoácidos por si só não atribui diretamente a atividade ou função biológica específica da proteína. Entretanto a seqüência de aminoácidos determina, em última análise, a atividade biológica da proteína, uma vez que ela determina a conformação nativa, ou estado enovelado, da molécula protéica, através das interações das cadeias laterais dos aminoácidos, umas com as outras, com o solvente, e com os solutos presentes.

Retiradas das condições desnaturantes, muitas proteínas podem reassumir sua conformação nativa. A este processo se chama renaturação. A renaturação demonstra que a estrutura tridimensional (nativa) de uma proteína é uma consequência de sua estrutura primária. Para a maioria das proteínas, entretanto, a desnaturação é irreversível. Muitas delas, quando desnaturadas, tornam-se insolúveis. É o caso da albumina do ovo, quando aquecida, e da caseína, quando o leite é acidificado, por exemplo, através da ação bacteriana.

2.1.6 ENZIMAS

Grande parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre as enzimas. A atividade das enzimas foi reconhecida primeiramente em estudos antigos da digestão no estômago no período de 1780 a 1825. Mais tarde, Louis Pasteur deduziu que a fermentação do açúcar a álcool pela levedura é catalisada por “fermentos” ou enzimas. Em 1860 ele postulou que elas são inexplicavelmente ligadas à estrutura e à vida das células da levedura. Portanto, foi um grande momento na história da pesquisa enzimática quando, em 1897, E. Büchner conseguiu extrair das células de levedura as enzimas que catalisam a fermentação alcoólica.

Essa realização demonstrou que essas enzimas importantes que catalisam uma das principais vias metabólicas produtoras de energia podem funcionar independentemente da estrutura celular.

A primeira enzima isolada em forma pura, cristalina, foi a urease, isolada de extratos de feijão por J. B. Sumner em 1926. Sumner descobriu que os cristais consistiam de proteínas, e ele sugeriu, contrariamente às opiniões prevalecentes, que todas as enzimas são proteínas. Entretanto, sua opinião não foi aceita imediatamente, e foi só na década de 1930, quando J. Northrop isolou as enzimas digestivas pepsina, tripsina e quimotripsina em forma cristalina, que a natureza protéica das enzimas foi estabelecida firmemente.

Hoje, mais de 1.500 enzimas são conhecidas. Muitas foram isoladas em forma cristalina pura.

2.1.7 PROPRIEDADES GERAIS DAS ENZIMAS

As enzimas catalisam reações químicas que, de outra maneira, ocorreriam apenas em velocidades extremamente baixas. Elas não mudam o ponto de equilíbrio das reações que catalisam. Elas são verdadeiros catalisadores, porque não são consumidas ou alteradas permanentemente durante a reação. Desde que todas as enzimas conhecidas são proteínas, qualquer fator que pode prejudicar a estrutura nativa das proteínas também causa uma perda da atividade catalítica. Portanto, o aquecimento das enzimas, tratamento com ácidos ou bases fortes, ou a exposição a agentes desnaturantes, destrói sua atividade catalítica.

As enzimas têm pesos moleculares que variam de 12.000 a mais de 1 milhão. Algumas enzimas consistem apenas de uma ou mais cadeias polipeptídicas, mas outras contêm também algum outro componente químico necessário para a atividade, chamado cofator. O cofator pode ser um metal, tal como Mg, Mn, Zn ou Fe, ou uma molécula orgânica complexa, usualmente chamada de coenzima. Algumas enzimas requerem tanto um íon metálico como uma coenzima. Muitas vezes o cofator é ligado firmemente à parte protéica da enzima. Neste caso, o cofator é usualmente chamado de grupo protético. Geralmente os cofatores são estáveis quando expostos ao calor, enquanto que a parte protéica da enzima é lábil nas mesmas condições.

2.1.8 CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA

As enzimas são classificadas em seis grupos de acordo com o tipo de reação que catalisam (Tabela 2.2). Cada uma destas classes é ainda subdividida, de modo a identificar sem ambigüidade cada enzima. Esta nomenclatura oficial é, na prática, muitas vezes desobedecida em favor de nomes mais simples ou que se tornaram clássicos. Assim, por exemplo, a enzima que catalisa a remoção de elétrons do etanol (portanto, uma óxido-redutase) é comumente referida como álcool desidrogenase; a enzima que transfere um grupo fosfato do ATP para a glicose (uma transferase) é chamada glicoquinase. Mesmo nestes casos, os nomes são dados de forma a indicar o substrato e o tipo de reação, sempre com o sufixo *ase*. Ainda esta forma de identificação apresenta exceções, como é o caso das enzimas digestivas: pepsina, tripsina etc. Mas com um pouco de prática, é possível prever o nome da enzima conhecendo-se a reação que ela catalisa, ou vice-versa.

Tabela 2.2 - Reações catalisadas por diferentes classes de enzimas

Classe	Tipo de reação
óxido-redutases	óxido-redução
transferases	transferência de grupos ($A-X + B = A + B-X$)
hidrolases	hidrólise
liases	adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação
isomerases	isomerização
ligases	condensação de duas moléculas, associada à hidrólise de uma ligação de alta energia

2.1.9 ESPECIFICIDADE ENZIMÁTICA

Geralmente há uma grande diferença de tamanho entre as moléculas de enzimas e as de seus substratos (em uma reação enzimática, os reagentes são chamados substratos). As enzimas são macromoléculas protéicas - mesmo as mais simples são formadas de mais de uma centena de aminoácidos - e seus pesos moleculares variam de 10.000 a alguns milhões, enquanto o peso molecular dos substratos é muitas ordens de grandeza inferior, como se pode observar na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Pesos moleculares aproximados de enzimas e de seus substratos

Enzima	Substrato	Peso molecular aproximado
Catalase	H_2O_2	200.000
		34
Urease	Uréia	500.000
		60
Fosfofrutoquinase	frutose 6-fosfato	380.000
		300
Glutamina sintetase	glutamato	600.000
		150

Embora toda a molécula enzimática seja necessária para a reação catalítica, a ligação com o substrato se dá apenas em uma porção pequena e bem definida da enzima. Esta região à qual o substrato se liga é chamada centro ativo da enzima. O centro ativo é formado por alguns dos resíduos de aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica, trazidos à proximidade uns dos outros pelos dobramentos que constituem a estrutura terciária da proteína. O centro ativo, assim organizado, constitui uma cavidade com forma definida aberta sobre a superfície da molécula globular e permite à enzima “reconhecer” seu substrato. De fato, uma molécula, para ser aceita como substrato, deve ter grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com os radicais do centro ativo e a forma espacial adequada para se alojar no centro ativo, como na Figura 2.2. Na verdade, a aproximação e a ligação do substrato induz, na enzima, um ajuste conformacional que a torna ideal para a catálise.

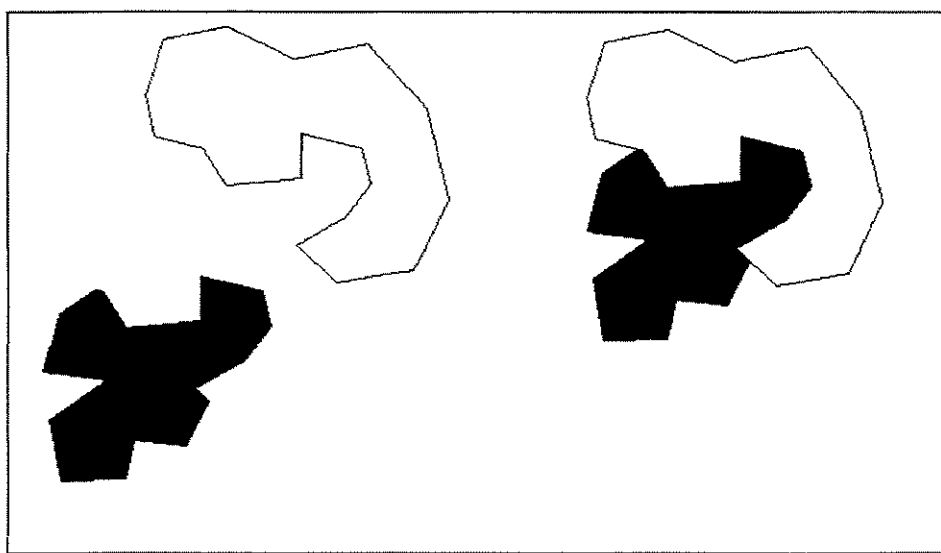


Figura 2.2 - O centro ativo da enzima tem estrutura espacial específica: a ligação com o substrato ajusta a conformação enzimática, tornando-a ideal para a catálise.

Como cada enzima possui uma organização estrutural específica, o seu centro ativo permite a ligação apenas do seu substrato, trazendo grande especificidade para a catálise enzimática. Esta especificidade, cujo grau varia entre as enzimas, é sempre maior do que a apresentada pelos catalisadores inorgânicos. Os íons H^+ , por exemplo, atuam como catalisadores de um grande número de reações, incluindo a hidrólise de proteínas, polissacarídeos e ésteres. As *enzimas proteolíticas*, ao contrário, são específicas para a hidrólise de proteínas, não atuando sobre carboidratos ou lipídios, para cujas hidrólises são requeridas enzimas próprias.

Entre as enzimas proteolíticas aparecem diferentes graus de especificidade: a *pepsina* hidrolisa ligações peptídicas das quais participam grupos carboxílicos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) e a *tripsina* reconhece apenas ligações peptídicas formadas por arginina ou lisina. Graus extremos de especificidade podem ser encontrados entre as L-aminoxidases, por exemplo. São enzimas capazes de reconhecer isômeros na configuração L, sendo inativas para aminoácidos na forma D.

2.1.10 EFICIÊNCIA CATALÍTICA

A estrutura e a forma do centro ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. Isto torna a atividade enzimática catalítica dependente do meio ambiente, notadamente do pH e temperatura.

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH, para o qual sua atividade é máxima; a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, que é característico para cada enzima mas, com frequência, está próximo do pH neutro. Na Tabela 2.4 são mostrados alguns exemplos de enzimas com o seu respectivo pH ótimo.

A influência do pH sobre a catálise enzimática pode ser melhor compreendida lembrando que as enzimas apresentam grupos tituláveis nos resíduos de histidina, arginina, lisina, glutamato,

aspartato, cisteína e tirosina. Alguns destes grupos podem fazer parte do centro ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. A cada valor de pH, alguns destes grupos apresentam-se protonados ou desprotonados.

Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Este *pH ótimo* depende, portanto, do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar sua carga. A eficiência da catálise dependerá, então, de se encontrarem enzima e substrato com conformação e carga adequadas para permitir sua interação.

Como ocorre com a maioria das reações químicas, a velocidade da reação enzimática, que, a 0°C, apresenta valores próximos de zero, é favorecida pela elevação da temperatura. O gradativo aumento da velocidade só se verifica enquanto a enzima conserva sua estrutura nativa. Acima de 50-55°C, a maioria das proteínas globulares - enzimas inclusive - são desnaturadas. A desnaturação provoca drásticas alterações conformacionais na molécula, acarretando a perda da capacidade catalítica.

Tabela 2.4 - pH ótimo de alguns enzimas

Enzima	pH ótimo
pepsina	1.5
fosfatase ácida	4.5
urease	6.5
tripsina	7.8
arginase	9.7

2.1.11 TRIPSINA

Tripsina é uma *serina proteinase*, pertencente a uma classe de enzimas que apresentam o resíduo de aminoácido “*Ser*” em seu sítio ativo. Ela se forma no intestino a partir do tripsinogênio originado nas células pancreáticas. O tripsinogênio é um precursor inativo sintetizado no pâncreas,

cuja ativação é feita pela clivagem de uma ligação peptídica no intestino delgado, formando assim a tripsina uma enzima ativa.

A própria tripsina possui efeito ativante, com isso, a ativação também ocorre autocataliticamente. Durante a ativação se libera um hexapeptídeo de composição Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. A tripsina está envolvida, cataliticamente, na hidrólise de ligações peptídicas mas apenas aquelas em que o grupo carboxila é doado por um resíduo de lisina ou de arginina, independentemente do comprimento da sequência de aminoácidos da cadeia.

A tripsina cristalizada tem um peso molecular de 23.000 e sua atuação ótima ocorre em pH 7,8, ou seja, em meio fracamente alcalino; é constituída por 223 aminoácidos. Como se disse, atua sobre as ligações entre lisina e arginina da cadeia peptídica; com isso, a proteína se desnatura com maior dificuldade.

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 grau 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 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Desde que as diferentes proteínas diferem em conteúdo e sequência de aminoácidos, elas contêm razões diferentes de aminoácidos com grupos R ácidos e básicos. Portanto, as proteínas diferem nas suas curvas de titulação ácido-base e nos seus pontos isoeletricos (pI), o pH ao qual elas não se movem num campo elétrico (Tabela 2.5). E também elas diferem umas das outras através de propriedades características, tais como: solubilidade, peso molecular, carga elétrica e afinidade por determinados compostos. Essas diferenças são aproveitadas na separação das proteínas umas das

outras. O método de purificação a ser escolhido dependerá da proteína em particular que se pretende isolar e, usualmente, empregam-se combinações seqüenciais de diferentes métodos.

Tabela 2.5 - Ponto isoeletrico de algumas proteínas

proteína	pH isoeletrico
pepsina	<1,0
albumina de ovo	4,6
soroalbumina	4,9
urease	5,0
β -lactoglobulina	5,2
γ -globulina	6,6
hemoglobina	6,8
mioglobina	7,0
quimotripsinogênio	9,5
citocromo	10,65
tripsina (suína)	6.8
lisozima	11,0

2.2.1 DIÁLISE

Por serem macromoléculas, as proteínas podem ser separadas de substâncias de baixo peso molecular por *diálise*. Neste processo, a mistura de proteína e moléculas pequenas é colocada dentro de um saco de material com poros ultramicroscópicos, como o celofane. Quando o saco de diálise é imerso em água, as moléculas protéicas ficam retidas, enquanto as moléculas pequenas ou íons atravessam a membrana de diálise (Figura 2.3).

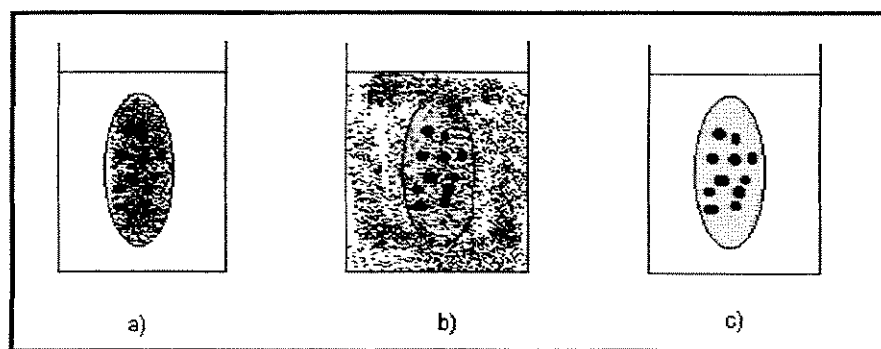


Figura 2.3 - Diálise

2.2.2 FILTRAÇÃO EM GEL

A separação das proteínas de uma mistura pode ser efetuada por métodos baseados na diferença de tamanho entre as moléculas, já que o peso molecular das proteínas varia de alguns milhares (13.000 para citocromos c) a vários milhões (2.800.000 para hemocianina). A mais usada destas técnicas é a filtração em gel. A mistura de proteínas é passada através de uma coluna formada por um gel constituído por esferas contendo poros de tamanho definido. As moléculas menores do que o diâmetro dos poros podem penetrar nas esferas, ao passo que as maiores não. Deste modo, as moléculas menores percorrem, ao longo da coluna, um trajeto muito maior do que as moléculas maiores, que saíram da coluna em primeiro lugar (Figura 2.4). Este método também permite a separação entre proteínas e moléculas ou íons pequenos (como na diálise).

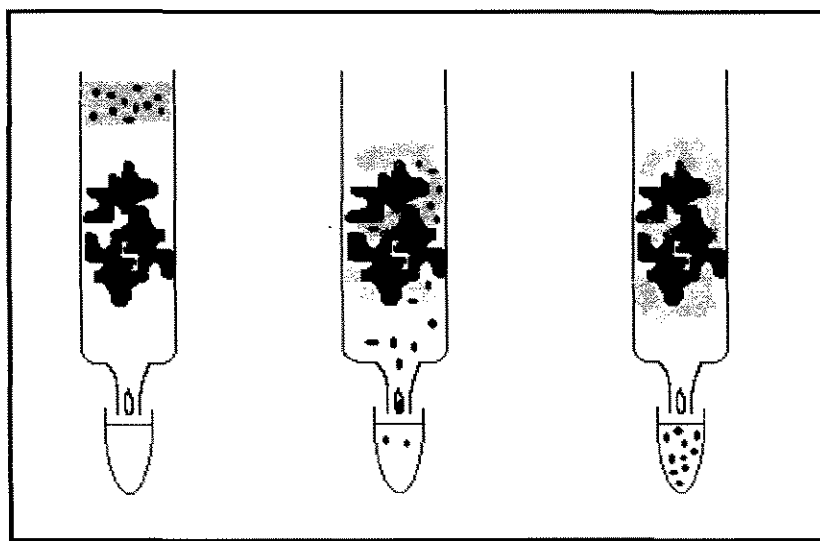


Figura 2.4 - Filtração em gel

2.2.3 ELETROFORESE

Em um mesmo pH, proteínas diferentes apresentarão cargas líquidas diferentes, o que determinará velocidades de migração diferentes se as proteínas forem submetidas a um campo elétrico. Este é o princípio da *eletroforese*. A mistura de proteínas é aplicada sobre um suporte

inerte, constituído por papel ou poliacrilamida. Depois de submetidas por algum tempo a uma diferença de potencial adequado, a posição das diferentes proteínas é revelada por coloração específica para proteínas (Figura 2.5).

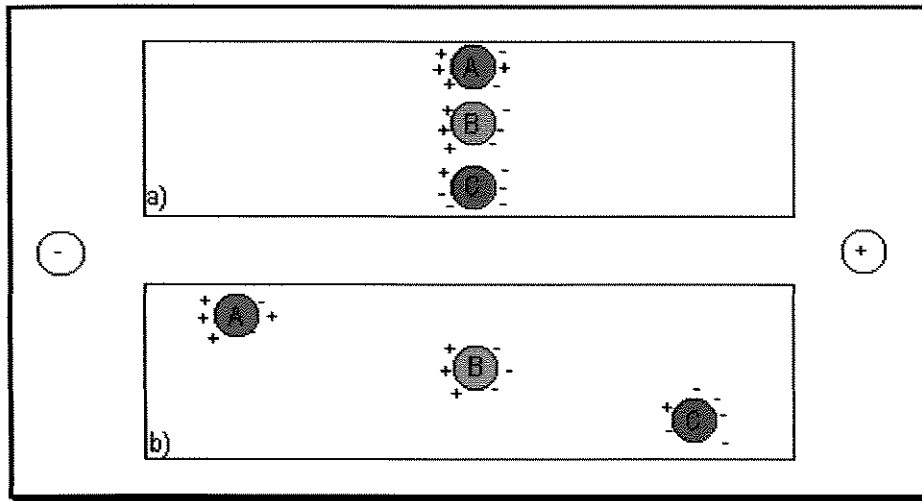


Figura 2.5 - Eletroforese

2.2.4 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Proteínas que apresentem afinidade específica por algum composto podem ser purificadas por *cromatografia de afinidade* (Figura 2.6). O princípio do método consiste em ligar o composto pelo qual a proteína tem afinidade (ligante) a uma matriz insolúvel e, com este material, preparar uma coluna. A mistura de proteínas é passada pela coluna: a proteína de interesse fica adsorvida à coluna, graças à interação não-covalente com o ligante, e as outras proteínas passam livremente. A proteína adsorvida pode ser diluída, por adição de solução concentrada do ligante. Se a proteína for uma enzima, o ligante pode ser o substrato, o produto ou um inibidor competitivo. No caso de purificação de anticorpos, o ligante utilizado é o antígeno.

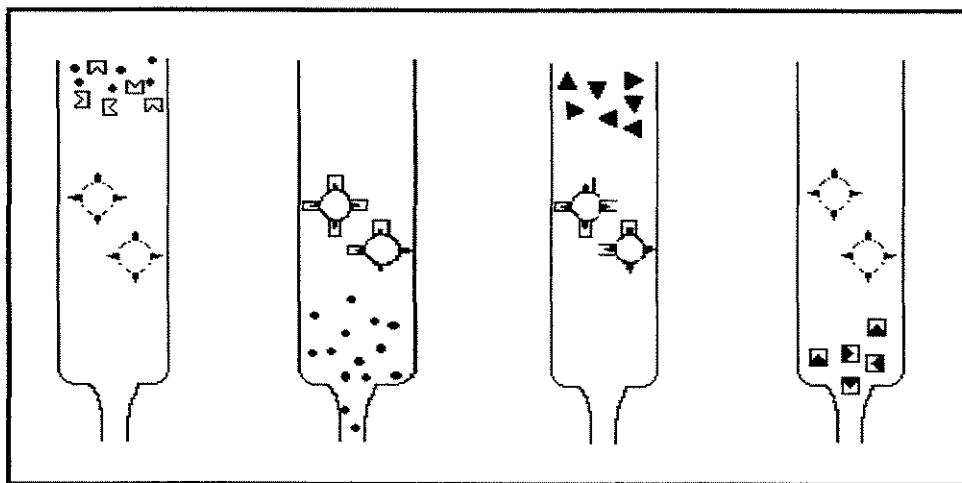


Figura 2.6 - Cromatografia de afinidade

2.2.5 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Os métodos de purificação geralmente utilizados no processo de recuperação dos produtos obtidos por fermentação envolvem múltiplos procedimentos, entre eles várias etapas cromatográficas com um elevado gasto de tempo, levando, muitas vezes, a baixos rendimentos de recuperação do produto. No entanto, novas tecnologias de purificação têm sido desenvolvidas. Entre elas está a extração líquido-líquido, que representa um primeiro passo em processos alternativos de purificação.

A extração líquido-líquido é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis, tendo a capacidade de realizar separações que são difícil ou economicamente inviável por outros métodos. Na extração líquido-líquido, a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido, insolúvel ou parcialmente solúvel na solução, o solvente, no qual o componente a ser extraído da solução, o soluto, é preferencialmente solúvel. O soluto se difunde no solvente com uma velocidade característica até que as concentrações de equilíbrio são atingidas em cada uma das fases formadas. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as duas fases e a miscibilidade parcial dos líquidos.

O conhecimento das relações de equilíbrio de fases é fundamental para análises quantitativas de processos de extração. As relações de equilíbrio de fases são baseadas em princípios termodinâmicos e representadas por diagramas estabelecidos por leis de distribuição dos constituintes entre as fases.

A escolha entre os métodos de separação é feita de acordo com aspectos econômicos e de características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada. A partir desta análise a extração líquido-líquido pode ser aplicada em processos biotecnológicos, como um grande aliado para separação e purificação de proteínas. A extração líquido-líquido também pode ser usada como um passo de pré-purificação, podendo-se, assim, obter melhores resultados com a combinação da extração líquido-líquido e outras técnicas, entre elas, os processos cromatográficos.

Um outro meio que pode ser usado em processos de extração líquido-líquido são os sistemas de duas fases aquosas. Os sistemas de duas fases aquosas podem ser facilmente ampliados da escala de laboratório para a planta piloto, sem mudança na natureza ou eficiência do processo. Além disso, desde que não há fase sólida, a mistura entre as duas fases é possível e o transporte interfásico é rápido. Às vezes, muito pouco tempo é requerido para que a maioria dos sistemas bifásicos alcance o equilíbrio. Um outro ponto favorável é que as fases são compatíveis com quase todas as proteínas conhecidas. Portanto, sistemas com duas fases aquosas são uma alternativa extremamente atrativa para a separação e purificação de proteínas em larga escala.

Esses sistemas, que vêm sendo testados com sucesso, são constituídos por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis, obtidas pela adição de dois polímeros hidrofílicos, como, por exemplo, o polietileno glicol (PEG) e a dextrana ou de um desses polímeros e um sal, como, por exemplo, o PEG e o fosfato de potássio.

Os polímeros podem ser sintéticos, como é o caso do PEG, que é um éter polimérico sintético, ou naturais, como é o caso da dextrana, que é uma cadeia de açúcar natural.

Devido ao alto conteúdo de água presente no sistema, é possível separar e purificar bioprodutos sob condições amenas num ambiente adequado à preservação de suas principais características (Kula, 1982 e Albertsson, 1986).

A partição em sistemas de duas fases aquosas é, principalmente, um processo onde os grupos expostos das moléculas entram em contato com os componentes da fase e é, portanto, um fenômeno dependente da superfície (Albertsson, 1986).

A influência de diferentes fatores sobre a partição de proteínas (Rabelo, 1998) é mostrada pelo logaritmo do coeficiente de partição. Essa influência pode ser considerada como a soma dos logaritmos de vários termos:

$$\ln K = \ln K_{elet} + \ln K_{hidrof} + \ln K_{bioesp} + \ln K_{tamanho} + \ln K_{conf}$$

Essa equação inclui um termo hidrofóbico (K_{hidrof}), um termo que inclui os efeitos eletrostáticos (K_{elet}), principalmente determinado pela carga da proteína e, também, pelo pH, pela distribuição de íons e pela carga dos polímeros envolvidos; um termo que inclui os efeitos do tamanho da proteína e do polímero ($K_{tamanho}$), um termo que inclui os efeitos da conformação (K_{conf}) e um termo que inclui os efeitos da afinidade dos ligantes (K_{bioesp}).

Esta técnica, utilizando solventes orgânicos, também vem sendo abordada mais ela é limitada normalmente pelas características hidrofílicas dos produtos de fermentação, levando à utilização de elevadas razões entre as fases orgânica e aquosa, devido aos baixos coeficientes de partição dos produtos em relação ao solvente orgânico. Como os solventes orgânicos são geralmente tóxicos para as proteínas e, também, provocam sua desnaturação, outros meios extratores são usados para a aplicação da extração líquido-líquido.

Um desses meios é o de soluções de micelas reversas, pois é um sistema que protege a proteína da desnaturação e pode ser bastante seletivo.

As soluções de micelas reversas vêm recebendo uma especial atenção, uma vez que as proteínas são solubilizadas em seu interior, podendo, deste modo, evitar o contato direto com solvente orgânico.

A extração líquido-líquido com micelas reversas envolve duas etapas: a primeira é baseada na capacidade das micelas reversas em solubilizar as proteínas no interior da piscina aquosa da micela, formada pelo tensoativo no solvente orgânico, e na segunda etapa, a proteína solubilizada é reextraída para uma nova fase aquosa, através da mudança das interações entre a proteína e a micela reversa.

2.2.6 EQUIPAMENTOS PARA A EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Para o processo de extração líquido-líquido, existem 3 tipos básicos de equipamentos: misturadores-decantadores; colunas extratoras e extratores centrífugos. Indiferente ao tipo de equipamento, toda operação de extração com solvente envolve contato e separação líquido-líquido (Kadam, 1986).

Os tipos de equipamentos utilizados no processo de extração líquido-líquido vêm aumentando nos últimos anos, e variam desde os clássicos vasos de mistura até as colunas centrífugas, sendo possível classificá-los em dois grandes grupos: equipamentos em “batch” (descontínuos), e equipamentos de contato contínuos.

- **Sistemas de contato ‘batch’ (descontínuos)**

Misturadores-decantadores: Estes sistemas são formados por uma série de estágios formados por tanques misturadores-decantadores, onde a solução e o solvente são misturados até serem atingidas as concentrações de equilíbrio em ambas as fases. Após isso, deixa-se decantar a fase mais densa e, então, faz-se a separação das fases antes delas passarem ao próximo estágio. Um esquema destes sistemas é mostrado na Figura 2.7.

Nestes equipamentos, obtêm-se altas eficiências de separação em cada estágio. A grande desvantagem destes equipamentos é o grande espaço físico necessário para sua instalação, principalmente nos casos em que o tempo para se atingir o equilíbrio ou a decantação da fase densa é muito grande.

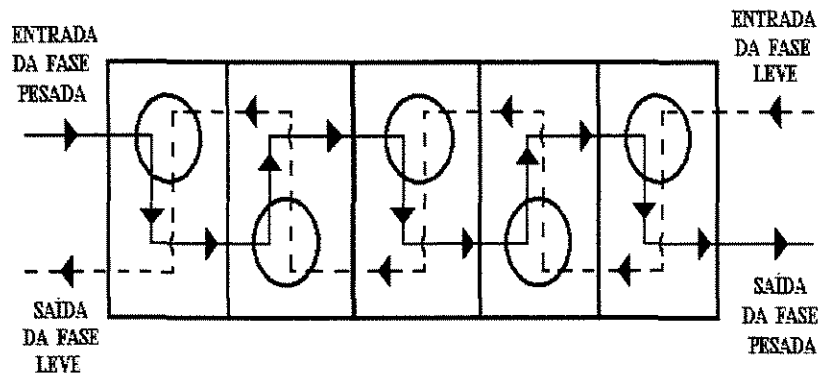


Figura 2.7 - misturadores - decantadores

- **Sistemas de contato diferencial (contínuo)**

A diferença essencial entre a operação em estágio e de contato contínuo pode ser resumida da seguinte forma: no caso da operação em estágios, o fluxo difusional de matéria entre as fases ocorre para reduzir a diferença de concentração que causa o fluxo. Se prosseguir por um tempo longo o suficiente, um equilíbrio é estabelecido, depois do qual nenhum fluxo difusional ocorre. A taxa de difusão e o tempo determinam a eficiência do estágio que pode ser alcançada numa certa situação.

Por outro lado, na operação de contato contínuo, o afastamento do equilíbrio é mantido e o fluxo difusional entre as fases pode continuar sem interrupção. A escolha entre os métodos depende da eficiência que pode ser alcançada e razões econômicas. Com alta eficiência, uma planta relativamente barata pode ser conseguida, cuja performance pode ser confiavelmente predita, usando-se a operação em estágios. Com baixa eficiência, contudo, os métodos de contato contínuo podem se tornar mais desejáveis por razões de custo, principalmente.

Nos sistemas diferenciais, os líquidos escoam continuamente em contracorrente, sem misturadores ou decantadores intermediários, sendo que estes contadores são normalmente colunas verticais. O escoamento em contracorrente ocorre em função da diferença de densidade entre os líquidos em contato na coluna. A fase mais densa é alimentada no topo e flui por gravidade no interior da coluna e a fase menos densa é alimentada na base e flui em direção ao topo da coluna. As colunas de contato diferencial são equipamentos mais compactos, ocupando menor espaço físico que os misturadores-decantadores.

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

___ Extratores sem agitação mecânica e separação pela gravidade;

Nestes equipamentos, a forma de promover o contato entre as fases (e portanto a transferência de massa), é a ação da força gravitacional, graças à diferença de densidades entre as duas fases. São os mais simples dos extratores diferenciais usados na extração líquido-líquido. Apresentam baixo custo de instalação e manutenção e ocupam reduzido espaço físico. A principal desvantagem é a baixa eficiência de separação que é obtida. São exemplos: colunas Spray, colunas Recheadas.

___ Extratores agitados por pulsações;

Nos extratores desta classe, além da força da gravidade, tem-se a ação da agitação mecânica que pode ser empregada através de pulsações.

A agitação mecânica e a força da gravidade agem conjuntamente como forças motrizes para a transferência de massa na coluna. Nestes equipamentos, a eficiência de separação cresce bastante em relação aos equipamentos da classe anterior. A principal desvantagem é o alto consumo de energia necessário para produzir as pulsações.

___ Extratores agitados por sistema rotativos;

Nos extratores agitados por sistemas rotativos, a força da gravidade atua em conjunto com a energia introduzida por esses sistemas de rotação, que podem ser : discos rígidos ou perfurados,

pás, turbinas, etc. O grau de dispersão, e, portanto, o grau de transferência de massa, é bastante elevado em comparação aos equipamentos sem agitação mecânica. São exemplos: o extrator ‘Scheibel’ e os de discos rotativos (RDC).

__ Extratores Centrífgos;

Os equipamentos desta classe utilizam a força centrífuga como força motriz para a transferência de massa. Eles são de desenvolvimento mais recente e possuem alta eficiência de separação e ocupam reduzido espaço físico. A desvantagem é o seu alto custo de implantação. Por outro lado, estes extratores são especialmente úteis para líquidos de diferenças de densidade muito pequenas e onde um curto tempo de operação é essencial, como em algumas aplicações farmacêuticas (por exemplo, a extração de penicilina de meios de cultura). São exemplos extrator Podbielniak, Luwesta, Laval.

2.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM MICELAS REVERSAS.

A extração líquido-líquido é uma operação unitária tradicional da engenharia química, que facilita a ampliação da escala e torna bastante promissor o uso da técnica de micela reversa para a extração de produtos de origem biológica (Rahaman et al., 1988). A eficiência da extração líquido-líquido de uma proteína por micela reversa em larga escala depende da facilidade com que a proteína é transferida de uma fase para outra e da inalterabilidade da função biológica do produto final recuperado.

Os processos convencionais de extração de proteínas em solventes orgânicos freqüentemente causam desnaturação irreversível e perda de função biológica. As pobres seletividade e capacidade de solubilização de solventes para os bioprodutos são também grandes limitações.

A recuperação de biomoléculas usando micelas é um processo de extração líquido-líquido que tem recebido atenção crescente uma vez que se mostrou que as proteínas podem ser

solubilizadas em solventes orgânicos com surfactantes, mantendo suas propriedades funcionais, e serem transferidas entre uma solução aquosa e uma fase orgânica de micelas reversas (M. Dekker 1987).

A recuperação de biomoléculas de uma solução aquosa é atingida em dois passos, extração direta para uma fase orgânica de micelas e subsequente reextração para uma nova fase aquosa. A transferência seletiva pode ser realizada por manipulação dos parâmetros do sistema. O uso de micelas reversas para separação, purificação e concentração de proteínas e outras biomoléculas é agora considerada uma técnica promissora, com potencial para aplicação em grande escala. Separação de misturas de proteínas, recuperação de enzimas extracelulares de um meio fermentativo e recuperação de enzimas intracelulares têm sido reportados. Esforços têm sido feitos para estender esta técnica para um processo de extração contínua (Cabral *et al.* 1993).

O principal objetivo dos esforços pelo desenvolvimento de novos processos de separação é possibilitar a separação das enzimas diretamente do meio fermentado e conseguir sua concentração e purificação a custos viáveis. A extração líquido-líquido de enzimas industriais por micelas reversas permite alcançar esse desafio (Meyer, 1992; Krei, Hustedt, 1989).

Dentre os exemplos que têm sido referidos, de aplicações bem sucedidas de sistemas micelares para o isolamento e purificação de proteínas, citam-se nomeadamente: a extração contínua de uma α -amilase usando duas unidades de misturadores - decantadores (Dekker *et al.*, 1986), a separação seletiva de uma mistura sintética de proteínas (Goklen e Hatton, 1987), a recuperação de uma protease alcalina extracelular de um meio de fermentação (Rahaman *et al.*, 1988), e a separação seletiva de purificação de uma preparação lipolítica de *Chromobacterium viscosum* (Vicente *et al.*, 1990; Aires-Barros e Cabral, 1991).

Mais recentemente, sistemas micelares foram aplicados na separação e purificação de uma α -amilase de meio de fermentação complexo (Krei e Hustedt, 1992), na extração de proteínas recombinantes (citocromo b5) (Pires e Cabral, 1992) e na extração de uma cutinase em sistemas descontínuos e contínuos (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 1994a, 1994b), e de um extrato comercial de

isoperoxidasas de rábano composto por sete isoenzimas (Regalo *et al.*, 1994), extração ribonuclease (Lye *et al.*, 1995), extração de lisozima usando solução de micelas reversas (Kinugasa *et al.*, 1996), extração líquido-líquido de xilanase por micela reversa (Gonçalves Rodrigues, 1997), extração de quimotripsina usando sistemas micelares reversas mistas de AOT-DOLPA (Goto M. *et al.*, 1998).

Rabelo e Tambourgi (1995) observam que a aplicação da extração de proteínas por micelas reversas para a recuperação de bioprodutos, em larga escala, enfrenta os mesmos problemas encontrados em operações de extração tradicionais.

É importante manter-se grandes áreas interfaciais entre as fases para assegurar taxas de transferência de massa aceitáveis e isso é geralmente obtido pela dispersão de uma fase na outra por meios mecânicos. Tipos de equipamentos típicos incluem simples sistemas misturador-decantador, contadores tipo coluna de escoamento em contracorrente agitados e unidades centrífugas projetadas pela Podbielniak e Westfalia (Lo *et al.*, 1983).

Os dispositivos de contato contínuo podem ter baixas eficiências de estágio devido aos problemas de caminhos preferenciais e mistura incompleta das duas fases. Eles também têm uma faixa restrita de condições de operação, em particular, relativa às taxas de escoamento, o que é essencial para evitar a “inundação” na coluna. A “inundação” ocorre quando uma fase passa a “rejeitar” a outra, impedindo a sua dispersão. Além disso, a presença de altos níveis de tensoativos no sistema poderia levar à formação de emulsões relativamente estáveis. A separação das fases pode ser melhorada com um contador centrífugo. Tais contadores têm sido usados com sucesso por décadas na recuperação de antibióticos de meios de fermentação e os problemas associados com a formação de emulsão têm sido superados, em grande parte (Hatton, 1989).

2.3.1 MICELAS

Utilizando a tecnologia de extração líquido-líquido, e uma nova classe de solventes orgânicos que oferecem propriedades de solubilização de muitos tensoativos, os quais tendem a agregar-se em determinadas concentrações formando micelas reversas.

De acordo com Krei, Hustedt (1989) o termo “micela” foi utilizado pela primeira vez em 1913, para descrever a organização de eletrólitos anfífilicos em soluções aquosas.

Estes tensoativos são moléculas que possuem características anfífilicas, ou seja, possuem na mesma molécula uma porção hidrofílica ou polar, denominada cabeça, e uma porção hidrofóbica ou apolar, a que se refere como cauda (Figura 2.8a). Quando em meio aquoso, tende, em determinadas concentrações, a se auto-organizar formando estruturas esféricas ou elipsoidais denominadas micelas, expondo sua porção hidrofílica ao meio, e, por conseguinte, retraindo sua porção hidrofóbica ao interior das micelas (Figura 2.8d). Já na situação da solubilização de surfactantes em meio orgânico, a inversão da conformação micelar ocorre devido às características apolares do meio. Ou seja, a estrutura micelar se mantém, porém neste meio a porção hidrofóbica é que fica exposta e a porção hidrofílica se retrai para o interior da micela (Figura 2.8e).

Nesta situação temos a chamada micela reversa; seu núcleo, por suas características hidrofílicas pode, em determinadas condições, reter água, que 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.

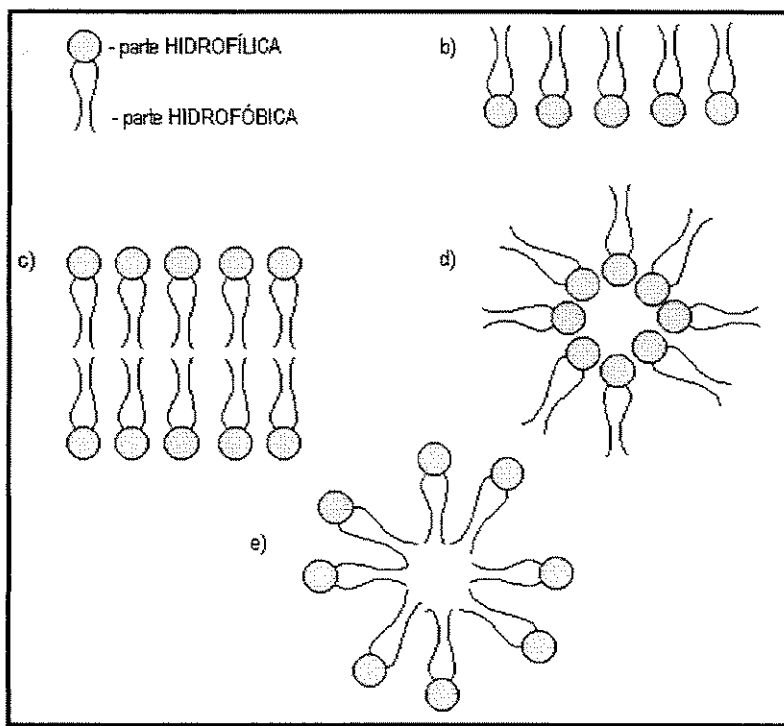


Figura 2.8 Representação esquemática da estrutura micelar

- a) molécula do agente tensoativo
- b) monocamada de agente tensoativo
- c) dupla camada de agente tensoativo
- d) micela reversa (em solvente apolar)
- e) micela normal (em solvente polar)

As micelas reversas podem ser encaradas como gotas de água encapsuladas, com 1 - 10 nm de diâmetro, mantidas em soluções de solventes apolares pela ação de um agente tensoativo, formando uma piscina aquosa (Luisi e Laane, 1986). Quando o conteúdo de água é suficientemente elevado para formar uma microfase independente no interior do agregado, o termo microemulsão é o mais adequado do que o de micela. Contudo, o limite para que esta transição ocorra não é muito preciso e o nome micela é então usado como termo geral (Luisi et al., 1983).

As contribuições de Luisi *et al.* (1977, 1979) e Martinek *et al.* (1978), com as primeiras descobertas de que as proteínas com atividade biológica poderiam ser isoladas no interior de

agregados de tensoativos em solventes orgânicos, deram início à aplicação do isolamento e da purificação em sistemas micelares.

A formação de micelas reversas depende de uma concentração mínima de tensoativo que pode variar, assim como seu tipo. Sem a concentração mínima de tensoativo, chamada concentração crítica de formação (0,1 a 1mM), não há formação de micela. Também sua formação depende do equilíbrio de um sistema ternário, composto por solvente orgânico (isooctano), água e tensoativo (AOT), (Figura 2.9).

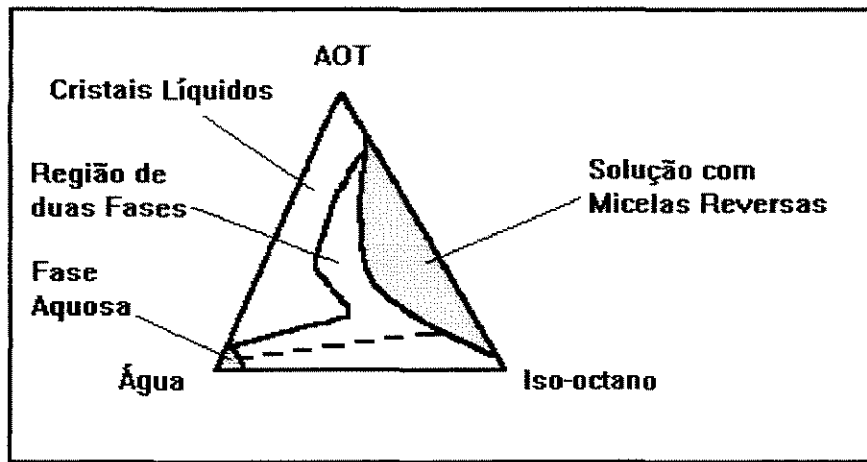


Figura 2.9- Diagrama de fases típico para o sistema AOT/água/isooctano

Dependendo da concentração de cada componente individual do sistema, os produtos formados podem ser: micelas normais, estruturas lamelares ou tubulares, ou micelas reversas, i.e., agregados com uma configuração esférica ou elipsoidal (Martinek *et al.*, 1989).

As micelas reversas podem ocorrer em presença de diferentes solventes, tais como: hidrocarbonetos alifáticos (n-octano, iso-octano, n-heptano), aromáticos (benzeno, xileno), clorofórmio, éter dietílico e, em misturas destes solventes. O mesmo acontece também em presença dos tensoativos normalmente utilizados na formação de micelas reversas, tais como: o dioctilsulfosuccinato de sódio (AOT), os tensoativos derivados de polióxidos de etileno (Tween, Triton), os halogenetos de alquil amônio (CTAB, TOMAC, TTAB) e os fosfolipídeos (Fosfatidilcolina) (Luisi e Magid, 1986; Martinek *et al.*, 1989).

Para a sua utilização, deve-se levar em conta o valor do ponto isoeletrico da proteína a ser separada e o tamanho da micela desejada (Krei, Hustedt, 1989; Meyer, 1992).

2.3.2 TIPOS DE TENSOATIVOS

Os compostos químicos genericamente conhecidos como tensoativos são constituídos por duas partes: uma parte apolar (hidrocarbonada) e uma parte polar ou iônica. A parte apolar pode ser linear ou ramificada, e interagir apenas fracamente com as moléculas do ambiente aquoso sendo, portanto, designadas de hidrófobas. A parte polar ou iônica da molécula do tensoativo, usualmente denominada de grupo polar ou cabeça do surfactante, interage fortemente com a água, via interações dipolo-dipolo ou íon-dipolo e é solvatada (Figura 2.10) (Ottewill, 1984).

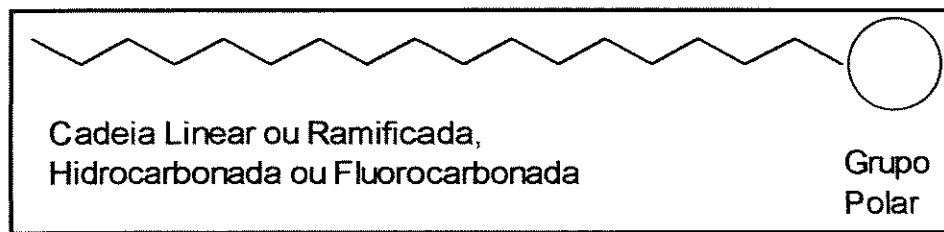
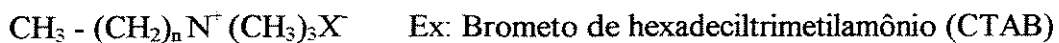


Figura 2.10- Esquema de uma molécula de tensoativo

Os tensoativos podem ser classificados de acordo com a estrutura molecular da parte polar em catiônico, aniônico, neutro e anfóteros ou zwitteriônicos. Alguns tipos de tensoativos bem como sua classificação estão relacionados abaixo:

1) Catiônicos

São caracterizados por possuírem um grupo polar com carga positiva ligada à cadeia carbônica. Estes tensoativos possuem algumas propriedades importantes, como por exemplo são usados como bactericidas.



$X^- = \text{Haleto},$

$[X^- = \text{Br}^- \text{ e } n=15]$

$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{N}^+ - (\text{C}_5\text{H}_5) X^-$ Ex: Cloreto de hexadecilpiridínio (CPC)

$[X^- = \text{Cl}^- \text{ e } n=15]$

2) Aniônicos

São aqueles que apresentam um grupo polar com carga negativa, e propriedades físicas superiores aos demais no que se refere ao poder de espuma e detergência. Os principais exemplos desta classe são os alquil sulfatos, alquil éter sulfatos e alquil sulfossuccinatos.

$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{OSO}_3^- \text{M}^+$ Ex: Dodecilsulfato de sódio (SDS)

$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{SO}_3^- \text{M}^+$ Ex: Dodecilsulfonato de sódio (SDSO)

$[\text{M}^+ = \text{Na}^+ \text{ e } n = 11]$

Ex: Dioctilsulfossuccinato de sódio (Aerossol OT ou AOT) (Figura 2.11)

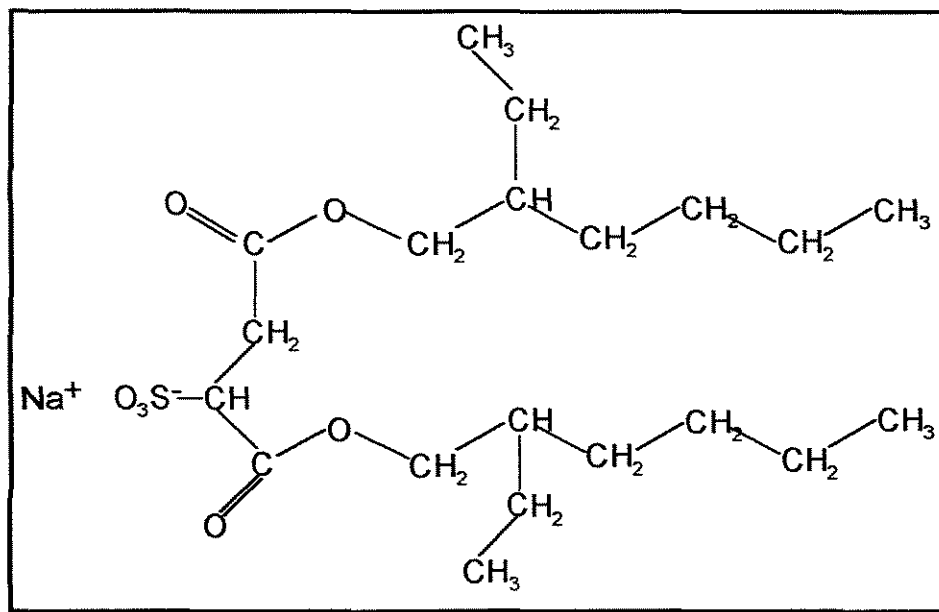


Figura 2.11 - Aerossol OT

3) Não Iônicos

São caracterizados por terem um grupo polar sem carga ligada à cadeia carbônica. Possuem como características principais: compatibilidade com a maioria das matérias-primas

utilizadas em cosméticos, têm baixa irritabilidade à pele e aos olhos, alto poder de redução da tensão superficial, baixo poder de detergência e baixo poder de espuma. Os exemplo mais comuns desta classe são os derivados de polióis.

$C_{12}H_{25} - (OCH_2CH_2)_nOH$ Ex: Polioxietileno (23) dodecil éter (Br = 35, [n = 23])

$CH_3 - (CH_2)_n - (C_6H_4) - O - (CH_2 - CH_2 - O)_m - H$

Ex: Polioxietileno (9,5) Octilfenol (Triton X100), n=7 e m=10

4) Anfóteros ou Zwitteriônicos

Estes tensoativos são caracterizados por conter na mesma molécula grupos com carga positiva e grupos com carga negativa. Os tensoativos destas classe são derivados das betainas e imidazolinias.

$CH_3 - (CH_2)_n - N^+(CH_3)_2 - CH_2 - COO^-$ Ex: N-Dodecil-N,N-Dimetilglicina [n = 11]

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 se necessita trabalhar com a proteína em valores de pH abaixo de seu pI, a mesma apresentará distribuição dos resíduos positivo. Portanto, para uma melhor transferência de massa preferencialmente se escolheria 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 seria o catiônico.

Outro importante fator relacionado com tensoativos é a sua concentração. Goklen *et al.* (1986) afirma em 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. 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 a 250 mM de tensoativo.

Já em relação à origem, os tensoativos são classificados em naturais ou sintéticos. Embora a maioria dos tensoativos sintéticos sejam quimicamente bastante resistentes, eles apresentam uma certa toxicidade, e, por este motivo, a utilização dos tensoativos naturais apresenta vantagens, principalmente por serem biodegradáveis. Apesar da produção dos tensoativos naturais ser obtida a partir de recursos renováveis, e a grande diversidade estrutural e as diversas propriedades físico-químicas facilitem sua obtenção, os elevados custos de produção não tornam economicamente viável a sua utilização (Hauser, 1984; Fiechter, 1992).

2.3.3 SOLVENTE ORGÂNICO

O efeito do solvente orgânico na transferência de proteína e recuperação da atividade enzimática em um processo de extração micelar reversa, é significativo no comportamento de agregação do surfactante, tamanho e forma das micelas reversas e a capacidade de solubilização do sistema.

Com relação aos solventes, a premissa básica para a sua utilização no sistema de micelas reversas é que sejam imiscíveis com a água, pois além de a água ser o meio mais convencional onde se efetuam fermentações, é também um dos solventes mais utilizados na 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 hidrocarbonetos 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).

Outra característica vital para a escolha de solventes orgânicos é que não devem desnaturar as proteínas 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 à atividade enzimática, determinando empiricamente que para as enzimas estudadas o iso-octano seria o solvente que menor influência teria na desnaturação. Laane *et al.* (1987) definiram algumas regras para otimização 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 $\log P > 4,0$. Esta hipótese foi justificada pelo fato dos solventes com maior grau de polaridade poderem interagir com a água intramicelar, desestabilizando as enzimas encapsuladas no interior das micelas. Para fins quantitativos, o iso-octano possui, por exemplo, $\log P = 4,5$.

Qing - Long Chang (1994) usando a tripsina como proteína modelo e AOT como surfactante modelo, investigou o efeito de uma variedade de solventes na transferência da proteína e recuperação da atividade durante a extração micelar reversa. Verificou que muitos solventes, incluindo iso-octano, octano, heptano e querosene, têm efeitos similares na recuperação da atividade da proteína depois de um ciclo completo de extração e reextração, e poderiam todos ser usados como solventes para extração de proteínas com micelas reversas de AOT. Dois outros solventes, no entanto, (hexano e ciclohexano) não foram tão eficientes.

2.3.4 SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

A solubilização de proteínas em micelas reversas é geralmente expressa como uma função do grau de hidratação da micela, expressa pelo parâmetro W_o . Este parâmetro é definido como a razão entre a concentração molar da água e do tensoativo.

$$W_o = [\text{Água}] / [\text{Tensoativo}]$$

O limite exato de solubilização não é preciso e depende de muitos fatores: temperatura, pH da solução aquosa, natureza do solvente orgânico, concentração da água e tensoativo no sistema e natureza da proteína (Levasshov *et al.*, 1984; Kadam, 1986; Robinson, 1990).

Para alguns autores, este parâmetro é de extrema importância no sistema de micelas reversas pois determina a maioria das propriedades físicas e estruturais das micelas. Do valor deste parâmetro podem ser determinados o número de moléculas de surfactante por micela e o raio micelar. Ruckenstein e Karpe (1991) e Luisi *et al.* (1988), a partir de considerações como a de se assumir as micelas reversas como possuindo 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:

$$r = 1,64 W_o$$

$$N_{ag} = 0,611 W_o$$

$$CM = 1,64 \{[AOT] / W_o\}$$

A validade destas equações foi testada, e segundo Castro e Cabral (1988), apresenta boa aproximação ao sistema AOT/isooctano. Os autores confirmaram os valores preditos através de análise com raios-X, por espalhamento de luz (light scattering), por ultracentrifugação e por ressonância magnética nuclear (RNM). Obtido o valor do tamanho da micela, e conhecendo-se o tamanho da proteína, pode-se verificar previamente se a proteína pode ser encapsulada; ou ainda, em que condições teríamos sua expulsão da micela, pelo encolhimento desta, o que constitui fator importante na reextração da proteína da fase orgânica.

Em virtude do sistema micelar ser flexível, a molécula de enzima solubilizada na piscina aquosa, pode ser encontrada em três diferentes localizações no interior da micela, de acordo com a natureza do enzima (Figura 2.12), de modo a manter sua atividade catalítica.

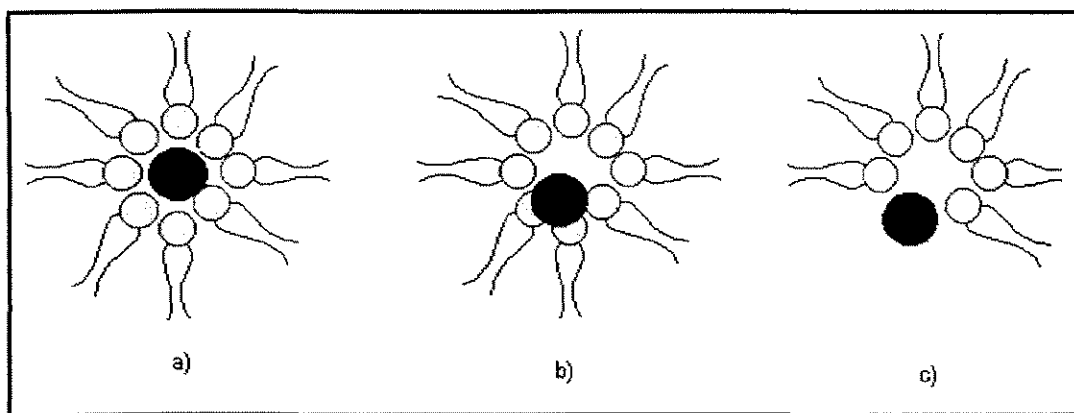


Figura 2.12- Representação esquemática de uma micela reversa contendo

- a) proteína hidrofílica;
- b) proteína ativa a nível de superfície;
- c) proteína hidrofóbica;

Pelo esquema da Figura 2.12, verifica-se que uma molécula de uma proteína hidrofílica tanto pode evitar um contato direto com o solvente orgânico como com a superfície da cavidade interna da micela reversa formada pelos grupos polares do tensoativo, localizando-se no interior do centro aquoso da micela reversa; uma enzima ativa a nível de superfície atua com a camada superficial do tensoativo da micela reversa ou mesmo pode ser parcialmente absorvida nela; e finalmente uma proteína hidrofóbica pode ficar em contato com o solvente orgânico.

Embora não se saiba muito sobre o mecanismo de solubilização e nem como a proteína se encontra realmente dentro da micela muitos modelos já foram propostos de uma maneira bem satisfatória. Apesar disso, as proteínas podem ser eficientemente separadas e recuperadas por extração líquido-líquido, utilizando sistemas de micelas reversas, manipulando-se parâmetros do processo.

2.3.5 FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS POR MICELAS REVERSAS.

A transferência de fase das proteínas depende de muitos fatores relacionados às propriedades inerentes ao próprio sistema micelar e às propriedades das biomoléculas. Dentre estes fatores citam-se: o pH, a força iônica, o tipo de solvente orgânico e as propriedades físico-químicas das proteínas, tais como o seu ponto isoelétrico (pI), a hidrofobicidade, o tamanho, e a distribuição de cargas (Andrews, Haywood, 1994)

Segundo Castro e Cabral (1988), é possível conseguir a solubilização seletiva de uma mistura de proteínas, no sistema micelar, por manipulação das mesmas variáveis que definem a forma e o tamanho da micela. A manipulação destes fatores permite a utilização do sistema de micela reversa no isolamento e purificação de proteínas. Os fatores mais importantes são aqueles que estabelecem as interações eletrostáticas entre as proteínas e os diversos componentes da micela, nomeadamente o pH e a força iônica (Pires *et al.* 1996). Estes fatores serão abordados nos itens subsequentes.

2.3.5.1 Efeito do pH

Segundo Andrew *et al.* (1990), o pH de uma solução afeta as características de solubilização das proteínas, principalmente porque modifica a distribuição de cargas na superfície da proteína. Se o valor do pH for inferior ao do ponto isoelétrico, a proteína apresentará carga líquida positiva; se for superior, a carga será negativa. Assim sendo, quando se usa agente tensoativo aniônico na formação da micela, deve-se trabalhar somente com valores de pH abaixo do ponto isoelétrico, condição que favorece a atração eletrostática entre a proteína e a parte polar dos agentes tensoativos. Com valores de pH acima do ponto isoelétrico, há repulsão eletrostática e inibição da solubilização de proteínas. Neste caso, agentes tensoativos catiônicos deverão então ser utilizados.

Em trabalhos usando-se o tensoativo aniônico AOT (Aerossol-OT: di-2-etil hexil-sulfosuccinato de sódio), Luisi e colaboradores (1983) não observaram essas tendências, usando a

ribonuclease A. Eles observaram que a transferência foi mais eficiente na faixa de pH alcalino e, portanto, concluíram que interações eletrostáticas não eram importantes no processo de solubilização global.

Göklen e Hatton (1987) encontraram que o oposto é verdade para três proteínas de baixo peso molecular : *ribonuclease A*, *citocromo c* e *lisozima*. Com uma solução de AOT 50 mM, houve uma mudança marcante no comportamento de solubilização, no pI de cada proteína, que demarcava a região de nenhuma solubilização ($\text{pH} > \text{pI}$) e aquela de transferência para a solução orgânica ($\text{pH} < \text{pI}$). Essa observação concorda com o mecanismo de solubilização baseado nas interações eletrostáticas.

Alguns autores (Luisi *et al.*, 1979; Castro *et al.*, 1988) obtiveram transferência de proteína em situações contrárias às 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 seja controlada principalmente por interações hidrofóbicas.

A massa molar da proteína a ser transferida também é importante na manipulação do pH para a transferência de fases. Worberg *et al.* (1989) e Göklen, Hatton (1987) estabeleceram uma correlação entre a massa molar, o ponto isoelétrico e o pH ótimo para extração das proteínas para a fase micelar, utilizando tensoativos aniônicos e catiônicos. De acordo com estes autores, as proteínas de baixa massa molar são solubilizadas na fase micelar em valores de pH muito próximos ao seu ponto isoelétrico; para proteínas maiores, a diferença entre o pI e o pH ótimo de extração seria maior, pois estas necessitam de uma maior diferença de potencial para serem encapsuladas nas micelas. Este efeito pode ser explicado devido à necessidade de adaptação da micela ao tamanho maior da proteína, que por não ser favorável energeticamente, tem de ser compensada por um maior número de interações eletrostáticas.

Na reextração, entretanto, o valor do pH deve ser escolhido de tal modo que a proteína tenha a mesma carga da molécula do tensoativo. Deste modo a força de repulsão criada causaria a liberação das proteínas englobadas (Brandani *et al.*, 1996)

2.3.5.2 Efeito da Força iônica

A força da fase aquosa determina o grau de proteção do potencial eletrostático imposto pela superfície carregada. O aumento da força iônica causa dois efeitos importantes na extração com micelas invertidas. O primeiro efeito induz a um decréscimo da interação eletrostática entre a carga da proteína e a interface carregada do tensoativo. O segundo efeito reduz a repulsão eletrostática entre os grupos polares do tensoativo e leva a um decréscimo do tamanho das micelas invertidas (Dekker *et al.*, 1989).

Estudos realizados por Goklen e Hatton (1986, 1987) mostraram o efeito da força iônica na extração da ribonuclease A, citocromo C e lisozima em micelas invertidas AOT em isooctano, onde se verificou a redução da solubilização com o aumento da concentração de KCl para todas as proteínas. No entanto a concentração requerida para o início da redução da solubilização foi distinta para cada uma delas conforme mostra a Figura 2.13.

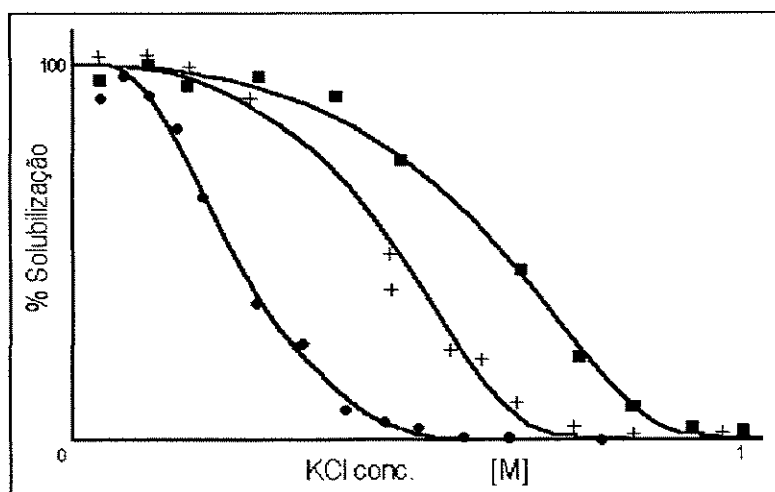


Figura 2.13 - Efeito da concentração de KCl na solubilização da ribonuclease A (+), citocromo C (●) e lisozima (■); em soluções micelares de AOT em isooctano.

A ausência de força iônica na fase aquosa inicial pode inibir a separação de fases após a extração, pela formação de uma emulsão estável (Cabral, Aires-Barros, 1993).

Um estudo mais detalhado dos efeitos combinados do pH e da força iônica na solubilização da proteína, demonstrou que o efeito do aumento da concentração de sal (aumento da força iônica) estreitou a região de pH de solubilização.

Com o tensoativo aniônico AOT foi notado que, quando a concentração de sal aumenta, torna-se necessário usar pH's mais baixos para efetuar uma solubilização significativa. Dekker *et al.* (1987) encontraram que o inverso é verdade com o tensoativo catiônico TOMAC. Assim, o pico de solubilização mudava para valores de pH mais altos quando a concentração de NaCl foi aumentada. Essa observação é consistente com a hipótese de que interações eletrostáticas são dominantes nesses sistemas e o aumento da força iônica altera a solubilização através dos mecanismos já comentados.

2.3.5.3 Efeito do Sal

O principal efeito da ação salina se dá pela alteração na força iônica, modificando o equilíbrio existente entre as forças de repulsão eletrostáticas entre os grupos polares do surfatante, causando expansão ou retração do tamanho da micela. Cabral e Aires-Barros (1993), porém, afirmam que, dependendo da concentração molar da solução tampão adicionada para controle de pH, pode-se promover a separação de fases.

Não somente a concentração, mas também o tipo de sal, pode vir a influenciar a transferência de massa entre fases. Meyer (1992) confirma este fato destacando que a influência do tipo de sal não se dá pela interação específica do sal com a proteína, mas sim pela influência do íon sobre o conteúdo aquoso da micela. Marcozzi *et al.* (1991) verificaram que o tipo de sal empregado é de fundamental importância na extração de proteínas. Íons menores proporcionam maior raio de hidratação devido às diferenças nas suas características, resultando em maiores faixas de interação eletrostática e, conseqüentemente, em maiores micelas.

Meyer (1992) observaram para a tripsina e para a peroxidase, tanto a pH 7,0 como a pH 10, que o aumento da concentração de sais de sódio na solução aquosa inicial provocou um aumento da extração. O oposto, porém, ocorreu, quando foram utilizados sais de potássio.

A diferença na curva de solubilização da ribonuclease A na presença de KCl e NaCl pode ser uma consequência dos tamanhos relativos dos íons K^+ e Na^+ . O raio atômico destes sais são, respectivamente, 1,33 e 0,97Å. Em geral, íons menores (Na^+) produzem uma menor barreira e, por isso, permitem a maior interação entre a proteína e as micelas, levando a uma maior transferência da proteína para micela (Nishiki, *et al.* 1993).

Examinando transferência de fase de proteínas : ribonuclease-A, lisozima, tripsina e pepsina, (Martinet. *et. al.*, 1986), observaram a necessidade da presença de sal (pelo menos 0,05M) na fase aquosa. Com uma concentração de sal inferior, a solução micelar se tornava turva, devido a água excessiva sendo transferida para a solução micelar.

Resultados obtidos por (Martinek *et. al.*, 1986) analisando o tipo e concentração de sal ($CaCl_2$ 0.1M e 1M, KCl 1M, e $MgCl_2$ 0.1M) mostram que uma transferência eficiente de proteína ocorreu em todos os casos (ribonuclease-A 96%, lisozima 103%, tripsina 59% e pepsina 8.4%) com uma concentração inicial de cloreto de cálcio ao redor de 0,1M a pH 5 na fase aquosa, com exceção da pepsina. No caso da lisozima e ribonuclease-A, isto ocorre somente quando se parte de uma solução aquosa ácida. Isto parece indicar que efeitos eletrostáticos têm um papel importante na solubilização de proteínas em micelas reversas.

Chang (1994) testou diferentes tipos de sais na reextração e recuperação da atividade da enzima, na proteína modelo tripsina (30mM tampão (pH 11) com 0.3M KCl; 30mM tampão (pH 11) com 0.3M $(NH_4)_2CO_3$; 30mM Tampão (pH 7.5) com 1.0 M KCl) . Apenas a solução aquosa (30mM Tampão (pH 7.5) com 1.0M KCl) utilizada para a reextração manteve a atividade elevada ao final do ciclo de extração.

2.3.5.4 Efeito da Concentração do Tensoativo

A extração de proteínas depende da diferença de carga entre a proteína e o grupo polar do tensoativo. Na ausência de outros fatores e para um mesmo valor de pH, pode-se esperar um comportamento de extração oposto para tensoativos catiônicos e aniônicos.

Além da natureza da carga do tensoativo, outros parâmetros dependentes do tensoativo podem ser citados, nomeadamente: o tamanho das micelas reversa que são formadas, a energia necessária para ampliar as micelas e a densidade de carga no interior da sua superfície (Dekker *et al.*, 1989).

A capacidade de extração de proteínas para a fase micelar altera-se diretamente pelo aumento da concentração do tensoativo, possivelmente devido a mudanças nas interações eletrostáticas do sistema. O aumento da concentração do tensoativo possibilita a realização da extração em uma faixa mais ampla de pH, ocorrendo de alguma forma uma interferência do pH na solubilização das biomoléculas. Por outro lado, a transferência das proteínas, na etapa da reextração, para uma nova fase aquosa, é dificultada por aumento deste componente; assim sendo o valor ótimo desta variável deve ser o mínimo para atingir-se o máximo de transferência entre fases (Cabral, Aires-Barros, 1993).

Motonari *et al.*, (1997) usando um surfactante não-iônico, o tetra-oxietilenodeciléter (C10E4) em comparação ao AOT, obtiveram uma maior seletividade na extração de tripsina em um meio, utilizando-se o inibidor de tripsina convertido ao estado hidrofóbico por combinar covalentemente grupos colesteril usando uma reação de acilação. O AOT é um excelente surfactante para a extração de proteínas, mas para um meio onde várias proteínas se encontram, há necessidade de achar outro surfactante combinado com outros métodos para que se possa ter uma extração mais seletiva.

2.3.5.5 Influência da Temperatura

A temperatura também é um fator fundamental na absorção de proteínas pela micela. Segundo Krei e Hustedt (1989), dela depende a capacidade máxima da micela reversa. Dizem esses autores que, dentro de uma determinada faixa de temperatura, as micelas reversas em solventes orgânicos são formações estáveis que podem favorecer a absorção de moléculas. As temperaturas inferiores a esta faixa, as micelas encolhem e perdem sua capacidade de absorção. Temperaturas acima dessa faixa, ao contrário, influenciam o coeficiente de partição do agente tensoativo de tal modo que este, praticamente, não permanece mais na fase micelar e só é encontrado na fase polar. De acordo com Luisi *et al.* (1988), a presença de enzimas no interior da micela a temperaturas mais elevadas vai depender mais de uma termoestabilidade do que da capacidade de absorção da micela.

Segundo Regalo *et al.* (1994), foi observado um decréscimo considerável na extração e na reextração da peroxidase de rábano (HRP) com micelas de AOT abaixo e acima de 25°C. Uma ligeira turbidez foi observada na fase micelar após extração a uma temperatura inferior a 25°C. Este sistema, denominado Winsor-II, parece estar mais próximo da fronteira de uma transição no diagrama ternário de fase. Tanto na extração como na reextração, quanto mais alta for a temperatura, mais água é solubilizada na fase orgânica, que na extração variou até 2,8% (p/v). Este comportamento é oposto ao mencionado por Dekker *et al.* (1991), para o tensoativo catiônico TOMAC, o qual foi usado como procedimento alternativo na reextração. Segundo aqueles autores, é sugerido que este aumento da água solubilizada é provavelmente devido à alteração no número de agregação das moléculas do tensoativo.

Marcozzi *et al.* (1991), ao estudar o efeito da temperatura na eficiência da reextração da α -quimotripsina em AOT/isooctano, observaram que a temperatura de 38°C provocou um aumento da reextração de 26% para 55%, à força iônica de 0,1M KCl e de 24% para 50%, à força molar de 1,0M LiCl em relação à temperatura ambiente. Caso semelhante foi reportado por Luisi *et al.* (1979), onde o aumento da temperatura promoveu um aumento de aproximadamente 50% na extração da α -quimotripsina em cloreto de metiltrioctilamônio em clorofórmio.

Como as forças hidrófobas são dependentes da temperatura, sendo menos importantes a temperaturas baixas, um estudo da extração do citocromo b5 com micelas de CTAB/ciclohexano/10% decanol, foi realizado entre as temperaturas de 10°C e 40°C, a diferentes forças iônicas e valores de pH. Os resultados mostraram que a extração é apenas dependente da temperatura, quando o pH da fase aquosa é igual ao ponto isoelétrico da proteína. Para temperaturas mais baixas, a extração do citocromo b5 decresceu. Para forças iônicas maiores (0,8M KCl), a extração mostrou ser mais afetada pela temperatura (Pires e Cabral, 1992).

2.4 REEXTRAÇÃO

Na reextração, os fatores que afetam a eficiência da extração por micelas reversas também são válidos, pois basicamente se cria uma nova fase aquosa para que a proteína seja então extraída da fase orgânica, que veio do processo de 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 de outras etapas posteriores de purificação.

Nitin e Luisi (1989), Leser *et al.* (1993), Dahuron e Cussler (1988) realizaram estudos modificando o procedimento clássico de reextração 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 reextração. São reportados fatores de recuperação de quase 100%, entretanto nada é mencionado quanto à atividade enzimática obtida por este método. É um método particularmente interessante, pois o álcool pode

ser separado posteriormente do solvente orgânico por outra extração líquido-líquido, e os reagentes reaproveitados no processo.

A constatação de que enzimas podem ser purificadas ou obtidas de maneira mais concentrada que na solução inicial pelo processo clássico de micelas reversas foi constatada por diversos autores (Nishiki *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 1995). Deve-se citar também o trabalho de Hentsch *et al.* (1996), que investigaram a eliminação de traços de AOT da fase aquosa de reextração por simples diálise. Como resultado deste estudo, chegou-se à conclusão de que não apenas se ganharia eficiência mas também eficácia se as condições operacionais estivessem próximas da concentração de AOT mínima requerida pelo sistema em estudo, devido à menor contaminação de tensoativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

A tabela 3.1 apresenta os reagentes e produtos químicos utilizados nesta trabalho.

Tabela 3.1 Reagentes utilizados nos métodos analíticos.

REAGENTES	PUREZA	FORNECEDOR
Tripsina (do pâncreas suíno)	99% de Pureza	Sigma
4,4''- Dicarboxy 2,2''- Biquinoline $C_{20}H_{12}H_2O_4$	Puro	Sigma
Carbonato de sódio	Analítico	Ecibra
Tartarato de sódio	Puro	Ecibra
Hidróxido de sódio	Puro	Synth
Hidrogenocarbonato de sódio	Puro	Synth
Cobre sulfato-ICO	Puro	Ecibra
Fosfato monobásico de sódio	Analítico	Ecibra
Fosfato bibásico de sódio	Analítico	Ecibra
AOT (2-etil-hexil- sulfossucinato de sódio)	Puro	Sigma
Cloreto de potássio	Analítico	Eciba

3.2 PROTEÍNAS

A proteína modelo utilizada foi a Tripsina do pâncreas suíno (comercial), cujo ponto isoeletrico (pI) é 6,8, o pH ótimo é 7,8 e o PM= 23.000g/mol, a qual foi diluída em tampão 0,1M de fosfato de sódio em 30 μ M de concentração.

3.3 TAMPÃO

O tampão fosfato de sódio constitui-se de duas soluções descritas abaixo:

- Solução A:

27,8g de fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) diluído em 1000ml de água deionizada, cuja concentração é de 0,2M. Outra solução com 0,1M de NaH_2PO_4 foi feita.

- Solução B:

53,65g de fosfato dibásico de sódio ($\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) diluído em 1000ml de água deionizada, cuja concentração é de 0,2M. Outra solução com 0,1M de $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi feita.

- A partir destas soluções foram feitos os seguintes tampões:

- $\text{pH}=5,7 \Rightarrow 93,5\text{ml de A} + 6,50\text{ml de B}$; diluído em um volume total de 200ml.
- $\text{pH}=6,0 \Rightarrow 87,7\text{ml de A} + 12,3\text{ml de B}$; diluído em um volume total de 200ml.
- $\text{pH}=6,5 \Rightarrow 68,5\text{ml de A} + 31,5\text{ml de B}$; diluído em um volume total de 200ml.
- $\text{pH}=7,0 \Rightarrow 39,0\text{ml de A} + 61,0\text{ml de B}$; diluído em um volume total de 200ml.

3.4 TENSOATIVO

O tensoativo utilizado foi surfactante aniônico AOT (2-etil-hexil-sulfossuccinato de sódio) ou também denominado Aerosol-OT. Ele apresenta uma cabeça (polar) aniônica pequena e duas ramificações orgânicas apolares hidrofóbicas. Seu peso molecular é de 444,6g, e as concentrações utilizadas foram de 50mM, 100mM, 150mM, em isooctano.

3.5 SAL

O sal KCl, cujo peso molecular é de 74,56g foi dissolvido em água deionizada em concentrações de 1,0M, 0,1M e 0,01M.

3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (MÉTODO BCA)

Para determinar a quantidade de proteína que se encontra na solução, podemos citar os seguintes métodos: método de Bradford; método de Lowry; método de Smith (método BCA).

Neste trabalho utilizamos o método do BCA que se baseia na redução do Cu^{2+} a Cu^+ pela formação do complexo BCA - Cu^+ - proteína, através de quadro aminoácidos (cisteína, triptofano e tirosina) num meio alcalino.

Este método “ácido bicinonínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985)” é utilizado apenas na fase aquosa, pois não é possível ser aplicado na fase orgânica devido à interferência provocada pelo tensoativo AOT. Apresenta as vantagens de ser um método rápido e medir concentrações baixas de proteínas.

O método possui aplicabilidade numa faixa de 0,2 a 50 μg de proteína, e sua composição é a seguinte:

- Reagente A:

1g bicinconinato de sódio (BCA)

2g carbonato de sódio (Na_2CO_3)

0,16g tartarato de sódio

0,4g hidróxido de sódio (NaOH)

0,95g hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3)

Adiciona-se água deionizada até o volume de 100ml, em seguida ajusta-se o pH em 11,25, utilizando uma solução de 10M de hidróxido de sódio (NaOH).

- Reagente B:

0,4g sulfato de cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

10 ml de água deionizada

- Solução Padrão - SWR (Standard Working Solution):

Mistura-se 100 volumes do reagente A em 2 volumes do reagente B. Esta solução possui coloração verde e é estável por uma semana após o preparo.

- Procedimento:

Toma-se 1ml SWR e mistura-se com 20µl da amostra da fase aquosa da extração, depois incuba-se por 30 minutos em banho termostático a 60°C. Passado este período de incubação resfriam-se as amostras a temperatura ambiente e estas são analisadas em espectrofotômetro (MARCA). As amostras serão estáveis por pelo menos 1h. As leituras de absorbância devem ser feitas a 562nm, podendo-se utilizar tanto cubetas de poliestireno como cristal de quartzo. Para correlacionar os valores lidos no espectrofotômetro, produziu-se uma curva padrão pela análise de várias concentrações diferentes e conhecidas da proteína em estudo.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CONDUTIVIDADE

A condutividade da solução aquosa foi determinada usando um condutivímetro (Analyser), cuja célula condutivimétrica apresenta o valor de 0,964. As soluções analisadas foram:

- Solução 0,1M KCl; adicionou-se tampão fosfato de sódio 0,2M para ajustar o pH;
- Solução tampão fosfato de sódio 0,2M;
- Solução tampão fosfato de sódio 0,1M;

Todas as soluções foram analisadas nos seguintes pH's : 5,7; 6,0; 6,5; 7,0.

3.8 EXTRAÇÃO DESCONTÍNUA LÍQUIDO-LÍQUIDO DE TRIPSINA POR MICELAS REVERSAS (BATELADA)

Para a extração descontínua da tripsina foram usadas as seguintes soluções;

- Solução aquosa:

Utilizando as soluções de tampão de fosfato de sódio nas concentrações de 0,1M e 0,2M, foram preparadas em cada concentração destes tampões, soluções de pH's 5,7; 6,0; 6,5; 7,0.

Foram também preparados soluções de 0,1M KCl, onde se adicionou-se tampão fosfato de sódio 0,2M para ajustar os pH's em pH: 5,7; 6,0; 6,5; 7,0.

É partir das soluções com os pH's ajustados, foi adicionada tripsina, para que cada soluções apresentasse 30 μ M de tripsina.

- Solução orgânica:

Composta por AOT dissolvido a 50mM, 100mM e 150mM em isooctano.

- Procedimento:

Misturam-se 3ml de solução aquosa com 3ml de solução orgânica em um tubo de ensaio. Agita-se durante 1 min em vórtex, e deixa-se decantar por 20 horas.

Terminado o prazo para que as duas fases se separem, retira-se a fase orgânica com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Na fase aquosa, aplica-se o método de BCA para leitura das concentrações de proteína. O procedimento é ilustrado na Figura 3.1;

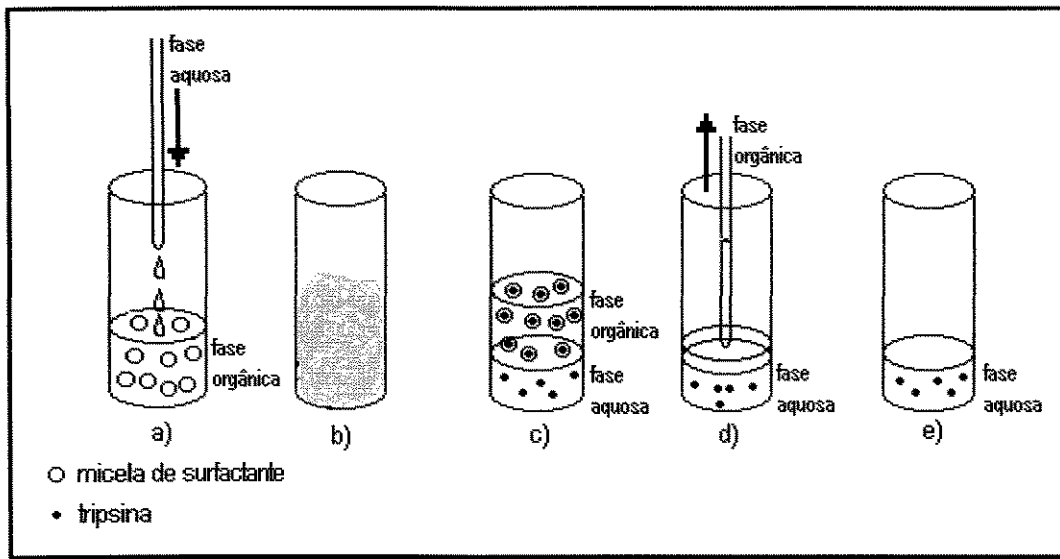


Figura 3.1 Extração descontínua da tripsina.

- a) adição da fase aquosa, com tripsina;
- b) agitação em vórtex por 1 minuto;
- c) separação das fases após 20 horas de decantação (estando a maior parte da tripsina na fase orgânica)
- d) retirada da fase orgânica;
- e) aplicação do método BCA na fase aquosa.

3.9 EXTRAÇÃO CONTÍNUA LÍQUIDO-LÍQUIDO DE TRIPSINA POR MICELAS REVERSAS

A extração contínua é feita em uma micro-coluna de campânulas pulsadas esquematicamente mostrada na Figura 3.2.

Esta micro-coluna é constituída de um tubo de vidro de 19 cm de altura; 2,84 cm de diâmetro externo e 2,54 cm de diâmetro interno. No centro desta micro-coluna está localizada uma haste de aço inox na qual estão soldadas as campânulas, que também são

de aço inox. Uma configuração com três campânulas foi adotada distanciadas 4 cm uma da outra. O diâmetro da base da campânula é 2,49 cm. A peneira da qual a campânula é construída fornece uma área livre de cerca de 38%.

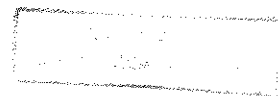
Os bocais de alimentação e saída são de aço inox, também, e possuem um diâmetro interno de 3,65 mm e 6,85 mm de diâmetro externo.

Os pulsos são fornecidos por um dispositivo e controlados por um “dimmer” cujo funcionamento faz com que a haste com as campânulas se posicione para baixo ou para cima na coluna conforme o pulso desejado.

Neste trabalho foram verificados os seguintes pulsos: 0,143 pulso/segundo (onde as campânulas ficam sete segundos na posição superior da coluna e um segundo na posição inferior da coluna); 0,2 pulso/segundo (onde as campânulas ficam cinco segundos na posição superior da coluna e um segundo na posição inferior da coluna); 0,33 pulso/segundo segundo (onde as campânulas ficam três segundos na posição superior da coluna e um segundo na posição inferior da coluna); e 1,0 pulso/segundo (onde as campânulas ficam três segundos na posição superior da coluna e um segundo na posição inferior da coluna).

A alimentação da fase contínua (fase aquosa), que possui maior densidade, é feita na parte superior da coluna utilizando-se a gravidade e retirada pelo fundo. A alimentação da fase dispersa (fase orgânica), que possui a menor densidade, é feita na parte inferior e retirada pelo topo. A alimentação e a retirada das duas fases são feitas por meio de uma bomba peristáltica, com vazão previamente calibrada.

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



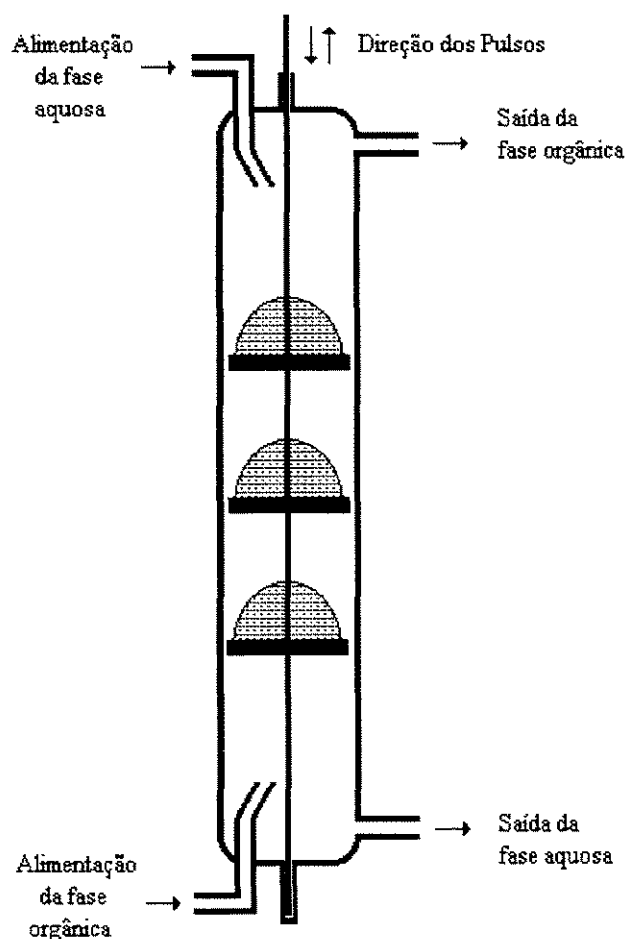


Figura 3.2 Esquema da micro-coluna de campânulas pulsada

Fase aquosa: 30 μ M de tripsina em 300ml tampão de fosfato de sódio (0,1M) com 0,01M de KCl.

Fase orgânica: 50mM de AOT em 300ml de isooctano.

Nos experimentos realizados na coluna foram variados os seguintes parâmetros operacionais:

- frequência de pulsos;
- razão entre as vazões;
- tempo de equilíbrio para maior extração.

Neste trabalho, foram avaliadas a influência desses parâmetros operacionais na transferência de massa, possibilitando a identificação das melhores condições de operação da coluna, visando a obtenção de eficiências mais elevadas.

3.10 REEXTRAÇÃO DESCONTÍNUA E CONTINUA

A reextração descontínua foi realizada apenas nas condições ótimas encontradas na extração, na fase orgânica da amostra.

- Mede-se o volume da fase orgânica e reserva-se em um tubo de ensaio;
- Fez-se uma solução aquosa : 100ml tampão de fosfato de sódio (0,1M) de pH=6 com 1,0M de KCl;
- Adiciona-se o mesmo volume de solução aquosa na fase orgânica. Agita-se durante 1 min em vórtex, e deixa-se decantar por 20 horas;
- Terminado o prazo para que as duas fases se separem, retira-se a fase orgânica com auxílio de uma pipeta de Pasteur;
- Na fase aquosa, aplica-se o método de BCA para leitura das concentrações de proteína.

A reextração continua foi realizada em todas as amostras da fase orgânica retiradas da coluna em todos os tempos analisados . A metodologia de análise aplicada foi a mesma da reextração descontínua.

3.11 CÁLCULO DA EXTRAÇÃO E REEXTRAÇÃO

Todos os cálculos efetuados foram realizados na fase aquosa da amostra pois não é possível aplicar o método do BCA na fase orgânica .

Os cálculos da extração foram realizados com auxílio da correlação obtida da calibração do espectrofotômetro :

$$y = (2.0957272) + (49,639163 * X) + ((7,7214099) * (X)^2)$$

onde : y = concentração em micromolar (μM)

X = absorbância

Utilizando-se, então esta expressão para determinar a concentração (μM) multiplica-se o valor encontrado pelo peso molecular da tripsina (23.000g/mol) e obtém-se assim concentração mássica em gramas. Multiplicando-se o valor encontrado pelo volume da amostra analisado tem-se a massa (g) final. Com a massa inicial (g) menos a massa (g) final encontrada, dividida pela massa inicial (g) e multiplicada por 100 encontra-se a porcentagem de extração:

$$\% E = \left(\frac{m_{\text{inicial de proteínas}} - m_{\text{final de proteínas}}}{m_{\text{inicial de proteínas}}} \right) \times 100$$

% E = porcentagem de extração.

Reextração: Os cálculos da reextração foram realizados com a mesma correlação do espectrofotômetro, e a mesma metodologia utilizada para encontrar a massa final de tripsina na fase aquosa resultante da reextração. A massa inicial denominada nesta etapa é formada pela massa inicial de tripsina na extração menos a massa final de tripsina na extração.

$$\% RE = (\text{massa final de proteínas}) / (\text{massa inicial de proteínas}) 100\%$$

3.12 CÁLCULO DO “HOLD-UP”

Na extração continua, após ter sido atingido o estado estacionário em condições de agitação e velocidade das fases pré estabelecidas, foi determinado o “hold up” da fase orgânica pelo método do estancamento. Neste procedimento são interrompidas

simultaneamente os pulsos e correntes de entrada e saída da coluna. A coluna foi então descarregada, em uma proveta graduada e lidos os volumes das fases que estavam separadas pela gravidade. Desta maneira é retirada a medida do “hold up” médio e o mesmo foi calculado utilizando-se a seguinte expressão:

$$H = (\text{volume da fase orgânica (ml)} / \text{volume total do sistema de fases (ml)}) * 100$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO EM BATELADA

O processo de extração líquido-líquido por micelas reversas da proteína modelo tripsina foi primeiramente feito em batelada para determinar parâmetros ótimos de extração. As variáveis pH, força iônica, concentração de sal e de AOT foram investigadas para se obterem melhores resultados tanto na reextração como na extração contínua.

A escolha do intervalo de investigação das variáveis experimentais foi baseada na literatura e nas características bioquímicas da tripsina. Essa proteína apresenta massa molar de 23000g/mol, pH ótimo de 7.8, sendo que a característica mais importante para este tipo de separação é o seu ponto isoelétrico, de 6.8, pois através dele se consegue prever a carga líquida da proteína no pH de estudo.

A extração e separação de enzimas com micelas reversas tem sido realizada por alguns pesquisadores, como o isolamento de três proteínas em uma mistura por Göklen e Hatton (1987); a concentração de α -amilase com um processo contínuo realizado por Dekker *et al.* (1986); a recuperação de uma protease alcalina extracelular de todo o meio fermentativo por Rahaman *et al.* (1988); a recuperação de peroxidase de raiz de *Armoracia rustica* por Huang e Lee (1994); a separação e a purificação de duas enzimas, a α -amilase e a protease neutra, de *Bacillus Subtilis*, por extração com micelas reversas por Chang (1997) e a extração líquido - líquido de xilanase por micela reversa por Rodrigues Gonçalves (1997).

É conhecido da literatura que a solubilização de proteínas numa fase micelar partindo de uma fase aquosa, sob agitação, ocorre na ordem de segundos (Göklen e Hatton, 1985), atingindo-se o equilíbrio entre 5 e 15 minutos. A intensidade e o tempo de agitação afetam consideravelmente a cinética de transferência da proteína, e visando uma menor

desnaturação da proteína convém minimizar o tempo de contato. Por este processo, as duas fases são apenas misturadas na área limitada pela região de contato (Marcozzi *et al.*, 1991).

Martinek *et al.* (1986) afirmaram como primeira observação experimental importante em seu trabalho que a transferência de água é geralmente moderada (menor que 4%), onde, sob certas condições, a proteína é quantitativamente transferida. Isto demonstra que a transferência de proteína na fase de sobrenadante não é um processo passivo, ou seja, não é simplesmente devida ao fato de que a água é transferida e, com ela, a proteína (se assim fosse, somente uma transferência máxima de proteína de 4% seria observada). A conclusão é que há um fator termodinâmico para que a proteína hidrofílica saia do meio aquoso e seja transferida nas micelas reversas.

Experimentos de Martinek. *et al.* (1986) atribuíram a menor extração de tripsina em relação à ribonuclease-A e à lisozima, nas mesmas condições experimentais, ao peso molecular maior da tripsina em relação às outras duas proteínas.

A solubilização seletiva de proteínas pode ser obtida pela manipulação de parâmetros do sistema, tanto da fase aquosa como da fase orgânica (Luisi *et al.*, 1979; Göklen e Hatton, 1985; Hatton, 1987).

4.1.1 PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

Com a metodologia descrita no capítulo anterior, foi elaborada uma planilha de experimentos baseados na variação do pH (5.7; 6.0; 6.5; 7.0), solução aquosa (0.1M KCl; 0.1M tampão fosfato de sódio; 0.2M tampão fosfato de sódio) e concentração de AOT (50mM; 100mM; 150mM). Todos os experimentos foram realizados em triplicata (extração 1; 2; 3).

Apresenta-se na Tabela 4.1 uma planilha resumida (a planilha completa com os dados experimentais se encontra no Anexo I).

TABELA 4.1: Resultados da extração de tripsina em micelas reversas em batelada.

<i>Amostras</i>	<i>pH</i>	<i>Solução</i>	<i>AOT</i>	<i>%Extração 1</i>	<i>%Extração 2</i>	<i>%Extração 3</i>
1	5,7	0.1M KCL	50mM	17,37	19,39	0
2	5,7	0.1M KCL	100mM	49,66	34,18	0
3	5,7	0.1M KCL	150mM	28,41	33,26	0
4	5,7	0.1M tamp	50mM	25,56	-	17,4
5	5,7	0.1M tamp	100mM	21,65	-	29,13
6	5,7	0.1M tamp	150mM	0	-	27,47
7	5,7	0.2M tamp	50mM	40,81	-	20,65
8	5,7	0.2M tamp	100mM	45,38	-	9,91
9	5,7	0.2M tamp	150mM	47,3	-	15,03
10	6	0.1M KCL	50mM	0	13,33	0
11	6	0.1M KCL	100mM	8,2	27,67	2,93
12	6	0.1M KCL	150mM	10,06	28,51	14,56
13	6	0.1M tamp	50mM	53,66	55,44	41,44
14	6	0.1M tamp	100mM	32,1	20,39	36,31
15	6	0.1M tamp	150mM	43,03	24,3	15,51
16	6	0.2M tamp	50mM	45,7	42,67	10,28
17	6	0.2M tamp	100mM	32,02	49,3	6,06
18	6	0.2M tamp	150mM	42,52	48,96	16,77
19	6,5	0.1M KCL	50mM	10,89	13,37	0
20	6,5	0.1M KCL	100mM	0	17,42	0
21	6,5	0.1M KCL	150mM	20,13	26,75	7,66
22	6,5	0.1M tamp	50mM	17,32	-	19,4
23	6,5	0.1M tamp	100mM	27,73	-	27,11
24	6,5	0.1M tamp	150mM	55,48	-	0
25	6,5	0.2M tamp	50mM	13,05	-	5,86
26	6,5	0.2M tamp	100mM	25,5	-	15,58
27	6,5	0.2M tamp	150mM	28,07	-	0
28	7	0.1M KCL	50mM	24,6	4,79	0
29	7	0.1M KCL	100mM	13,51	74,41	0
30	7	0.1M KCL	150mM	0,85	48,75	2,58
31	7	0.1M tamp	50mM	26,72	-	0
32	7	0.1M tamp	100mM	25,16	-	17,07
33	7	0.1M tamp	150mM	0	-	16,2
34	7	0.2M tamp	50mM	32,31	-	0,5
35	7	0.2M tamp	100mM	26,33	-	24,18
36	7	0.2M tamp	150mM	50,75	-	7,85

Para uma análise mais completa e simplificada dos valores encontrados, estes serão apresentados em forma de gráficos e tabelas menores, e os valores de extração serão analisados utilizando-se a média aritmética dos resultados obtidos.

4.1.2 EFEITO DO pH

Para examinar o efeito do pH na extração da tripsina ($30\mu\text{M}$) utilizando o sistema de micelas reversas em regime de batelada, fixou-se o valor da concentração de AOT em 50mM , em isooctano, e se variou o pH em soluções de tampões diferentes.

TABELA 4.2: Porcentagem de extração de tripsina em micelas reversas em diferentes pH's e soluções aquosas.

pH	% Extração 0,1 M KCl	% Extração 0,1 M Tampão	% Extração 0,2 M Tampão
5.7	18.38	21.48	30.73
6.0	4.44	50.18	32.88
6.5	12.13	18.36	9.45
7.0	9.79	13.36	16.40

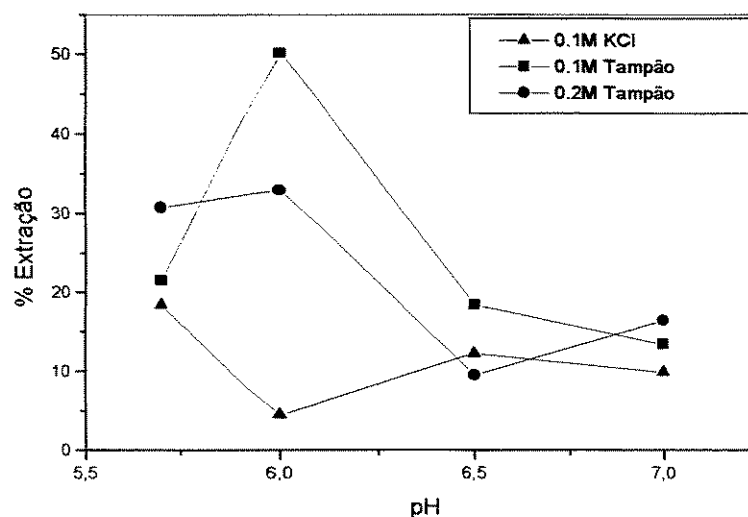


FIGURA 4.1 Efeito do pH na extração de tripsina ($30\mu\text{M}$) em micelas reversas, em solução orgânica de 50mM de AOT em isooctano, e soluções aquosas de 0.1M KCl; 0.1M tampão; 0.2M tampão.

Dos resultados representados na Tabela 4.2 e na Figura 4.1, observa-se que a extração de tripsina em micelas reversas de AOT/isooctano depende do pH utilizado. A extração pode ocorrer tanto com valores de pH acima como abaixo do seu ponto isoeletrico ($pI = 6,8$).

Verifica-se que para valores de pH inferiores ao pI da tripsina, onde a proteína se encontra carregada positivamente (sendo o AOT um tensoativo aniônico), a extração foi governada, portanto, por forças eletrostática atrativas, e tiveram resultados melhores do que o valor acima do pI , com exceção de alguns pontos, que podem estar dentro de erros experimentais.

Göklen e Hatton (1987) verificaram que para soluções micelares com o tensoativo AOT é necessário que a proteína esteja carregada positivamente para ocorrer solubilização, uma vez que o AOT é um tensoativo aniônico, e as micelas reversas teriam, portanto, uma superfície de cargas negativas circundam o centro polar. Deste modo, a solubilização requer uma interação eletrostática atrativa entre a micela e a proteína, o que vem confirmar os dados encontrados nos experimentos.

Observa-se, ainda, que para o valor de pH acima do ponto isoeletrico houve extração, apesar de relativamente menor em todas as soluções aquosas avaliadas. A extração nesta condição ocorre principalmente devido a interações hidrofóbicas, entre a proteína (que apresenta regiões hidrofóbicas na sua estrutura superficial) e a cauda apolar do tensoativo. Resultados neste sentido foram relatados para uma lipase de *Chromobacterium viscosum* (Aires-Barros e Cabral, 1991), para uma proteína recombinante, citocromo b_5 (Pires e Cabral, 1992; 1993), e para a extração de cutinase em micelas reversas de AOT/isooctano (Carneiro, 1995).

Wolbert *et al.* (1989) e Göklen e Hatton (1986) consideram que as proteínas pequenas são transferidas para micelas de tensoativo aniônico de AOT, abaixo do seu pI , em patamares grandes de pH. Para proteínas maiores, os perfis obtidos são mais estreitos e

em forma de sino e a transferência ocorre para valores de pH afastados do pI, e em alguns casos não se obtém 100% de transferência. O fato de proteínas pequenas serem solubilizadas perto do seu pI e as de maior massa molecular requererem uma diferença entre o pI e o $\text{pH}_{\text{ótimo}}$ bem maior pode ser devido a um rearranjo da micela para hospedar a proteína. A energia para este processo é obtida das interações entre tensoativo e proteína, de cargas contrárias. O tamanho da proteína determina a densidade de carga requerida para sua transferência e o pH de solubilização. Quanto maior a massa molecular, maior será a relação [$\text{pH}_{\text{ótimo}} - \text{pI}$] (Wolbert *et al.*, 1989).

Göklen e Hatton (1986) estudaram a transferência de proteínas com o tensoativo AOT e dividiram as proteínas em três grupos: Proteínas com tamanho comparável ao tamanho da micela, ou seja, cerca de 12.000 Da; proteínas com peso molecular de aproximadamente 25.000 Da, e proteínas com peso molecular acima de 65.000 Da. As proteínas pequenas são completamente solubilizadas em soluções com 0.1M KCl, numa gama grande de pH; as proteínas de tamanho intermediário apresentam um perfil em forma de sino e as proteínas grandes dificilmente são extraídas.

Deste modo, pode-se concluir que a tripsina apresenta um comportamento intermediário, pois seu peso molecular é de 23000 Da, apresentando assim um desvio de [$\text{pH}_{\text{ótimo}} - \text{pI}$] bastante pequeno, onde se verificou uma maior solubilização próximo ao pI.

Chang *et al.* (1994) verificou a extração de tripsina bovina por micelas reversas de AOT numa faixa de pH de 2 a 7, com uma elevada transferência de proteína em pH baixo e um pico em pH ao redor de 5,0. Esse comportamento da eficiência da transferência pode ser atribuída principalmente à interação eletrostática entre micelas reversas e proteína, porque o pH da fase aquosa pode determinar o estado de ionização dos grupos superficiais carregados nas moléculas de proteínas. Somente quando a carga global da proteína é oposta à da interface das micelas reversas, a solubilização da proteína pode ser esperada. Como um surfactante aniônico, a interface das micelas reversas de AOT é negativamente carregada.

Portanto, a transferência das proteínas na micelas reversas é favorecida a pH inferiores ao pI da proteína, e a diminuição do pH levará a um aumento no percentual de transferência da tripsina. Mas um valor de pH abaixo de 5,0 levou à desnaturação da atividade enzimática durante a extração.

Göklen and Hatton (1987) verificaram que a tripsina (bovina) foi muito pouco extraída por micelas reversas de AOT/ iso-octano para valores de pH inferiores a 4,0.

O valor do pH selecionado para ser utilizado na extração contínua foi 6,0. Este valor de pH resultou em maior porcentagem de extração nas soluções de tampão de fosfato de sódio de 0,1M e 0,2M.

4.1.3 EFEITO DA FORÇA IÔNICA

Para estudar o efeito da força iônica na extração líquido-líquido de micelas reversas, foram utilizadas três soluções aquosas (descritas no capítulo anterior): solução de tampão de fosfato de sódio 0.1M, solução de tampão de fosfato de sódio 0.2M, solução de 0.1M KCl que teve o pH ajustado com solução tampão de fosfato de sódio 0.2M. Para melhor abordagem do assunto, serão denominadas as soluções como 0.1M tampão, 0.2M tampão, 0.1M de KCl respectivamente. Os resultados selecionados para o estudo foram obtidos em pH 6.0, concentração de tripsina 30 μ M, concentração de AOT 50mM, no sistema de extração de micelas reversas, e são apresentados na Tabela 4.3 e Figura 4.2.

TABELA 4.3 Soluções aquosas 0,1M tampão, 0,2M tampão, 0,1M de KCl; com 30 μ M de tripsina em pH 6,0, em sistema de extração com 50mM de AOT em isooctano.

Soluções	0,1M KCl	0,1M Tampão	0,2M Tampão
% Extração	4.44	50.44	32.88

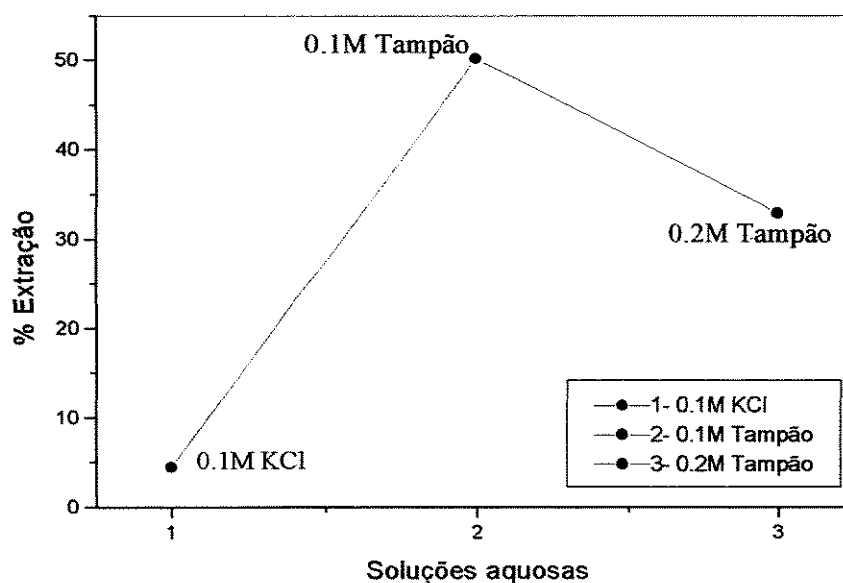


FIGURA 4.2 Porcentagem de extração de tripsina (30µM) em relação as soluções aquosas de 0.1M tampão, 0.2M tampão, 0.1M de KCl.

Observando estes valores da Figura 4.2, verificou-se que a solução de 0.1M tampão apresentou melhor porcentagem de extração de tripsina, nas condições de pH 6.0 e concentração de AOT 50mM em isooctano. Para uma conclusão mais detalhada foi medida a condutividade das soluções apresentadas, em vários pH's, com um condutivímetro. Os valores encontrados estão abaixo relacionados na Tabela 4.4.

TABELA 4.4 Condutividade, em mS/cm, das soluções aquosas de 0.1M tampão, 0.2M tampão, 0.1M de KCl, em pH's 5.7, 6.0, 6.5, 7.0.

pH	0.1M KCl	0.2M Tampão	0.1M Tampão
5.7	17.49	11.43	7.11
6.0	>20	12.51	7.27
6.5	>20	15.71	9.21
7.0	>20	19.99	11.99

Estes valores vêm elucidar muitas questões, tanto em relação à força iônica como também ao valor do pH mais satisfatório para uma extração eficiente.

Aumentando-se a força iônica da fase aquosa, a transferência da proteína para o interior das micelas é modificada. O aumento faz com que ocorra uma redução nas interações eletrostáticas entre os grupos polares do tensoativo, pelo chamado efeito “Debye”, no qual a capacidade de aproximação destas moléculas é inversamente proporcional à raiz quadrada da força iônica do meio. Desta maneira, à medida que a força iônica do meio aumenta, as interações entre a proteína e o agente tensoativo diminuem, causando assim uma diminuição no tamanho da micela, e, como consequência, a expulsão da proteína.

Assim, os valores de condutividade apresentados na solução 0.1M tampão, que são menores em relação às outras soluções, oferecem uma porcentagem de extração maior.

Na literatura isto foi observado por Chang e Cheng (1996), em que uma fase aquosa com alta força iônica pôde diminuir a interação eletrostática entre a carga da molécula de proteína e a interface da micela e também pôde reduzir a repulsão eletrostática entre os grupos polares do tensoativo, causando uma diminuição no tamanho da micela reversa. Este fato já havia sido observado por Krei e Hustedt (1992) com a enzima α -amilase e por Göklen e Hatton (1987) com as enzimas ribonuclease, citocromo-C e lisozima.

Andrews *et al.* (1994) estudaram a influência da força iônica (0.1 a 1.0M de NaCl e KCl) na extração de quatro proteínas (ribonuclease A, inibidor da tripsina, taumatina e α -lactoalbumina), a vários valores de pH (acima, abaixo e no valor do pI) e observaram uma diminuição na extração com o aumento da concentração de sal para todos os casos estudados, e que para certas concentrações elevadas de sal nenhuma extração foi obtida.

Pires *et. al.* (1996) observaram que, quando a força iônica da fase aquosa está abaixo de um certo limite, as micelas reversas e separação de fases não ocorrem, mas uma microemulsão estável se forma. Portanto, a transferência entre fases de proteína requer um valor mínimo de força iônica da solução da fase aquosa. Se a solução aquosa é tamponada, o tampão pode fornecer o suficiente de eletrólito, evitando a formação dessa microemulsão.

Mais uma vez, os resultados vêm ao encontro à literatura, uma vez que só a solução tampão 0.1M de fosfato de sódio foi necessária para uma boa extração. E também vêm reafirmar que o valor do pH escolhido, 6.0, é realmente o mais apropriado para este estudo, pois ele oferece uma força iônica baixa e ao mesmo tempo necessária para que haja formação de micelas e separação da fases.

4.1.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AOT

Estudou-se o efeito da concentração do tensoativo AOT em isooctano na fase orgânica para se obter a máxima extração de tripsina. Para melhor abordagem do assunto foi fixado o valor da solução em 0.1M tampão de fosfato de sódio, e variados os pH's em torno dos valores de 50mM, 100mM e 150mM de AOT. Os resultados são apresentados na Tabela 4.5 e Figura 4.3.

TABELA 4.5 Efeito da concentração de AOT na extração de tripsina (30 μ M) em micelas reversas em vários pH's: 5.7; 6.0; 6.5; 7.0 em solução 0,1M tampão fosfato.

pH	% Extração com 50mM de AOT	% Extração com 100mM de AOT	% Extração com 150mM de AOT
5.7	21.48	25.39	13.73
6.0	50.18	29.60	27.61
6.5	18.36	27.42	27.74
7.0	13.36	21.11	8.10

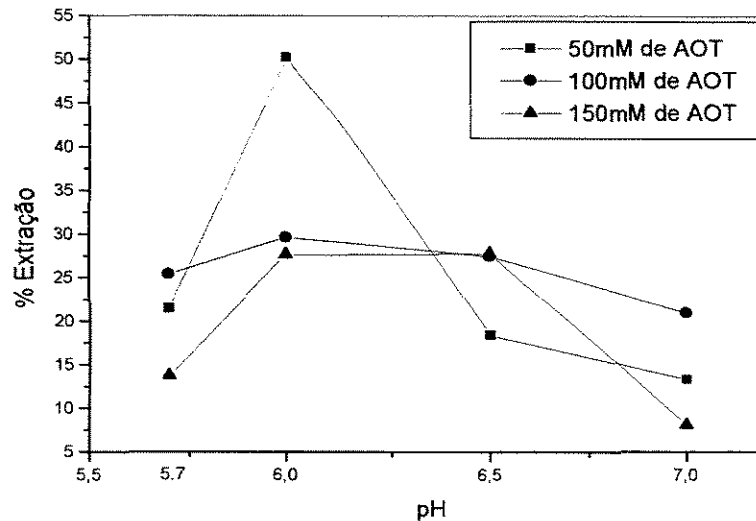


FIGURA 4.3 Porcentagem de extração de tripsina em 50mM; 100mM; 150mM de AOT em isooctano em pH's 5.7; 6.0; 6.5; 7.0.

Como se pode observar na Figura 4.3, no pH 6.0 se obteve sempre a melhor extração, independente da concentração de AOT. Dentro do valor de pH 6.0, o melhor valor obtido foi com 50mM de AOT.

Este resultado foi descrito por Carneiro da Cunha (1995), que observou que uma maior quantidade de cutinase foi extraída da fase aquosa com o aumento dos tempos de extração de 10 minutos para 2 horas. Com 50mM de AOT, observou-se um aumento na extração de cerca de 1,4 vezes; com 100mM de 1,2 vezes e com 150mM a quantidade permaneceu constante em relação à extração feita, sem a observação do tempo.

Pires (1996) afirmou que o aumento na concentração de surfactante favorece a solubilização da proteína na fase orgânica, resultante em picos largos de pH de solubilização. Por outro lado, maiores concentrações de surfactante tornam difícil a extração de proteínas para uma segunda fase aquosa.

Portanto, a concentração ótima de surfactante em um sistema de extração e reextração é a quantidade necessária para atingir a máxima transferência de massa entre as fases.

O maior problema encontrado, se a concentração de AOT for muito alta, é a ocorrência de uma emulsão estável (que foi chamada de ‘terceira fase’ por muitos autores). O problema maior, porém, está na reextração, pois a proteína pode ficar retida nesta emulsão, como também se desnaturar mais facilmente.

Desta maneira, a concentração de AOT, escolhida para ser aplicada na extração contínua, foi a de 50mM, visando não só a máxima extração como também uma excelente reextração.

Realmente, a concentração de surfactante é um parâmetro importante para a otimização da extração de proteína em microemulsões. Podemos citar na literatura a determinação destes valores ótimos por Hentsch *et al.* (1992) para a extração de 15 μ M de α -quimotripsina em tampão de cloreto de sódio de 0.2M, pH 5,0, utilizando várias concentrações de AOT. O resultado observado foi que, em baixas concentrações de AOT (<2.5mM), o coeficiente de partição é pequeno porque o número de micelas é menor que o número de moléculas de proteína.

Se é assumido que uma micela pode encapsular somente uma molécula de proteína, a capacidade de extração será limitada pelo número de micelas presentes. Este fenômeno também explica o pequeno coeficiente de transferência de massa medido a baixas concentrações de AOT. Entretanto, em baixas concentrações de AOT, a probabilidade de agregação das proteínas e micelas reversas é fortemente reduzida. Para uma concentração de AOT de 10mM, um coeficiente de partição ótimo é obtido, e desta maneira valores acima de 10 mM até 300 mM, toda a α -quimotripsina foi extraída. Uma rápida separação de fases (menos de 1 minuto) é observada em estudos de equilíbrio e a proteína não foi desnaturada.

Na reextração, Hentsch *et al.* (1992) observou que a fração de α -quimotripsina extraída diminuía com o aumento da concentração de AOT. Durante a reextração, há uma forte influência da concentração de AOT nas características físicas do sistema de fases. A baixas concentrações de AOT, a separação de fases leva menos de 1 minuto, e a interface

aparece clara. Entretanto, a concentrações maiores de 50mM, uma chamada terceira fase (emulsão branca estável) aparece na interface e a proteína não pode ser reextraída pois ficou aprisionada na emulsão ou desnaturou-se.

4.2 REEXTRAÇÃO

A reextração é uma etapa importante neste estudo, para que se possa verificar se a extração foi realmente satisfatória na recuperação da proteína, pois o sistema só é válido se conseguirmos transportar a micela com proteína da fase orgânica para uma nova fase aquosa e, deste modo, finalizar a extração de proteína propriamente dita.

A partir da solução aquosa de pH 6.0, em tampão 0.1M de fosfato de sódio, com 30 μ M de tripsina e solução orgânica de 50mM de AOT em isooctano, se obteve a extração. Para a reextração, optou-se por utilizar uma solução aquosa de pH 6.0 tamponada e 1.0M KCl, baseado em experimentos relatados na literatura.

Carneiro da Cunha (1995) testou diferentes tipos de sais de modo a melhorar o rendimento do processo de reextração. A fase micelar, proveniente da extração a pH 9.0, foi misturada com uma fase aquosa tamponada (hidroximetilaminoetano, HCl 50mM e pH 9.0) com 100mM de NaCl, LiCl.H₂O, CaCl₂ e KCl. Os resultados obtidos para a recuperação da cutinase para uma nova fase aquosa, com diferentes tipos de sais, indicaram uma diminuição de proteína reextraída e um aumento da proteína precipitada na interfase, com os outros sais testados, quando comparados com KCl.

Estes resultados concordam com os estudos desenvolvidos por Leodidis e Hatton (1989), que permitiram desenvolver um modelo que prevê a seletividade do sal na solubilização, em micelas reversas de AOT. O tipo de íon no sistema afeta a solubilização da proteína por causa de uma proteção eletrostática dos grupos polares do tensoativo e deste modo impede as interações entre a proteína e o tensoativo. Como o raio atômico do

K^+ (1.33 Å) do KCl é maior do que os demais íons estudados, o efeito de proteção é maior sendo menor a ligação entre proteína-tensoativo, o que facilita a reextração da proteína.

Chang (1994) testou diferentes tipos de sais na reextração e recuperação da atividade da enzima, na proteína modelo tripsina bovina (30mM tampão, pH 11, com 0.3M KCl; 30mM tampão, pH 11, com 0.3M $(NH_4)_2CO_3$; 30mM tampão, pH 7.5, com 1.0 M KCl). Apenas a solução aquosa (30mM tampão, pH 7.5, com 1.0 KCl) utilizada para a reextração preservou a atividade elevada ao final do ciclo de extração.

O resultado obtido no experimento da reextração de tripsina com uma nova fase aquosa (pH 6.0 tamponada em fosfato de sódio e 1.0M KCl), descrita no capítulo anterior, foi de 16% (este valor foi uma média de três experimentos).

4.3 EXTRAÇÃO CONTÍNUA

A extração contínua da tripsina foi realizada utilizando-se uma micro-coluna de campânulas pulsadas, descrita no capítulo anterior. Os principais aspectos que motivaram o projeto desta coluna são: aumentar o tempo de contato entre as fases; a necessidade de promover uma agitação suave, que não provoque a desnaturação das proteínas e a necessidade de se obter um equipamento fácil de construir e de operar.

Esta coluna foi operada com os parâmetros ótimos encontrados na extração por batelada. A alimentação de entrada da fase aquosa foi de 2.83ml/min, sendo constituída de 30 μ M de tripsina em pH 6.0 de 0.1M tampão fosfato de sódio. A alimentação da fase orgânica na entrada foi de 3.00ml/min, 50mM de AOT em isooctano.

Foi adicionado 0.01M KCl para melhorar a separação de fase, visto que o primeiro teste (usado apenas como ensaio) não ocorreu de maneira satisfatória. Por isso, foi adotada esta quantidade de sal, baseada nos estudos já mencionados no sistema em batelada.

Com as fases já estabelecidas, passou-se a operar a coluna. Verificou-se inicialmente a influência da frequência do pulsos: 0,143 (1/7 pulso); 0,2 (1/5 pulso); 0,33 (1/3 pulso); e 1,0 (1/1 pulso) pulsos/segundo, na extração da proteína. Cada ponto dos dados analisados que aqui se encontram são a média aritmética de duas corridas feitas em cada pulso.

Espera-se que, com o aumento da agitação imposta às fases através do aumento da frequência de pulsação, a transferência de massa aumente. Isto poderá ocorrer porque as fases se misturam melhor e também porque a agitação diminui o diâmetro das gotas da solução. A agitação quebra as gotas maiores da fase orgânica em gotas menores, aumentando, assim, a área de contato entre as fases. Como a área de contato entre as fases é proporcional à transferência de massa, com o aumento da área interfacial ocorre um aumento da transferência de massa.

Porém, esses fatores não são favoráveis à transferência de massa indefinidamente. Há um limite para a quebra das gotas. Abaixo de um certo diâmetro, as gotas tornam-se tão pequenas que podem ser carregadas pela fase aquosa, o que prejudica a transferência de massa. Isso pode acontecer também devido ao aumento da vazão. Vazões muito elevadas podem carregar as gotas da fase dispersa. Com isso, o contato entre as fases é prejudicado e a transferência de massa diminui.

Uma das vantagens das colunas pulsadas é que o movimento que promove a agitação é aplicado na direção do escoamento das fases. Por causa disso, mesmo com alta frequência, não há força que impeça o escoamento das fases e diminua a extração.

A partir desta discussão feita, os dados obtidos nos experimentos serão comentados em todas as frequência de pulsos examinados, que serão representados por gráficos e seus valores em forma de tabela em uma planilha completa no anexo II.

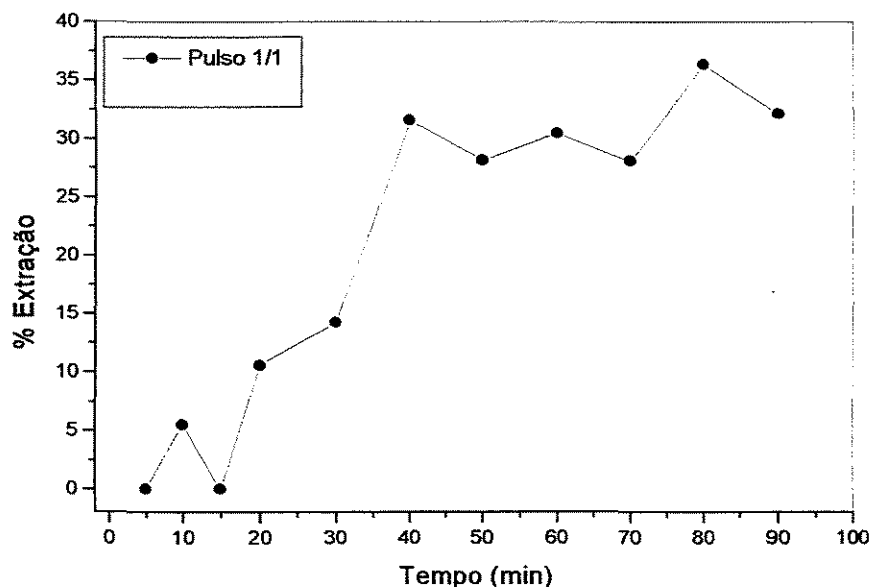


FIGURA 4.4 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna.

No experimento com frequência dos pulsos 1/1, ou seja a maior frequência analisada, representado na Figura 4.4, onde as campânulas se movimentavam a cada segundo (tanto para cima como para baixo, no interior da coluna), observou-se de uma maneira geral que a extração atingiu um estado estacionário por volta dos 40 minutos de ensaio, chegando a extrair 36,34% em 80 minutos de operação. Nos primeiros minutos, apesar de ter havido extração, a visualização da separação de fase não foi observada, e as amostras retiradas estavam muito turvas. Isto se deve ao fato que a coluna não havia chegado ao regime estacionário. Esta hipótese veio ser confirmada depois pelos resultados determinados por espectrofotometria.

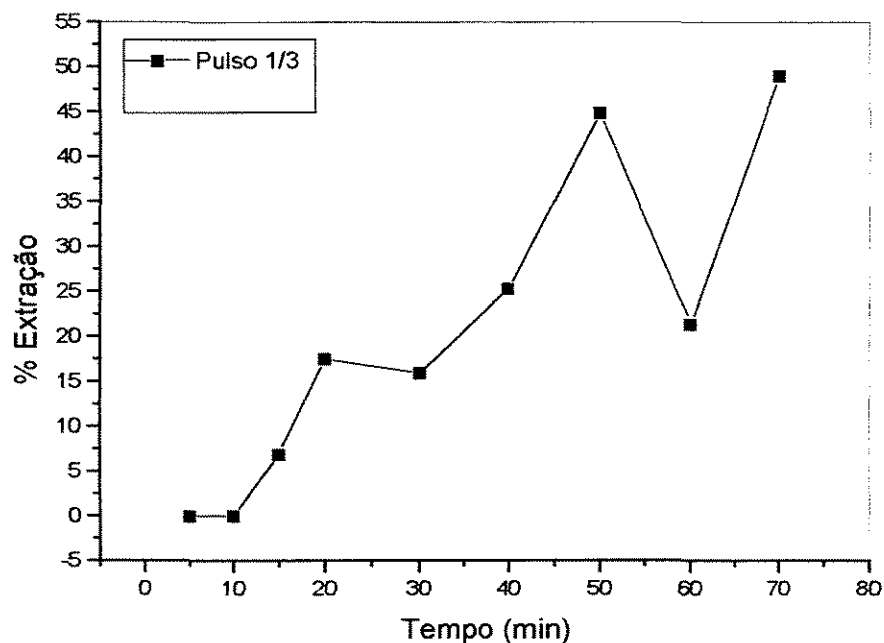


FIGURA 4.5 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), em relação ao tempo de operação da coluna.

No ensaio com frequência de pulso 1/3 (onde as campânulas ficaram três segundos na posição superior da coluna e um segundo na posição inferior da coluna) observa-se, pelo gráfico da Figura 4.5, que nos primeiros 10 minutos não houve nenhuma extração, e, a partir dos 20 minutos, a extração começou a ocorrer de uma maneira satisfatória. Aos 60 minutos, houve uma queda na transferência de proteína da fase aquosa para a fase orgânica, e isto foi provavelmente devido a um erro experimental ocorrido nesta amostra. Desta maneira a extração atingiu o regime estacionário em 40 minutos.

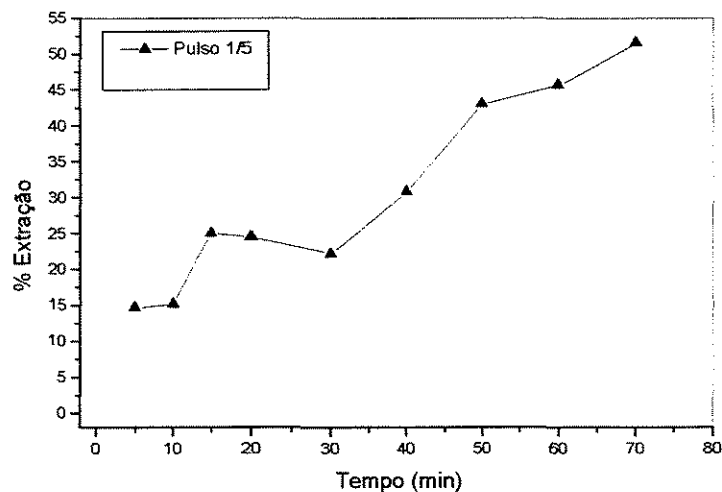


FIGURA 4.6 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 0.20 pulso/segundo (Pulso 1/5), em relação ao tempo de operação da coluna.

Neste ensaio observa-se pelo gráfico da Figura 4.6 uma extração praticamente linear em função do tempo de retirada das amostras. Isto demonstra que a agitação feita pelo movimento das campânulas (as campânulas ficaram cinco segundos na posição superior da coluna e um segundo na posição inferior da coluna) foi bastante eficiente para promover a transferência de massa levando sempre a um aumento na extração. A partir de 40 minutos de operação da coluna, pôde ser visualizada a separação das duas fases.

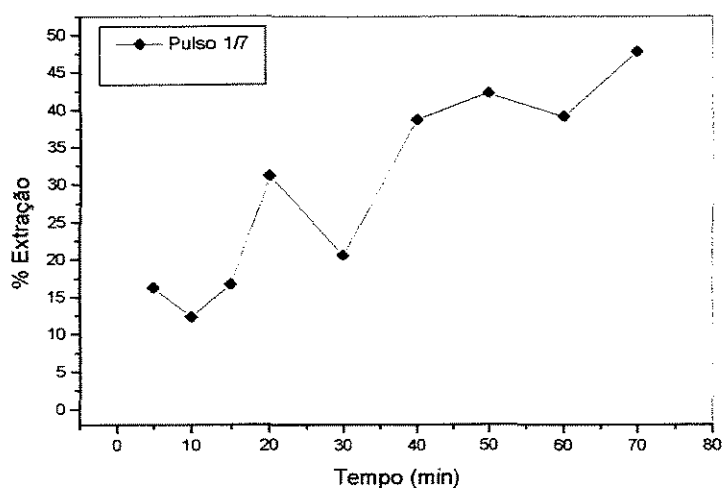


FIGURA 4.7 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), em relação ao tempo de operação da coluna.

A frequência de pulso de maior intervalo (onde as campânulas ficaram sete segundos na posição superior da coluna e um segundo na posição inferior da coluna) representada pela Figura 4.7, apresentou uma extração bastante oscilatória, ainda que sempre aumentando a transferência de massa em relação ao tempo. No tempo final do ensaio registrou-se uma solubilização de 47,79%.

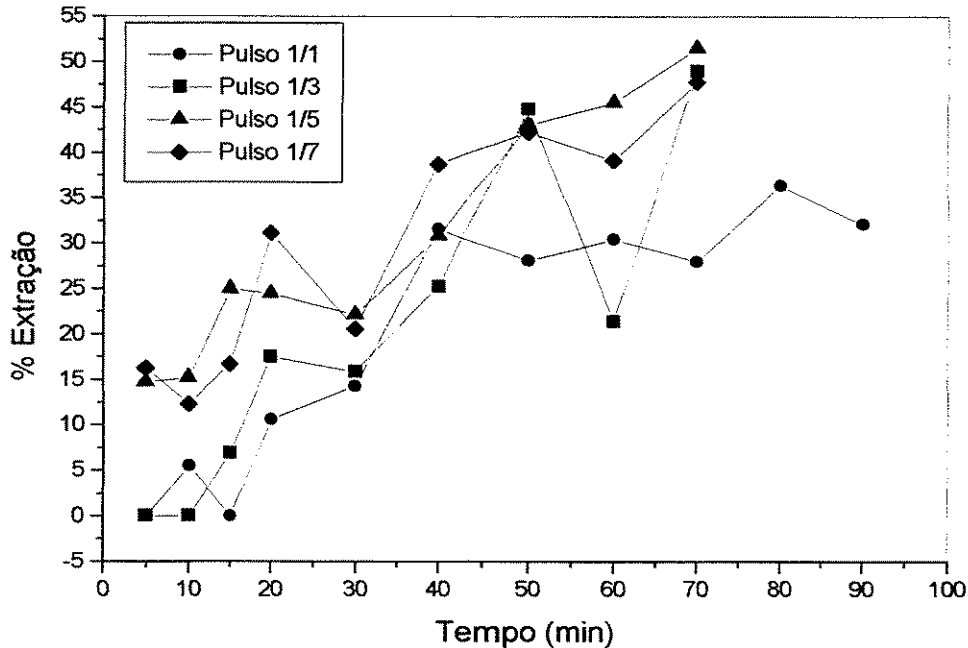


FIGURA 4.8 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulsos: 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna.

Num aspecto geral os ensaios (Figura 4.8), apresentaram um aumento de extração ao longo do período de experimento. Em geral, o regime de equilíbrio de separação de fase e extração se deu em torno de 40 minutos.

Pode-se também notar que, em torno de 30 minutos, todos os experimentos apresentaram um decréscimo na extração. Também aos 30 minutos ocorrem condições de saturação da fase orgânica na coluna o que veio acarretar um decréscimo na extração. Esta

saturação coincide com condição de emulsão estável, e foi observada usualmente em todos os experimentos.

4.3.1 REEXTRAÇÃO

Em todos os experimentos foi realizada reextração ao final da extração contínua, para verificar a quantidade de tripsina que ficou na fase micelar, e assim recuperada.

Todas as amostras retiradas ao longo dos ensaios foram submetidas a reextração como descrito no capítulo anterior. Os resultados destes experimentos são mostrados nas Figuras 4.9 à 4.12. A porcentagem de reextração é calculada sobre a porcentagem extraída e não sobre a porcentagem total de tripsina alimentada inicialmente na coluna, como já apresentado.

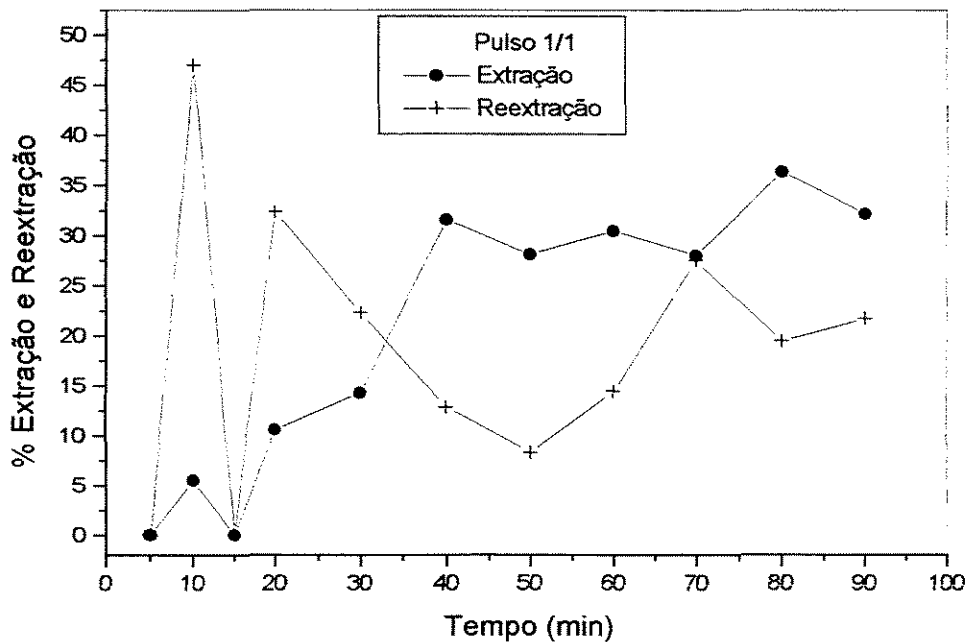


FIGURA 4.9 Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas na frequência de pulso de 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna.

A porcentagem da reextração observado na figura 4.9, na frequência de pulso 1/1, foi em torno de 22%, excluídos os pontos 10 minutos (46,99%) e 50 minutos (8,28%) .

Desta maneira, pode-se concluir que no sistema extração-reextração consegue-se recuperar 22% da tripsina alimentada na coluna, sendo que este valor é maior que o encontrado no sistema de batelada, que foi de 16% de recuperação.

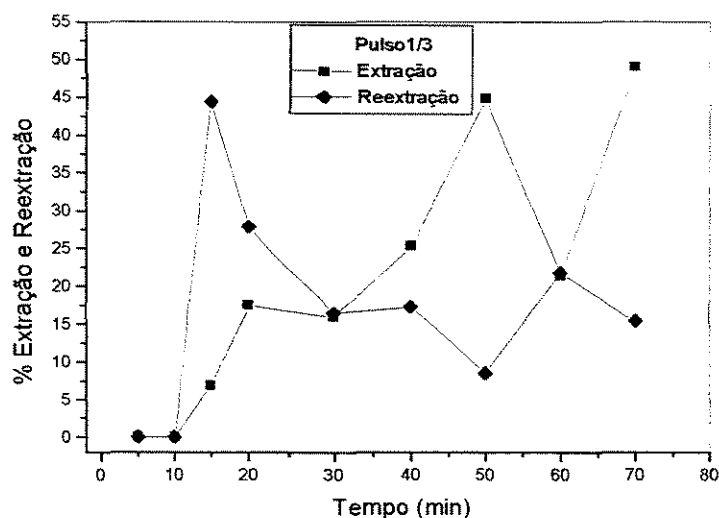


FIGURA 4.10 Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de câmpulas pulsadas na frequência de pulso de 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), em relação ao tempo de operação da coluna.

A frequência de pulso 1/3 demonstrada na Figura 4.10, apresentou um máximo reextração em 15 minutos de 44.39%, e um mínimo de 8.47% de reextração em 50 minutos.

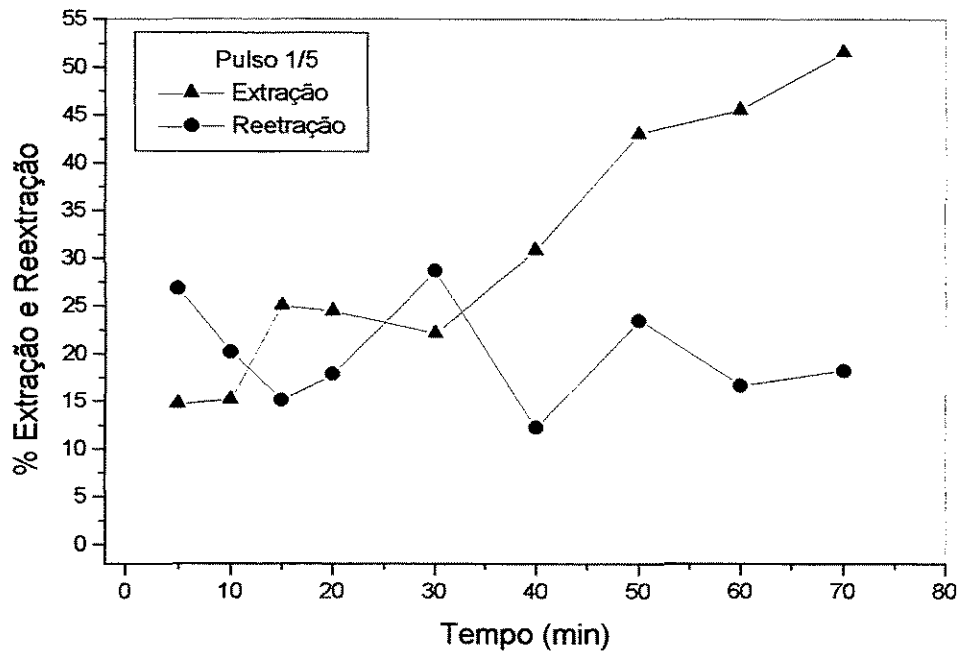


FIGURA 4.11 Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de câmpulas pulsadas na frequência de pulso de 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), em relação ao tempo de operação da coluna.

Na reextração na frequência de pulso 1/5 (Figura 4.11) verificou-se que a recuperação girou em torno de 15 a 20% . Notou-se uma elevada extração de 57.41% (70 minutos) na Figura 4.6, e no entanto uma baixa reextração 18% (70 minutos) na Figura 4.11, o que indica ocorrência de desnaturação de tripsina, ou até mesmo a não formação da micela.

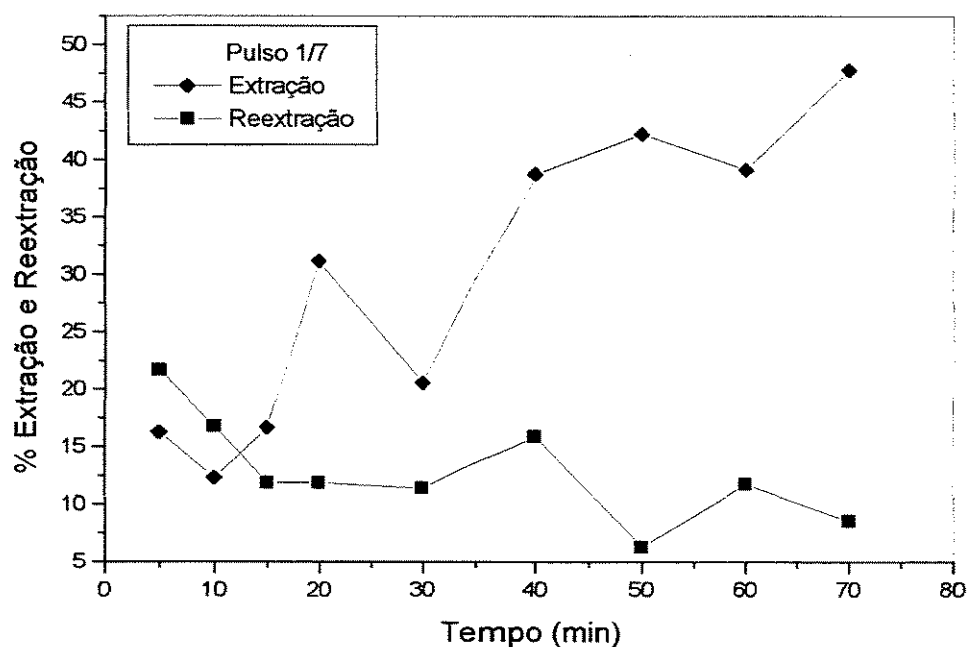


FIGURA 4.12 Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de câmpulas pulsadas na frequência de pulso de 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), em relação ao tempo de operação da coluna.

Na reextração de frequência de pulso 1/7, obteve-se em média 10% de recuperação. Uma porcentagem baixa comparada à reextração em batelada, que foi de 16%. Isto vem explicar também o resultado obtido na frequência de pulso de 1/5, onde se obteve um rendimento baixo de reextração em comparação à quantidade de proteína extraída.

Este fato é explicado pelo motivo que a tripsina esteve em maior contato com a fase orgânica antes desta ser “quebrada” em gotículas pelas câmpulas, para que houvesse uma melhor interação entre as micelas reversas e a proteína, e desta maneira a tripsina acabou se desnaturando-se pelo maior tempo de contato com o isooctano.

4.3.2 EXTRAÇÃO CONTÍNUA COM “BY PASS”

Visando estabelecer uma extração contínua com uma vazão menor de AOT/ isooctano (fase orgânica) na coluna, foi proposta a construção de um “by-pass” na entrada da coluna, que dividiu a vazão pela metade. Assim, a vazão de alimentação caiu de 3,0ml/min para 1,5ml/min de fase orgânica.

Desta maneira foi verificada a influência da frequência do pulsos: 0,143 (1/7 pulso); 0,2 (1/5 pulso); 0,33 (1/3 pulso); e 1,0 (1/1 pulso) pulsos/segundo , na extração da proteína, com uma vazão menor.

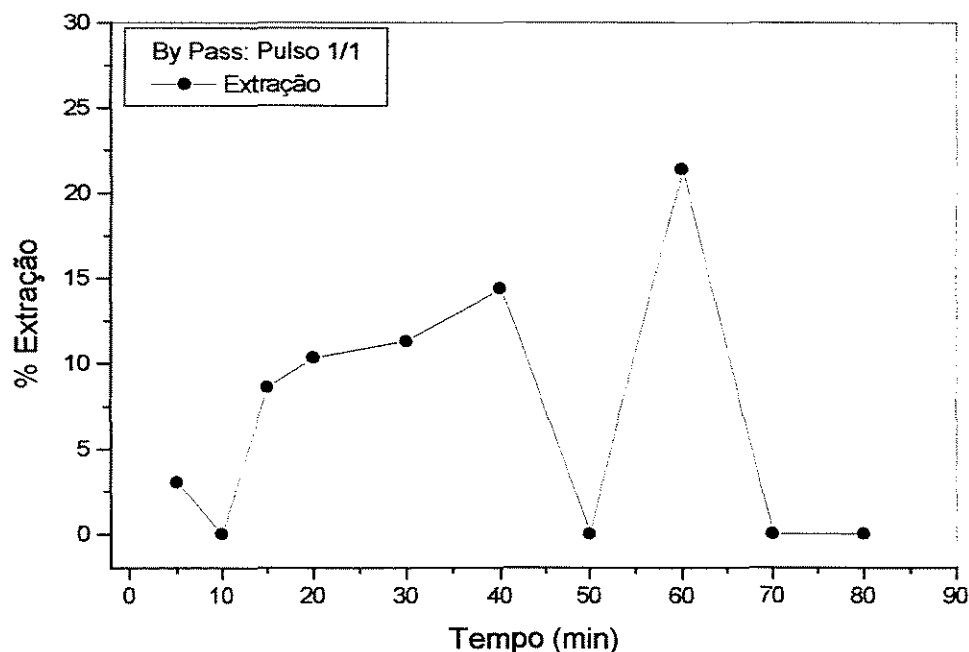


FIGURA 4.13 Porcentagem de extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna.

No pulso 1/1 com “by pass”, observa-se no gráfico da Figura 4.13 que a extração não passou de 21,38% (60 minutos), sendo que depois deste valor não houve mais extração.

Num aspecto geral, comparando com a frequência do pulsos 1/1 sem “by-pass” , a extração não foi satisfatória, pois visto que sem “by-pass” a extração chegou a 36,14% (80 min).

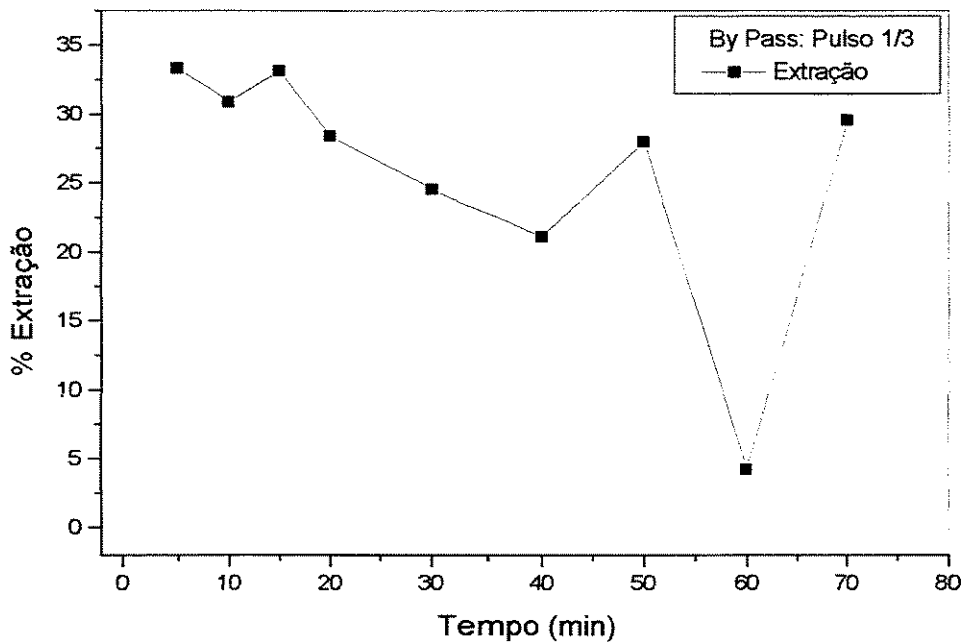


FIGURA 4.14 Porcentagem de extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), em relação ao tempo de operação da coluna.

Na Figura 4.14 observa-se que a porcentagem de extração ficou em média em 22% a 33%, excluindo o ponto de 60 minutos que foi de 4,24% de extração, que é provavelmente um erro experimental.

Comparando com o ensaio sem “by-pass”, verificou-se que apesar deste ter apresentado dois pontos, um com 44,83% extração (50min) e outro com 48,98% extração (70min) de extração, de uma maneira geral o ensaio com “by-pass” obteve um resultado de extração regular em todo o experimento, mostrando assim uma frequência de pulsação ideal para operação da coluna.

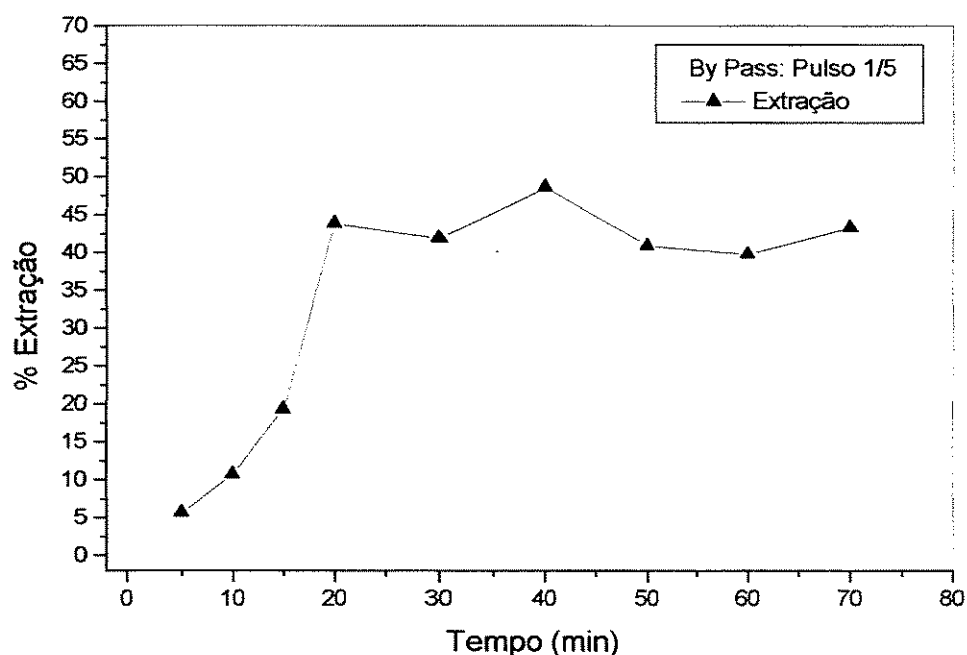


FIGURA 4.15 Porcentagem de extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), em relação ao tempo de operação da coluna.

Na frequência do pulsos 1/5 com “by-pass” a extração chegou ao regime estacionário em 20 minutos, e a partir deste ponto apresentou uma extração em torno de 42%, sem muita oscilação deste valor

Observando a Figura 4.15 e comparando-se com a Figura 4.6, nota-se que os dois ensaios foram bastante satisfatórios, um porque teve uma extração crescente (Figura 4.6), outro por ter apresentado uma extração regular contínua (Figura 4.15). Isto vem certificar

que a frequência de pulso 1/5, tanto com e sem “by-pass”, tem o mesmo comportamento na operação da coluna.

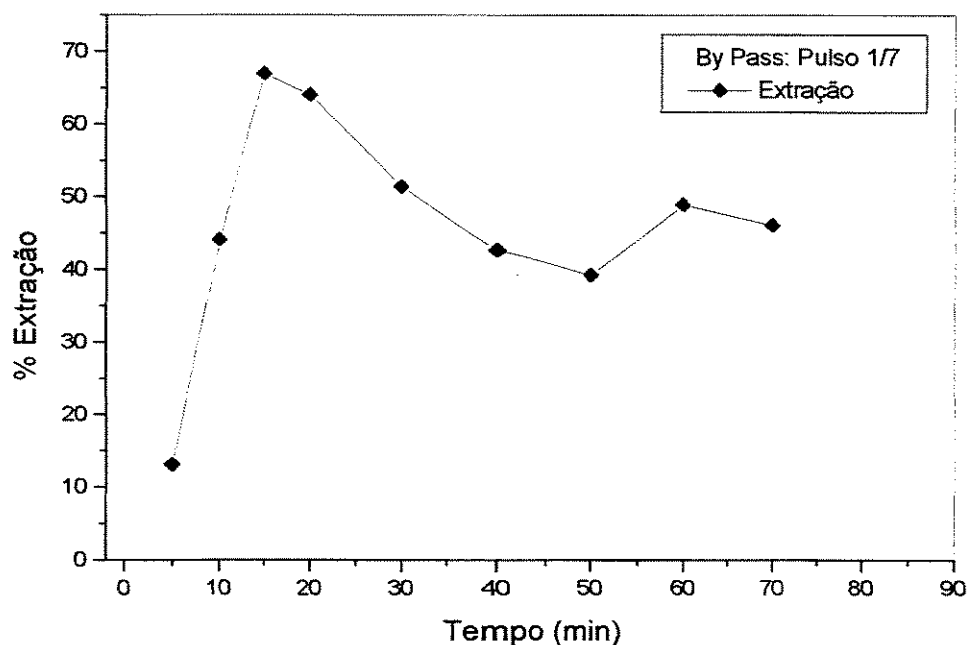


FIGURA 4.16 Porcentagem de extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), em relação ao tempo de operação da coluna.

Na frequência do pulsos 1/7 com “by-pass” (Figura 4.16) o regime estacionário se deu em 15 minutos de operação, obtendo-se 66,94% de extração.

Este ensaio com “by-pass” foi em que se obtiveram os melhores resultados de extração entre todos os experimentos com “by pass”, cujo valor ficou em torno de 45% de extração. Isto também se verificou com o ensaio de extração sem “by-pass”, que também apresentou um dos maiores resultados de extração entre os experimentos.

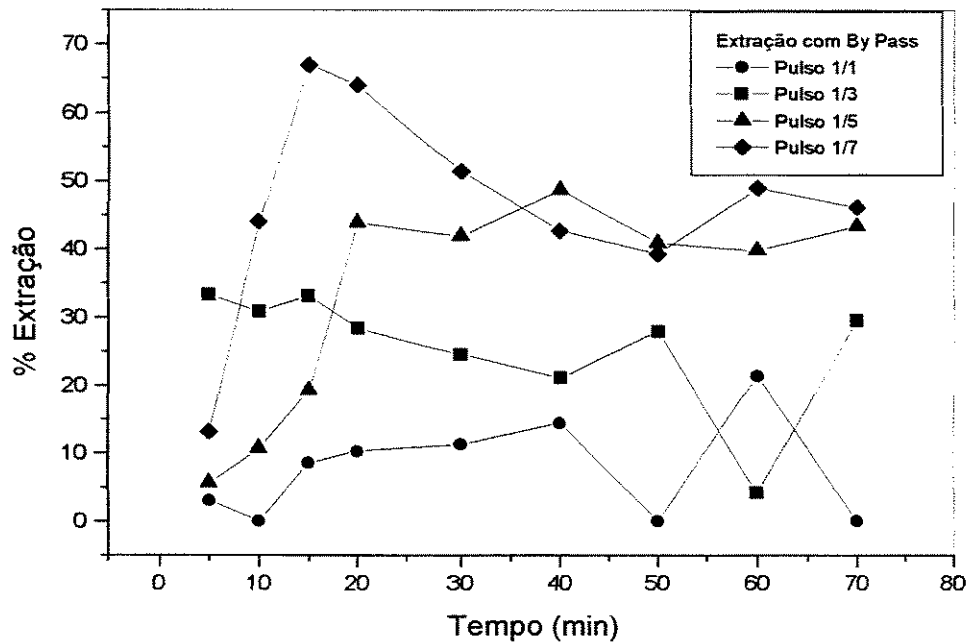


FIGURA 4.17 Extração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulsos: 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna.

Pode-se notar através da Figura 4.17, que diferente da extração sem “by-pass”, que foi caracterizada por apresentar o ponto de regime estacionário em 40 minutos, este experimento apresentou diferentes pontos de regime estacionário, prevalecendo o ponto em 15 minutos. Verificam-se também que os pulsos 1/1 e 1/3 apresentaram uma porcentagem de extração menor que os pulsos 1/5 e 1/7.

4.3.3 REEXTRAÇÃO CONTÍNUA COM “BY PASS”

Na extração com by-pass foi também efetuada a reextração para verificar a porcentagem de proteína recuperada.

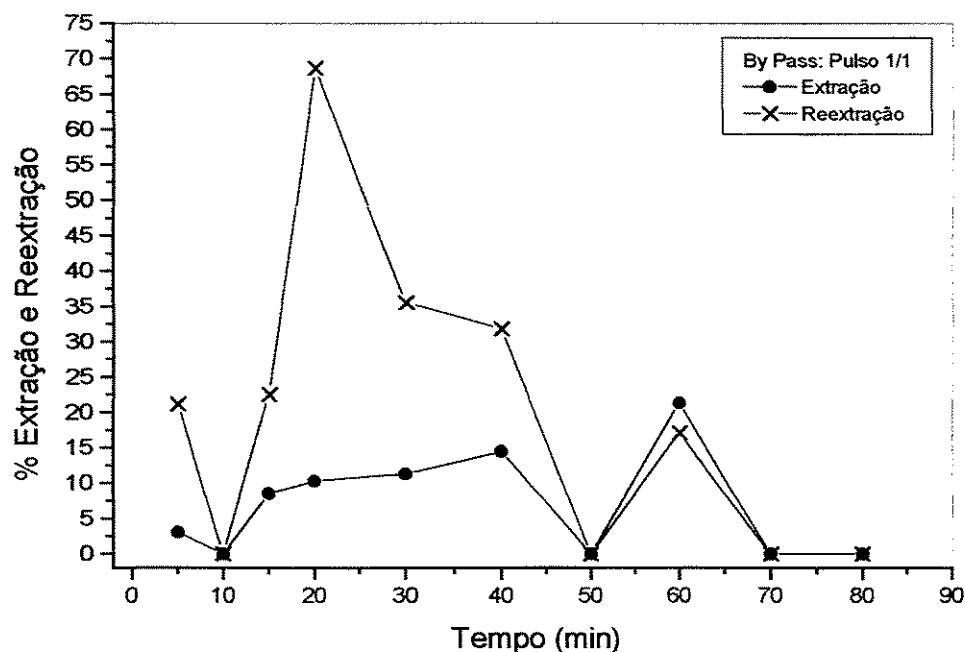


FIGURA 4.18 Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 1.0 pulso/segundo (Pulso 1/1), em relação ao tempo de operação da coluna.

Na reextração com frequência de pulso 1/1 (Figura 4.18), apesar de apresentar quatro pontos (10, 50, 70 e 80 minutos) com reextração nula, os outros pontos apresentaram uma porcentagem maior do que a encontrada na reextração por batelada (16%).

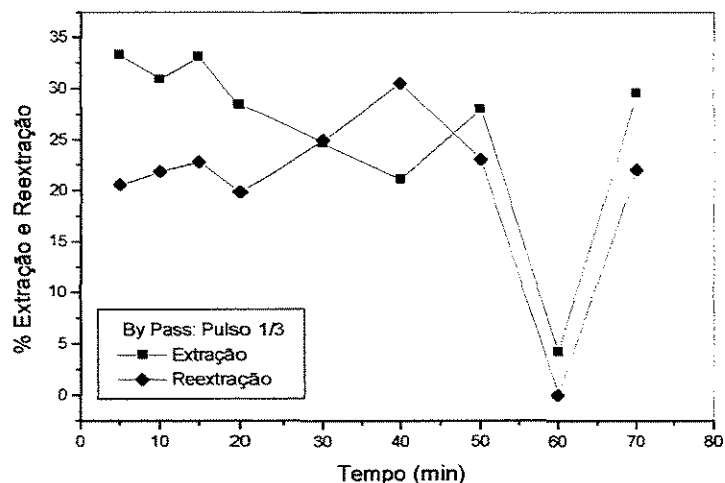


FIGURA 4.19 Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de câmpulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.33 pulso/segundo (Pulso 1/3), em relação ao tempo de operação da coluna.

Retirando o ponto de 60 minutos do gráfico da Figura 4.19, no qual reextração foi nula, de uma maneira geral a reextração ficou em torno de 20%. A máxima reextração ocorreu aos 40 minutos e foi de 34,54%.

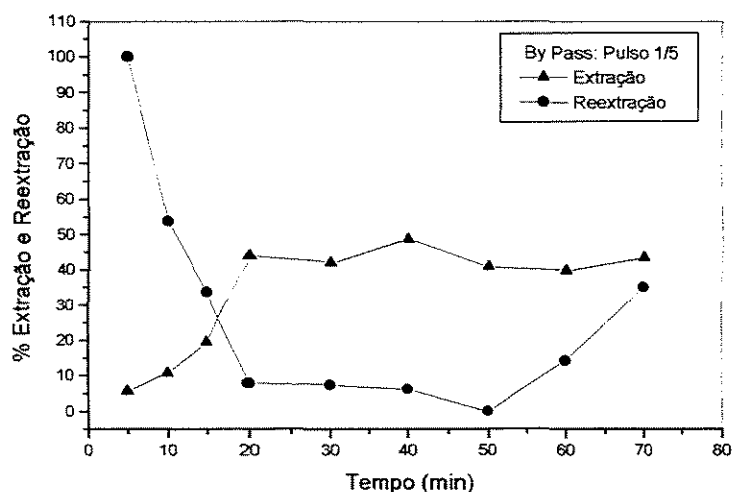


FIGURA 4.20 Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de câmpulas pulsadas com by pass na frequência de pulso de 0.2 pulso/segundo (Pulso 1/5), em relação ao tempo de operação da coluna.

Apesar da frequência de pulso 1/5 ter apresentado uma excelente extração (Fig. 4.20), a reextração resultou em valores muito baixos, excluindo os pontos 10 e 15 minutos que apresentaram valores elevados de reextração. Pode-se concluir que a frequência de pulso 1/5 demonstra um sistema de extração e reextração não complementar em relação aos resultados desejáveis, na operação da coluna de campânulas pulsadas. O ponto de 5 minutos não foi analisado pois apresenta erro experimental.

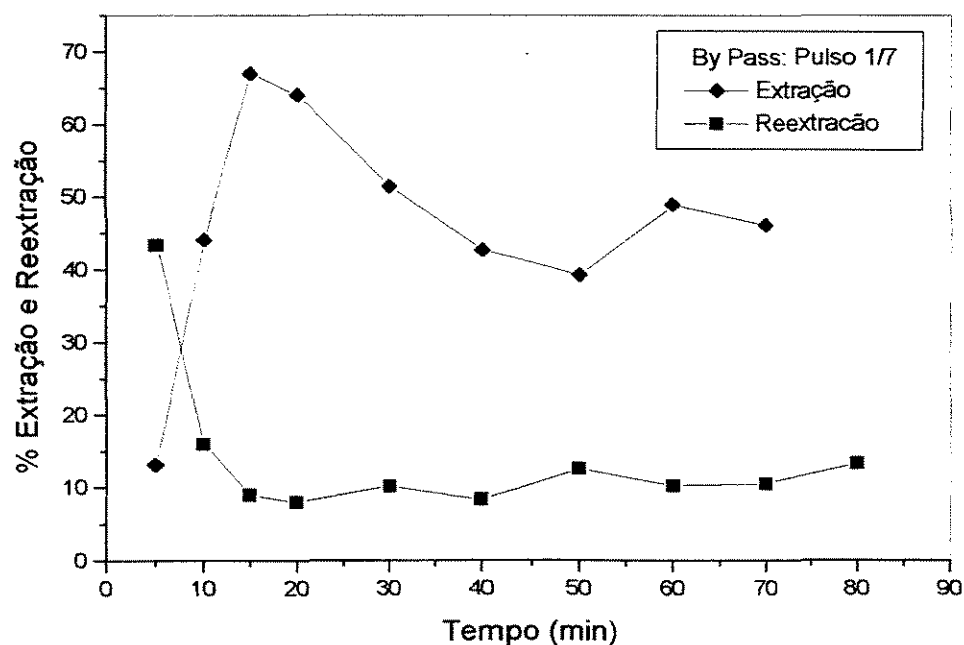


FIGURA 4.21 Porcentagem de extração e reextração de tripsina em uma micro-coluna de campânulas pulsadas com “by pass” na frequência de pulso de 0.143 pulso/segundo (Pulso 1/7), em relação ao tempo de operação da coluna.

Da mesma forma que a reextração sem “by pass” na frequência de pulso 1/7 (Fig. 4.12), a reextração com “by-pass” mostrada na Figura 4.21, obteve-se valores baixos, em torno de 10%. Isto demonstra que a agitação das campânulas é muito lenta para que a fase

orgânica seja quebrada em gotículas, e assim a transferência de massa possa ocorrer o mais rápido possível, para que a tripsina não entre em contato com o isooctano num período de tempo elevado, chegando a se desnaturar.

Analisando todos os dados obtidos tanto com e sem “by-pass” na da extração e reextração em conjunto, verificou-se que a melhor maneira de operação micro-coluna é na frequência de pulso 1/3 (0,33 pulso/segundo) com “by-pass”, porque apresentou resultados tanto na extração como na reextração bastante regulares em torno de 25% na extração e 20% reextração, demonstrando assim que, ao mesmo tempo que a agitação não pode ser muito rápida, pois há necessidade de um certo período para que a micela encapsule a tripsina no seu interior antes que outro pulso perturbe as soluções na coluna, não pode ser lenta demais, pois o contato prolongado com o isooctano desnatura a tripsina.

4.4. EFEITO DA VELOCIDADE DE PULSAÇÃO SOB A FRAÇÃO RETIDA DA FASE DISPERSA (FASE ORGÂNICA) ‘HOLD UP’.

A fração da fase dispersa está diretamente relacionada com a quantidade de gotas existentes no interior da coluna, para um dada condição operacional. A formação de gotas não é um processo simples, e está diretamente ligada às condições de agitação, e à velocidade de rotação imposta às fases no interior do equipamento (Souza, 1997).

A influência da velocidade de pulsação na fração retida da fase orgânica foi avaliada na coluna de campânulas pulsadas. O procedimento desta avaliação foi descrito no capítulo anterior, e os dados obtidos estão representados na Tabela(4.5) e Figuras 4.22 e 4.23.

TABELA 4.6 Dados da fração retida da fase orgânica (Hold up) na micro-coluna de câmpânulas pulsadas.

PULSO	VOLUME DA FASE LEVE	VOLUME DA FASE PESADA	VOLUME TOTAL	HOLD UP
1/1	47.00 ml	61.00 ml	108.00 ml	43.51%
1/3	32.50 ml	75.00 ml	107.50 ml	30.23%
1/5	24.90 ml	84.00 ml	108.90 ml	22.86%
1/7	19.00 ml	88.00 ml	107.00 ml	17.75%
1/1 by pass	36.80 ml	71.00 ml	107.80 ml	34.13%
1/3 by pass	47.00 ml	66.00 ml	109.00 ml	43.11%
1/5 by pass	18.40 ml	88.00 ml	106.40 ml	17.29%
1/7 by pass	19.00 ml	88.00 ml	107.00 ml	17.75%

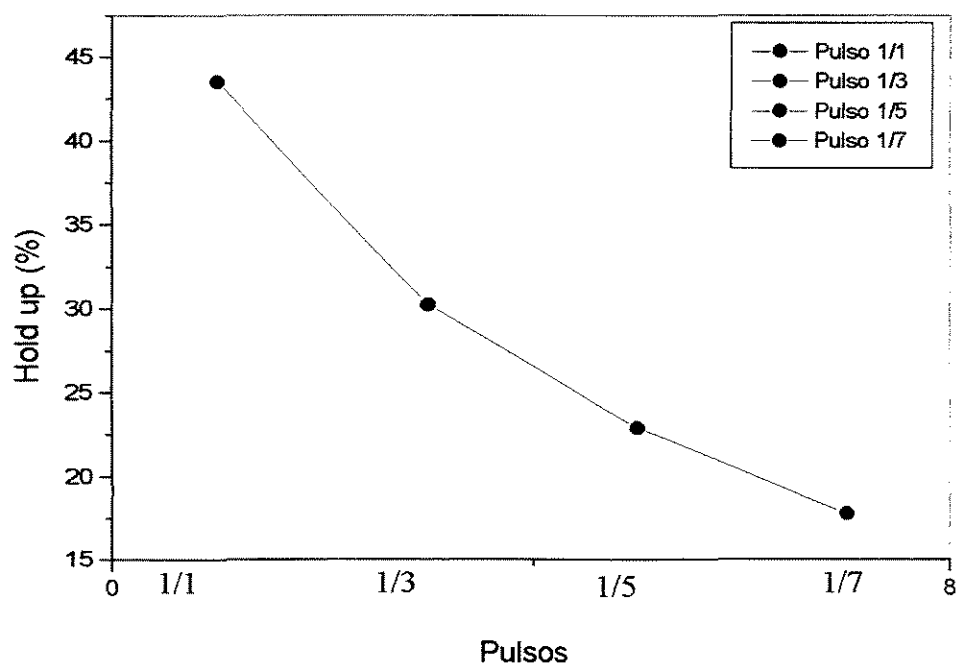


FIGURA 4.22 Fração retida da fase orgânica “Hold up” em relação a frequência de pulsação.

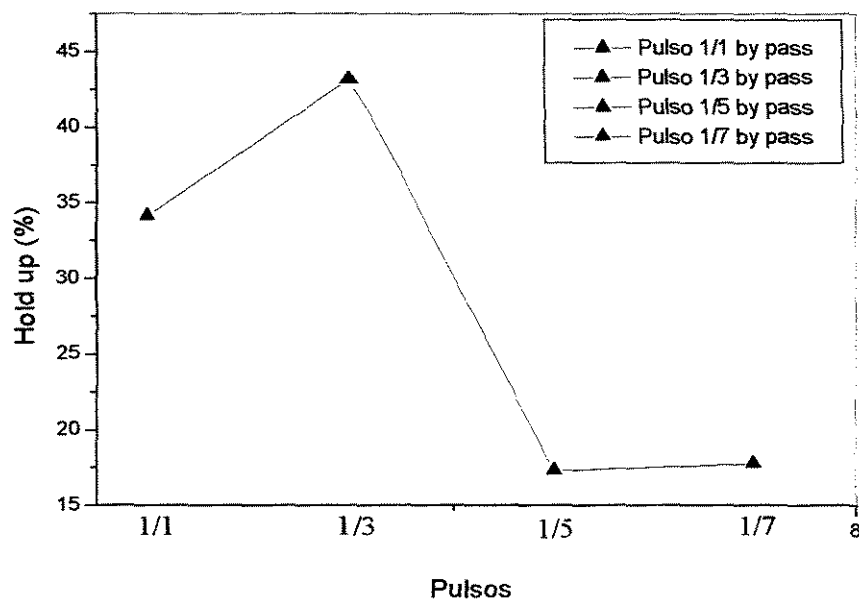


FIGURA 4.23 Fração retida da fase orgânica “Hold up” em relação a frequência de pulsação, com a utilização de “by pass”.

Os dados apresentados nas Figuras 4.22 e 4.23, tanto com ou sem “by pass” apresentam que, quanto menor a frequência de pulsação das campânulas, menor é a fração de fase orgânica retida dentro da coluna, com exceção do pulso 1/3 com “by pass” que apresentou um “hold up” maior que o pulso 1/1.

Pode-se verificar desta maneira que, com frequência pulsações maiores, tem-se maior quantidade de gotas no interior da coluna, e assim maior transferência de massa. Esta conclusão vem ao encontro das hipóteses previstas antes dos experimentos, e vem reafirmar os dados encontrados na reextração, pois estes apresentaram melhores resultados em pulsações maiores, onde realmente havia maior quantidade de gotas formadas, e assim maior probabilidade de que a tripsina pudesse ser encapsulada pela micela sendo extraída, para ser posteriormente reextraída.

5. CONCLUSÃO

Os estudos desenvolvidos no presente trabalho mostram que:

- Na extração através de tubos de ensaio (extração batelada), a extração da tripsina é afetada pelo pH, força iônica e concentração de AOT em isooctano;
- O valor do pH para a máxima extração depende não só do ponto isoeletrico da proteína, como também do peso molecular da proteína e do tensoativo utilizado;
- O parâmetro mais importante observado é a força iônica da solução aquosa, pois é ela que estabelece a interação eletrostática entre a carga da molécula da proteína e a interface da micela, como também a força de repulsão eletrostática entre os grupos polares do tensoativo;
- A concentração do tensoativo (AOT) em isooctano é um fator decisivo para a reextração. Pois, se este valor for muito alto, a reextração da proteína por uma nova fase aquosa será prejudicada, pela formação de emulsão e posteriormente a desnaturação da proteína;
- A extração contínua de micelas reversas por uma micro-coluna de campânulas pulsadas foi bastante adequada, obtendo-se valores em torno de 50% de extração em alguns ensaios;
- A frequência de pulsação da coluna influi diretamente na extração da proteína, mostrando que num sistema de extração e reextração de tripsina uma frequência de pulso de 0.33 pulso/segundo é a mais indicada, pois apresentou uma maior recuperação de proteína alimentada na coluna.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos, propomos para trabalhos futuros os seguintes itens:

- 1- A elaboração de uma nova coluna de câmpânulas pulsadas interligada à já existente, para que se possa promover uma reextração contínua.
- 2- Verificar a extração de uma proteína na coluna de câmpânulas pulsadas a partir de uma solução de extrato fermentativo.
- 3- Obtenção de uma modelagem matemática da coluna, para se promover o scale-up do processo.
- 4- Estudar através de métodos apropriados a atividade total da tripsina durante os ensaios.
- 5- Fazer um isolamento térmico da coluna para estudar a influência da temperatura no processo de extração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, M.; Yamazaki, M.; Harada, M.; Shioi, A.; Katch, S. - Bioaffinity separation of trypsin using trypsin inhibitor immobilized in reverse micelles composed of a nonionic surfactant. *Biotechnology and Bioengineering*, **1997**, 53(4), 406.
- Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. - Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering*, **1991**, 38, 1302.
- 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. *Biotechnology Techniques*, **1995**, 9(4), 265.
- Andrews, B. A.; Haywood, K. - Effect of pH, ion type and ionic strength on partitioning of proteins in reverse micelle systems. *Journal of Chromatography*, **1994**, 688, 55.
- Andrews, B. A.; Pyle, D. L.; Asenjo, J. A. - The effect of pH and ionic strength on partitioning of four proteins in reverse micelle systems. *Biotechnology and Bioengineering*, **1994**, 43, 1048.
- Arcoleo, V.; Goffredi, M.; Liveri, V. T. - Electrical conductivity and permittivity of water-AOT-h-heptane microemulsions. *Journal of Solution Chemistry*, **1995**, 24(11), 1135.
- Asenjo, J. A. - Separation processes in biotechnology. - *Maecell Ddekker*, **1991**, 801.
- Brandani, V.; Di Giacomo, G.; Spera, L. - Recovery of α -amylase extracted by reversed micelles. *Process Biochemistry*, **1996**, 31(2), 125.
- Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R. - Reversed micelles in liquid-liquid extraction, in *Recovery Processes for Biological Materials*, eds. Kennedy, J. F. and Cabral, J. M. S., **1993**, 247, John Wiley & Sons, Chichester.
- Castro, M. J. M.; Cabral, J. M. S. - Stability of hydrogenase in AOT reversed micelles. *Enzyme and Microbial Technology*, **1989**, 11, 668.
- Castro, M. J. M.; Cabral, J. M. S. - Reversed micelles in biotechnological processes. *Biotechnology Adv.*, **1988**, 6, 151.

- 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.*, **1992**, 8, 85.
- Carneiro-da-Cunha, M. G.; Aires-Barros, M. R.; Tambourgi, E. B.; Cabral, J. M. S. - Continuous extraction of a recombinant cutinase from *Escherichia coli* disrupted cells with reversed micelles using a perforated rotating disc contactor. *Bioprocess Engineering*, **1996**, 15(5), 253.
- Carneiro-da-Cunha, M. G. - Separação e purificação de uma cutinase recombinante utilizando sistemas micelares. Tese de doutorado, Universidade Técnica de Lisboa, **1995**.
- Carneiro-da-Cunha, M. G.; Aires-Barros, M. R.; Tambourgi, E. B.; Cabral, J. M. S. - Studies on the extraction and back-extraction of a recombinant cutinase in a reversed micelle extraction process. *Biotechnology Eng.*, **1994a**, 11, 203.
- Carneiro-da-Cunha, M. G.; Aires-Barros, M. R.; Tambourgi, E. B.; Cabral, J. M. S. - Recovery of recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating-disc contactor. *Biotechnology Techniques*, **1994b**, 8(6), 413.
- Carvalho, C. M. L.; Serralheiro, M. L. M.; Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R. - Application of factorial design to the study of transesterification reactions using AOT-reversed micelles. *Enzyme and Microbial Technology*, **1997**, 21, 117.
- Cassiano, D. A. - Otimização da separação de tripsina em sistema de micelas reversas através de análise por superfície de resposta - Dissertação de mestrado, abril de 1999, Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas.
- Chang, P. S.; Rhee, J. S. - Characteristics of *Chromobacterium viscosum* lipase characterized glycerolysis of triglycerides in AOT-isooctane reversed micelles. *Biocatalysis*, **1990**, 4, 335.
- Chang, P. S.; Rhee, J. S.; Kim, J.-J. - Continuous glycerolysis of olive oil by *Chromobacterium viscosum* lipase immobilized on liposome in reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering*, **1991**, 38(10), 1159.

- Chang, Q.-I.; Chen, J.-y. - Liquid-liquid reversed micellar extraction for isolating enzymes: studies on the purification of α -amylase. *Process Biochemistry*, **1996**, 31(4), 371.
- Chang, Q.-I.; Chen, J.-y. - Selective recovery of two enzymes from *Bacillus subtilis* using Aliquat 336 reversed micelles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1996**, 56, 197.
- Chang, Q.-I.; Chen, J.-y. - Reversed micellar extraction of trypsin: effect of solvent on the protein transfer and activity recovery. *Biotechnology and Bioengineering*, **1995**, 46, 172.
- Chang, Q.-I.; Chen, J.-y.; Zhang, X.-F.; Zhao, N.-M. - Effect of the cosolvent type on the extraction of α -amylase with reversed micelles: circular dichroism study. *Enzyme and Microbial Technology*, **1997**, 20, 87.
- Chang, Q.; Liu, H.; Chen, J. - Extraction of lysozyme, α -chymotrypsin, and pepsin into reverse micelles formed using an anionic surfactant, isooctane and water. *Enzyme and Microbial Technology*, **1994**, 16, 970.
- Dahuron, L.; Cussler, E. L. - Protein extractions with hollow fibers. *AIChE Journal*, **1988**, 34, 130.
- Dekker, M.; Hilhorst, R.; Laane, C. - Isolating enzymes by reversed micelles. *Analytical Biochemistry*, **1989**, 178, 217.
- Dekker, M.; Van't Riet, K.; Baltussen, J. W. A.; Bijsterboch, B. H.; Hilhorst, K.; Laane, C. - Reversed micellar extraction of enzymes: investigations on the distribution behaviour and extraction efficiency of α -amylase. In: *Proceedings of the Fourth European Congress on Biotechnology*, **1987**, 2, 507.
- Dekker, M.; Van't Riet, K.; Weijers, S. R.; Baltussen, J. W. A.; Laane, C.; Bijsterboch, B. H. - Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reverse micelles. *Chemical Engineering Journal*, **1986**, 33, B27.
- Dekker, M.; Van't Riet, K.; Van der Pol, J. J.; Baltussen, J. W. A.; Hilhorst, K.; Bijsterboch, B. H. - Effect of temperature on the reversed micellar extraction of enzymes. *Chemical Engineering Journal*, **1991**, 46, 69.

- Dungan, S. R.; Bausch, T.; Hatton, T. A.; Plucinski, P.; Nitsch, W. - Interfacial transport processes in the reversed micellar extraction of proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1991**, 145(1), 33.
- Fiechter, A. - Biosurfactants: moving towards industrial applications, *Tibtechnology*, **1992**, 10, 208.
- Göklen, K. E.; Hatton, T. A. - Protein extraction using reversed micelles. *Biotechnology Progress*, **1985**, 1, 69.
- Göklen, K. E.; Hatton, T. A. - Liquid-liquid extraction of proteins using reversed micelles. *IN-Proceedings*, **1986**, 3, 587.
- Göklen, K. E.; Hatton, T. A. - Liquid-liquid extraction of low molecular-weight proteins by selective solubilization in reversed micelles. *Separation Science and Technology*, **1987**, 22(2 and 3), 831.
- Gonçalves Rodrigues, E. M. - Extração líquido-líquido de xilanase por micela reversa. *Tese de mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena*. **1997**.
- Goto, M.; Ishikawa, Y.; Ono T.; Nakashio, F.; Hatton, T.A. - Extraction and activity of chymotrypsin using AOT-DOLPA mixed reversed micellar systems. *Biotechnology Progress*, **1998**, 14(5), 729.
- Han, D. H.; Lee, S. Y.; Hong, W. H. - Separation of intracellular proteins from *Candida utilis* using reversed micelles in a spray column. *Biotechnology Techniques*, **1994**, 8(2), 105.
- Han, D. H.; Rhee, J. S. - Characteristics of lipase catalysed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. *Biotechnology Bioeng.*, **1986**, 28, 1250.
- Hatton, T. A. - Extraction of proteins and amino acids using reversed micelles, in "Ordered media in chemical separations", eds Hinze, W. L.; Armstrong, D. W. . *ACS Symposium Series*, **1987**, 342, 170.
- Hatton, T. A. - Reversed micellar extraction of proteins, in "Surfactant-based separation processes" - *Surfactant Science Series*, eds. Scamehorn, J. F. and Harwell, J. H., **1989**, 33, 55-90, Marcel Dekker, New York.

- Hauser, H. - Naturally occurring amphiphiles: aspects of their phase behaviour, in *"Reversed micelles-biological and technological relevance of amphiphilic structures in apolar media"*, eds. Luisi, P. L.; Straub, B. E., **1984**, 37, Plenum Press, New York.
- Hentsch, M.; Menoud, P.; Steiner, L.; Flaschel, E.; Renken, A. - Optimization of the surfactant (AOT) concentration in a reverse micellar extraction process. *Biotechnology Techniques*, **1992**, 6(4), 359.
- 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 upon purification efficiency. *Bioseparation*, **1996**, 6, 67.
- Huang, S-Y., Lee, Y-C. - Separation and purification of horseradish peroxidase from *Armoracia Rusticana* root using reversed micellar extraction. *Bioseparation*, **1994**, 4, 1.
- Imai, M.; Natsume, T.; Naoe, K.; Shimizu, M.; Ichikawa, S.; Furusaki, S. - Hydrophilic surroundings requisite for the solubilization of proteins related with their hydrophobicity in the AOT reversed micellar extraction. *Bioseparation*, **1997**, 6, 325.
- Kadam, K. L. - Reverse micelles as a bioseparation tool. *Enzyme and Microbial Technology*, **1986**, 8, 266.
- Kinugasa, T.; Watanabe, K.; Takeuchi, H. - Activity and conformation of lysozyme in reversed micellar extraction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1992**, 31(7), 1827.
- Krei, G. A.; Hustedt, H. - Extraction of enzymes by reverse micelles. *Chemical Engineering Science*, **1992**, 47(1), 99.
- Krei, G. A.; Hustedt, H. - Extraktion von Enzymen mittels reverser Micellen. *Bioengineering*, **1989**, 3 / 4, 32.
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. - Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, **1987**, 30, 81.
- Lehninger, A. L. - Fundamentos de Bioquímica.
- Leodidis, E. B.; Hatton, T. A. - Specific ion effects in electrical double layers: selective solubilization of cations in Aerosol-OT reversed micelles - Journal of American Chemical Society, **1989**, 4, 741.

- Leser, M. E.; Wei, G.; Luisi, P. L.; Maestro, M. - Application of reverse micelles for the extraction of proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1992**, 135(2), 629.
- Levashov, A. V.; Klmelnitsky, Yu. L.; Klyachko, N. L.; Martinek, K - Reversed micellar enzymology, in "*Surfactants in Solution*", vol. 2, eds. Mittal, K. L.; Lindman, B., **1984**, 1069, Plenum Press, New York.
- Luisi, P. L.; Bonner, F. J.; Pellegrini, A.; Wiget, P.; Wolf, R. - Micellar solubilization of proteins in aprotic solvents and their spectroscopic characterization. *Helvetica Chimica Acta*, **1979**, 62, 740.
- Luisi, P. L.; Giomani, M.; Pileni, M. P.; Robinson, B. H. - Reversed micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1988**, 947, 209.
- Luisi, P. L.; Henninger, F.; Jopich, M.; Dossena, A.; Casnati, G. - Solubilization and spectroscopic properties of α -chymotrypsin in cyclohexane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1977**, 74, 1384.
- Luisi, P. L.; Imre, V. E.; Jaeckle, H.; Pande, A. - Microemulsions: proteins and nucleic acids as guest molecules, in "*Topics in Pharmaceutical Sciences*", eds. Breiner, D. D.; Speiser, P., **1983**, 243, Elsevier, Amsterdam.
- Luisi, P. L.; Laane, C. - Solubilization of enzymes in apolar solvents via reverse micelles. *Trends in Biotechnology*, **1986**, june, 153.
- Luisi, P. L.; Magid, L. J. - Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **1986**, 20(4), 439.
- Lye, G. J.; Asenjo, J. A.; Pyle, D. L. - Extraction of lysozyme and ribonuclease-a using reverse micelles: Limits to protein stabilization. *Biotechnology and Bioengineering*, **1995**, 5(5), 509-519.
- Lye, G. J.; Asenjo, J. A.; Pyle, D. L. - Reversed micellar mass transfer process: Spray column extraction of lysozyme. *AIChE Journal*, **1996**, 42(3), 713.
- Marcozzi, G.; Correa, N.; Luisi, P. L.; Caselli, M. - Protein extraction by reverse micelles: a study of the factors affecting the forward and the backward transfer of α -chymotrypsin and its activity. *Biotechnology and Bioengineering*, **1991**, 38, 1239.

- Martinek, K.; Levashov, A. V.; Klyachko, N. L.; Berezin, L. V. - "Catalysis by water soluble enzymes in organic solvents. Stabilization of enzymes against denaturation (inactivation) through their inclusion in reversed micelles of surfactants. *Doklad. Akad. Nauk. SSSR (English Edition)*, **1978**, 236, 920.
- Martinek, K.; Levashov, A. V.; Klyachko, N.; Khmelnitsky, Y. L.; Berezin, I. V. - Micellar enzymology. *European Journal of Biochemistry*, **1986**, 155, 453.
- Martinek, K.; Klyachko, N. L.; Kabanov, A. V.; Khmelnitsky, Y. L.; Levashov, A. V. - Micellar enzymology: its relation to membranology. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1989**, 981, 161.
- Marzzoco, A.; Torres, B. B. - Bioquímica Básica - Editora Guanabara.
- McClements, D. J.; Dungan, S. R. - Light-scattering study of solubilization of emulsion droplets by nonionic surfactant solutions. *Colloids and Surfaces A - Physicochemical and Engineering Aspects*, **1995**, 104(2-3), 127.
- Meyer, U. - Extraktion von Enzymen mittels inversen mizellen. Braunschweig: Technische Universität Braunschweig, 1992, 58 p. (tese de graduação).
- Motonari, A.; Masaru, Y.; Makoto, H.; Aihisa, S.; Shigeol, K. - Bioaffinity separation of trypsin using trypsin inhibitor immobilized in reverse micelles composed of a nonionic surfactant. *Biotechnology and Bioengineering*, **1997**, 53(4), 406.
- 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*, **1995**, 59, 297.
- Nishiki, T., Muto, A.; Kataoka, T.; Kato, D. - Partitioning behavior and enrichment of proteins with reversed micellar extraction: I. forward extraction of proteins from aqueous to reversed micellar phase. *Biotechnology and Bioengineering*, **1993**, 42, 596.
- Nitin, W. F.; Luisi, P.L. - Immobilized enzymes in reverse micelles: studies with gel entrapped trypsin and α -chymotrypsinin AOT reverse micelles. *Biotechnology and Bioengineering*, **1989**, 33, 1277.
- Ottewill, R. H. - Surfactants in solution. *H. L. Mittal e B. Lindman (Eds)*, Plenum Press, **1984**, 1.

- Pires, M. J.; Cabral, J. M. S. - Liquid-liquid extraction of a recombinant protein with a reversed micellar phase, in "*Harnessing Biotechnology for the 21st. Century*", *American Chemical Society*, **1992**, 277.
- Pires, M. J.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. - Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles. *Biotechnology Progress*, **1996**, 12, 290.
- Pires, M. J.; Cabral, J. M. S. - Liquid-liquid extraction of a recombinant protein with reverse micelles. *Biotechnology Progress*, **1993**, 9, 647.
- Pires, M. J.; Cabral, J. M. S. - Liquid-liquid extraction of a recombinant protein with reverse micelles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **1994**, 61, 219.
- Porto, A. L. F. - Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos - Tese de Doutorado, junho de **1998**, Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas.
- Porto, A. L. F.; Lima-Filho, J. L.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S.; Tambourgi, E. B. - Extraction of recombinant cytochrome b5 from disrupted *Escherichia coli* cells with and aqueous two-phase system in a continuous perforated rotating disc contactor. *Biotechnology Techniques*, **1991**, 11(9), 641.
- Quing-long Chang; Jia-yong Chen - Reversed micellar extraction of trypsin: effect of solvent on the protein transfer and activity recovery. *Biotechnology and Bioengineering*. **1994**. 28. 172.
- Quing-long Chang; Jia-yong Chen - Effect of cosolvente type on the extraction of α -amylase with reversed micelles: Circular dichroism study. *Enzyme and Microbial Technology*. **1997**. 20. 87.
- Rabelo, A. P. B. - Aplicação de sistema de duas fases aquosas na partição de citocromo b5 numa micro coluna de campânulas perfuradas pulsadas. *7ª Conferência Internacional de Engenharia Química (CHEMPOR'98)* Lisboa/Portugal. **1998**. 437.
- Rabelo, A. P. B. - Estudo da eficiência de separação numa coluna de extração líquido-líquido mecanicamente agitada por palhetas rotativas. Tese de mestrado em Engenharia Química, UNICAMP., **1995**.

- Rabie, H. B.; Vera, J. H. - A simple model for reversed micellar extraction of proteins. *Separation Science and Technology*, **1998**, 33(8), 1181.
- Rahaman, R. S.; Chee, J. Y.; Cabral, J. M. S.; Hatton, T. A. - Recovery of an extracellular alkaline protease from whole fermentation broth using reversed micelles. *Biotechnology Progress*, **1988**, 4, 218.
- Regalado, C.; Asenjo, J. A.; Pyle, D. L. - Studies on the purification of peroxidase from horseradish roots using reversed micelles. *Enzyme and Microbial Technology*, **1996**, 18, 332.
- Regalado, C.; Asenjo, J. A.; Pyle, D. L. - Protein extraction by reverse micelles: studies on the recovery of horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, **1994**, 44, 674.
- Robinson, B. H. - Microemulsions - properties and novel chemistry. *Chem. Brit.*, **1990**, 342.
- Ruckenstein, E.; Karpe, P. - Structural characterization of α -chymotrypsin containing AOT reversed micelles. *Journal of Phys. Chem.*, **1991**, 95, 1799.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gardner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, C. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. - Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **1985**, 150, 76.
- Souza, R.R. Estudo e desenvolvimento de um extrator de palhetas rotativas. Tese de doutorado, faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, **1997**.
- Tong, J. H.; Furusaki, S. - Mass transfer performance and mathematical modelling of rotating disc contactors used for reversed micellar extraction of proteins. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **1997**, 30(1), 79.
- Tong, J. H.; Furusaki, S. - Mean drop size and size distribution in rotating-disc contactor used for reversed micellar extraction of proteins. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **1995**, 28(5), 582.
- Vicente, M. L. C.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. - Purification of *Chromobacterium viscosum* lipases using reversed micelles. *Biotechnology Techniques*, **1990**, 4, 137.
- Wolberg, R. B. G.; Hilhorst, R.; Voskuilen, G.; Nachtegaal, H.; Dekker, M.; Van't Riet, K.; Bijsterbosch, B. H. - Protein transfer from an aqueous phase into reverse micelles: the

effect of protein size and charge distribution. *European Journal of Biochemistry*, **1989**, 184, 627.

Yu, Z. J.; Neuman, R. D. - Reversed micellar solution to bicontinuous microemulsion transition in sodium bis (2-ethylhexyl) phosphate/n-heptane/water system. *Langmuir*, **1995**, 11(4), 1081.

ANEXO I
Planilha de cálculo de extração em batelada

Amostrax	pH	Solução	Abs1(ajust)	Abs2(ajust)	Abs3(ajust)	Vol aq(ml)1	Vol aq(ml)2	Vol aq(ml)3	massa(ln)1	massa(ln)2	massa(ln)3	Conc(uM)1	Conc(uM)2	Conc(uM)3	Massa1 (g)	Massa2 (g)	Massa3 (g)	% extração1	% extração2	% extração3
1	5,7	0.1M KCL	0,48	0,522	0,515	2,7	2,5	3	2,702	2,148	2,1	27,702	30,111	31,443	0,002	0,002	0,002	17,374	19,395	0,000
2	5,7	0.1M KCL	0,31	0,425	0,572	2,5	2,5	3,1	2,082	2,148	2,1	18,226	21,587	33,016	0,001	0,001	0,002	49,664	34,183	0,000
3	5,7	0.1M KCL	0,431	0,491	0,534	2,6	2,2	3	2,082	2,148	2,1	24,925	28,330	30,805	0,001	0,001	0,002	28,411	33,263	0,000
4	5,7	0.1M tamp	0,366		0,484	3,2		2,7	2,106		2,1	21,298		27,930	0,002		0,002	25,568		17,407
5	5,7	0.1M tamp	0,413		0,448	3		2,5	2,106		2,1	23,914		23,884	0,002		0,001	21,650		29,128
6	5,7	0.1M tamp	0,542		0,38	3		3	2,106		2,1	31,268		22,074	0,002		0,002	0,000		27,473
7	5,7	0.2M tamp	0,468		0,427	2		3	2,1		2,148	27,018		24,699	0,001		0,002	40,818		20,658
8	5,7	0.2M tamp	0,48		0,486	1,8		3	2,1		2,148	27,702		28,044	0,001		0,002	45,388		9,914
9	5,7	0.2M tamp	0,463		0,458	1,8		3	2,1		2,148	26,734		26,450	0,001		0,002	47,296		15,031
10	6	0.1M KCL	0,563	0,568	0,56	3	2,4	3,1	2,214	2,088	2,124	32,490	32,782	32,315	0,002	0,002	0,002	0,000	13,335	0,000
11	6	0.1M KCL	0,547	0,474	0,518	2,8	2,4	3	2,214	2,088	2,124	31,559	27,360	29,881	0,002	0,002	0,002	8,203	27,670	2,930
12	6	0.1M KCL	0,536	0,489	0,547	2,8	2,3	2,5	2,214	2,088	2,124	30,921	28,216	31,559	0,002	0,001	0,002	10,059	28,515	14,566
13	6	0.1M tamp	0,359	0,498	0,463	2	1,4	2	2,076	2,076	2,1	20,911	28,731	26,734	0,001	0,001	0,001	53,665	55,437	41,440
14	6	0.1M tamp	0,363	0,519	0,504	2,9	2,4	2	2,076	2,076	2,1	21,132	29,938	29,075	0,001	0,002	0,001	32,104	20,395	36,311
15	6	0.1M tamp	0,29	0,515	0,445	3	2,3	3	2,076	2,076	2,1	17,140	29,708	25,714	0,001	0,002	0,002	43,030	24,299	15,511
16	6	0.2M tamp	0,344	0,431	0,484	2,4	2,1	3	2,052	2,1	2,148	20,085	24,925	27,930	0,001	0,001	0,002	45,969	42,674	10,281
17	6	0.2M tamp	0,387	0,421	0,475	2,7	1,9	3,2	2,052	2,1	2,148	22,463	24,362	27,416	0,001	0,001	0,002	32,021	49,303	6,059
18	6	0.2M tamp	0,384	0,402	0,481	2,3	2	2,8	2,052	2,1	2,148	22,296	23,298	27,759	0,001	0,001	0,002	42,522	48,965	16,776
19	6,5	0.1M KCL	0,508	0,571	0,528	2,8	2,4	3	2,118	2,1	2,1	29,305	32,957	30,458	0,002	0,002	0,002	10,895	13,370	0,000
20	6,5	0.1M KCL	0,68	0,568	0,558	2,5	2,3	2,9	2,118	2,1	2,1	39,421	32,782	32,199	0,002	0,002	0,002	0,000	17,421	0,000
21	6,5	0.1M KCL	0,51	0,527	0,522	2,5	2,2	2,8	2,118	2,1	2,1	29,420	30,400	30,111	0,002	0,002	0,002	20,130	26,750	7,659
22	6,5	0.1M tamp	0,467		0,455	2,8		2,8	2,1		2,1	26,961		26,280	0,002		0,002	17,319		19,408
23	6,5	0.1M tamp	0,457		0,461	2,5		2,5	2,1		2,1	26,393		26,620	0,002		0,002	27,732		27,111
24	6,5	0.1M tamp	0,207		0,486	3,2		3,3	2,1		2,1	12,702		28,044	0,001		0,002	55,483		0,000
25	6,5	0.2M tamp	0,49		0,508	2,8		3	2,094		2,148	28,273		29,305	0,002		0,002	13,048		5,864
26	6,5	0.2M tamp	0,47		0,455	2,5		3	2,094		2,148	27,132		26,280	0,002		0,002	25,498		15,581
27	6,5	0.2M tamp	0,516		0,481	2,2		3,5	2,094		2,148	29,765		27,759	0,002		0,002	28,074		0,000
28	7	0.1M KCL	0,547	0,612	0,54	2,2	2,5	3	2,118	2,136	2,1	31,559	35,367	31,152	0,002	0,002	0,002	24,605	4,794	0,000
29	7	0.1M KCL	0,531	0,146	0,528	2,6	2,5	3	2,118	2,136	2,1	30,631	9,508	30,458	0,002	0,001	0,002	13,515	74,406	0,000
30	7	0.1M KCL	0,565	0,55	0,514	2,8	1,5	3	2,118	2,136	2,1	32,607	31,733	29,650	0,002	0,001	0,002	0,856	48,746	2,578
31	7	0.1M tamp	0,586		0,512	2		3	2,124		2,136	33,836		31,268	0,002		0,002	26,721		0,000
32	7	0.1M tamp	0,629		0,534	1,9		2,5	2,124		2,136	36,374		30,805	0,002		0,002	25,163		17,075
33	7	0.1M tamp	0,525		0,449	3,3		3	2,124		2,136	30,285		25,940	0,002		0,002	0,000		16,204
34	7	0.2M tamp	0,38		0,525	2,8		3	2,1		2,1	22,074		30,285	0,001		0,002	32,308		0,494
35	7	0.2M tamp	0,466		0,398	2,5		3	2,1		2,1	26,904		23,075	0,002		0,002	26,333		24,181
36	7	0.2M tamp	0,432		0,486	1,8		3	2,1		2,1	24,981		28,044	0,001		0,002	50,752		7,855

ANEXO II

Planilha de dados da extração contínua

Ensaio	Tempo (min)	% Extraç 1	%Extraç 2	%E by-pass	%Reextraç	% Ree by p
pulso 1/1						
1	5	0,00		3,03	-	21,25
2	10	5,50		0	46,99	0
3	15	0,00		8,56	-	22,56
4	20	10,56		10,3	32,35	68,68
5	30	14,23		11,3	22,29	35,54
6	40	31,58		14,43	12,81	31,83
7	50	28,10		0	8,28	0
8	60	30,42		21,38	14,40	17,16
9	70	27,99		0	27,48	0
10	80	36,34			19,40	0
11	90	32,14			21,66	
pulso 1/3						
1	5	0	0	33,32	0	20,58
2	10	0	0	30,88	0	21,83
3	15	4,53	9,17	33,13	44,39	22,82
4	20		17,5	28,39	27,88	19,84
5	30	1,56	30,2	24,55	16,35	24,85
6	40		25,27	21,12	17,26	30,54
7	50	44,3	45,36	27,98	8,47	23,05
8	60		21,37	4,24	21,76	0
9	70	68,24	29,72	29,55	15,45	22,02
Pulso 1/5						
1	5	17,52	11,88	5,60	26,79	100
2	10	11,36	18,99	10,67	20,18	53,65
3	15	27,86	22,15	19,27	15,16	33,57
4	20		24,44	43,85	17,86	7,85
5	30	12,01	20,20	41,84	28,67	7,29
6	40		30,82	48,62	12,24	6,15
7	50	49,78	36,19	40,83	23,48	0
8	60		45,49	39,75	16,69	14,25
9	70	57,41	45,59	43,30	18,24	35,03
Pulso 1/7						
1	5	8,99	23,53	13,13	21,73	43,36
2	10	0	24,63	44,04	16,77	15,94
3	15	0	33,35	66,94	11,86	9,02
4	20		31,14	64,02	11,86	7,99
5	30	11,88	29,28	51,43	11,41	10,17
6	40		38,72	42,66	15,87	8,38
7	50	46,1	38,39	39,25	11,26	12,6
8	60		39,1	48,92	6,27	10,23
9	70	52,06	43,53	46,08	11,74	10,48
10	80			52,33	8,56	13,3