UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

SISTEMAS MICELARES DE DUAS FASES
AQUOSAS APLICADOS À PURIFICAÇÃO
DE ENZIMAS

Carlota de Oliveira Rangel-Yagui

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Assoc. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo
2003

*“ O vento é o mesmo,
mas a sua resposta é diferente em cada folha”.*

Cecília Meireles

Ao meu amor Paulo, pelo apoio incondicional. Por adaptar o percurso de sua vida em função das minhas oportunidades, e fazê-lo com alegria, amor e admiração.

Carlota de Oliveira Rangel-Yagui

**Sistemas micelares de duas fases aquosas aplicados à
solubilização de fármacos**

**Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do título de Doutor**

Prof. Assoc. Adalberto Pessoa Junior
orientador/presidente

Profa. Dra. Inês Conceição Roberto
1º examinador

Prof. Tit. Elias Basile Tambourghi
2º examinador

Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho
3º examinador

Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares
4º examinador

São Paulo, 30 de julho de 2003.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer ao Prof. Assoc. Adalberto Pessoa Junior pela orientação, pelo constante estímulo e confiança depositada em mim, e pela amizade que surgiu ao longo deste trabalho.

I would also like to thank Prof. Daniel Blankschtein, who welcomed me to his group at the Massachusetts Institute of Technology, and assured me a unique experience of improving my education and also personal growth. Thank you for the mentoring and friendship.

Agradeço ainda ao Prof. Tit. Michele Vitolo, à Profa. Tit. Theresa Christina Vessoni Penna e ao Prof. Dr. José Abrahão Neto pela amizade e por todos os ensinamentos transmitidos.

A todos os colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP, que me proporcionaram uma agradável convivência ao longo destes anos, meus sinceros agradecimentos. Em especial, agradeço aos amigos Marcela, Eliane, Fernanda, Cidinha e Ângelo Samir pelas proveitosas discussões, sugestões, e sobretudo pelo estímulo e carinho sempre demonstrados.

I would like to thank all the friends I made at M.I.T (The DB group): Isaac, Dick, Peter, Arthur, Shash, Vibha, Srini, Henry, Daniel, Hua, Betty, and Joe. They all contributed a lot to make my experience in the USA enjoyable and overall very fruitful. They were always there for me, helping in many senses, even in the coldest days!

Agradeço aos funcionários e amigos Ricardo e Marilene, pelo auxílio, cuidado com o laboratório e agradável convivência.

Não poderia deixar de agradecer aos funcionários das secretarias do departamento e da FCF - Juarez, Miriam, Elza, Jorge, Elaine e Benê - que sempre me atenderam da melhor forma possível. Agradeço também a todos os funcionários da Biblioteca do

Conjunto das Químicas da USP, em especial ao Ângelo, pela gentileza e atenção constantes.

Agradeço a CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de Doutorado Sanduíche. Ainda com relação ao estágio de doutorado que realizei no M.I.T., agradeço a esta instituição, na figura do Prof. Daniel Blankschtein, pelo auxílio financeiro concedido ao término da bolsa CAPES.

De uma forma particular, agradeço a todos os meus familiares e amigos, em especial meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir com fé o caminho que escolhi. Sem a força transmitida por estas pessoas, não seria possível a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a Deus pela presença constante em minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	xi
NOMENCLATURA E ABREVIações.....	xv
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	03

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA).....	04
1.1.1. Agentes Tensoativos e Micelas.....	04
1.1.2. Separação de Fases.....	09
1.1.3. O Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas.....	13
1.1.4. Separação de Biomoléculas por SMDFA.....	16
1.2. Enzimas.....	19
1.2.2. A Enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.....	21
1.2.3. A Enzima Uroquiinase.....	24

CAPÍTULO II – PARTIÇÃO DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD) EM SISTEMA MICELAR NÃO-IÔNICO DE DUAS FASES AQUOSAS

2.1. Introdução.....	28
2.2. Materiais e Métodos.....	30
2.2.1. Materiais.....	30
2.2.2. Determinação da Concentração de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.....	31
2.2.3. Avaliação da Estabilidade da G6PD na Presença do Tensoativo C ₁₀ E ₄	31
2.2.4. Preparação do Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas.....	32

2.2.5. Construção da Curva Binodal para o Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão.....	33
2.3. Teoria de Partição de Proteínas Hidrofílicas Baseada em Interações por Volume de Exclusão.....	34
2.4. Resultados e Discussão.....	36
2.4.1. Curva Binodal para o Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão.....	36
2.4.2. Avaliação da Estabilidade da G6PD na Presença do Tensoativo $C_{10}E_4$	39
2.4.3. Partição da G6PD no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão.....	40
2.5. Conclusões.....	45

CAPÍTULO III – PARTIÇÃO DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD) EM SISTEMAS MICELARES MISTOS (NÃO IÔNICO/CATIÔNICO) DE DUAS FASES AQUOSAS

3.1. Introdução.....	49
3.2. Materiais e Métodos.....	53
3.2.1. Materiais.....	53
3.2.2. Determinação da Concentração de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.....	53
3.2.3. Determinação da Concentração de Tensoativo Catiônico.....	54
3.2.4. Avaliação da Estabilidade da G6PD na Presença dos Tensoativos C_nTAB ($n = 8, 10$ ou 12).....	55
3.2.5. Preparação do Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas.....	55
3.2.6. Construção das Curvas Binodais para os Sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /Tampão	56
3.3. Teoria de Partição de Proteínas Hidrofílicas Baseada em Interações por Volume de Exclusão e Interações Eletrostáticas.....	59
3.4. Resultados e Discussão.....	62
3.4.1. Avaliação da Estabilidade da G6PD na Presença dos Tensoativos C_nTAB ($n = 8, 10$ ou 12).....	62
3.4.2 Partição da G6PD nos Sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /Tampão.....	64
3.4.3. Curvas Binodais para os Sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /Tampão.....	70
3.4.4. Partição da G6PD no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão.....	77

3.4.5. Utilização da Teoria de Partição Baseada em Interações por Volume de Exclusão e Interações Eletrostáticas para Estimar Coeficientes de Partição de G6PD.....	79
3.5. Conclusões.....	84

CAPÍTULO IV – ESTUDO DA PARTIÇÃO DAS ENZIMAS GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE E UROQUINASE EM SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS CONTENDO LIGANTE DE AFINIDADE

4.1. Introdução.....	88
4.2. Materiais e Métodos.....	93
4.2.1. Materiais.....	93
4.2.2. Determinação da Concentração de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.....	93
4.2.3. Determinação da Concentração de Uroquinase.....	94
4.2.4. Determinação da Concentração de p-Aminobenzamidina.....	95
4.2.5. Determinação da Concentração de <i>Cibacron Blue</i>	95
4.2.6. Determinação da Concentração de <i>Procion Red</i>	96
4.2.7. Determinação da Tensão Superficial de Soluções Aquosas de <i>Procion red</i> e <i>Cibacron Blue</i>	96
4.2.8. Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Enzima G6PD.....	96
4.2.9. Preparação do Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas.....	97
4.3. Teoria de Partição de Enzimas Hidrofílicas em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Contendo Inibidores Enzimáticos como Ligantes de Afinidade.....	98
4.4. Resultados e Discussão.....	104
4.4.1. Análise Teórica da Partição das Enzimas G6PD e UK em Sistema Micelar C ₁₀ E ₄ /tampão de Duas Fases Aquosas.....	104
4.4.2. Estudo da Partição de UK no Sistema C ₁₀ E ₄ /Tampão Contendo o Ligante de Afinidade p-Aminobenzamidina Livre em Solução.....	105
4.4.2.1. Partição da p-Aminobenzamidina no Sistema C ₁₀ E ₄ /Tampão.....	105
4.4.2.2. Partição da Enzima UK no Sistema C ₁₀ E ₄ /Tampão, em Presença ou Não do Ligante de Afinidade p-Aminobenzamidina.....	106

4.4.3. Estudo da Partição de G6PD no Sistema C ₁₀ E ₄ /Tampão Contendo Corantes Tipo Triazina como Ligantes de Afinidade Livres em Solução.....	110
4.4.3.1. Partição dos Ligantes <i>Cibacron Blue</i> e <i>Procion Red</i> no Sistema C ₁₀ E ₄ /Tampão.....	110
4.4.3.2. Partição da Enzima G6PD no Sistema C ₁₀ E ₄ /Tampão, na Presença ou Não dos Ligantes de Afinidade <i>Cibacron Blue</i> e <i>Procion Red</i>	112
4.4.3.3. Parâmetros Cinéticos da G6PD em Presença ou Não dos Inibidores <i>Procion Red</i> e <i>Cibacron Blue</i>	118
4.4.3.4. Utilização da Teoria de Partição de Enzimas Hidrofílicas em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Contendo Inibidores Enzimáticos Como Ligantes de Afinidade para Estimar Coeficientes de Partição de G6PD.....	125
4.5. Conclusões.....	129

CAPÍTULO V – PURIFICAÇÃO DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE PRESENTE EM HOMOGENEIZADO CELULAR DE *S. cerevisiae* UTILIZANDO-SE SISTEMAS MICELARES DE DUAS FASES AQUOSAS

5.1. Introdução.....	133
5.2. Materiais e Métodos.....	135
5.2.1. Materiais.....	135
5.2.2. Determinação da Concentração de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.....	136
5.2.3. Determinação da Concentração Total de Proteínas.....	136
5.2.4. Preparação do Homogeneizado Celular de <i>S. cerevisiae</i> adicionado de G6PD pura.....	137
5.2.5. Preparação do Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas.....	138
5.2.5.1. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas em Dois Estágios.....	139
5.2.6. Parâmetros de Extração Analisados.....	140
5.3. Resultados e Discussão.....	141

5.4. Conclusão.....	148
CONCLUSÕES.....	150
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
APÊNDICE 1 – Curvas de Calibração.....	165
APÊNDICE 2 – Tabelas Referentes às Curvas Binodais Obtidas.....	167
APÊNDICE 3 – Cálculo do Inverso do Comprimento de Debye.....	173
APÊNDICE 4 – Cálculo da Carga Efetiva de Proteínas.....	175

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1** – Exemplos de tensoativos aniônico - dodecil sulfato de sódio (SDS), catiônico - brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), não-iônico - óxido de *n*-decil tetraetileno ($C_{10}E_4$) e zwitteriônico - dioctanoilfosfatidilcolina (C_8 -lecitina). 05
- FIGURA 1.2** – Representação esquemática da formação de micelas. As moléculas de tensoativo são constituídas por uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. A micela e as moléculas de tensoativo que a constituem fazem parte de um equilíbrio termodinâmico reversível (SHAH, 1998). 06
- FIGURA 1.3** – Diversos tipos de geometria assumidas pelas micelas, dependendo do tipo e concentração de tensoativo, temperatura, força iônica e pH. 09
- FIGURA 1.4** – Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosa para o tensoativo $C_{10}E_4$. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas, e com o aumento da temperatura se separa em uma fase rica em micelas (fase superior) coexistindo com uma fase pobre em micelas (fase inferior). 11
- FIGURA 1.5** – Representação esquemática da curva binodal de uma solução aquosa do agente tensoativo $C_{10}E_4$ baseada no artigo de LIU et al. (1996) C_b corresponde à concentração do agente tensoativo na fase inferior; C_t corresponde à concentração do agente tensoativo na fase superior; V_t corresponde ao comprimento do segmento de reta da linha de amarração (*tie-line*) compreendido entre C_b e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso 4,12%) e cujo valor é proporcional ao volume da fase superior; V_b corresponde ao comprimento do segmento de reta da linha de amarração compreendido entre C_t e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso 4,12%) e cujo valor é proporcional ao volume da fase inferior. 12

- FIGURA 1.6** – (a) comparação esquemática do comprimento (em escala aproximada) associado a proteínas, polímeros (tanto em regime diluído quanto em regime semidiluído) e micelas (tanto em regime diluído quanto em regime semidiluído). D é o diâmetro da molécula de proteína; D_{pol} é o diâmetro do novelo polimérico, ξ_{pol} é o diâmetro do poro da rede polimérica, $W_m=2R_o$ é o diâmetro da micela, D_m é comprimento médio de uma micela cilíndrica e ξ_m é o diâmetro do poro da rede micelar (NIKAS et al., 1992). 15
- FIGURA 1.7** – Estrutura da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) de *L. mesenteroides* (dímero). O substrato e a coenzima $NADP^+$ aparecem ligados a seus sítios específicos (VOUGHT et al., 2000). 22
- FIGURA 1.8** – Estrutura do domínio catalítico de uroquinase (UK) humana (KATZ et al., 2000). 25
- FIGURA 2.1** – Esquema ilustrando o procedimento experimental de extração por sistemas micelares de duas fases aquosas: 1 - Tubo de ensaio graduado contendo todos os componentes do sistema: tampão, tensoativo e enzima (sistema monofásico); 2 - Incubação do tubo contendo os componentes na temperatura desejada (variação de $\pm 0,03$ °C) por um período de 3 horas; 3 - Tubo após a separação de fases (sistema bifásico) e coleta de fases com auxílio de seringa e agulha; 4 - Amostras das fases superior (4a) e inferior (4b) para determinações posteriores de atividade enzimática. 33
- FIGURA 2.2** – Curva binodal para o sistema $C_{10}E_4$ /tampão, obtida experimentalmente. Cada ponto na curva corresponde a um ponto de névoa, caracterizando a transição do sistema monofásico para o sistema de duas fases aquosas. A linha em vermelho representa uma linha de amarração, sendo C_t e C_b as concentrações de $C_{10}E_4$ nas fases superior e inferior, respectivamente, do sistema submetido à separação de fases na temperatura correspondente à linha de amarração. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 37
- FIGURA 2.3** – Recuperação da atividade da enzima G6PD após 6 horas de exposição a diferentes concentrações de $C_{10}E_4$. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 39
- FIGURA 2.4** – Ilustração do sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases 40

- aquosas obtido.
- FIGURA 2.5** – Comparação entre os valores de K_{G6PD} obtidos experimentalmente no sistema $C_{10}E_4$ /tampão (+) e os estimados pela teoria (—), em função do volume de exclusão ($\phi_t - \phi_b$). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos experimentalmente. 43
- FIGURA 2.6** – Variação do valor de K_p em função de R_p/R_0 em sistema $C_{10}E_4$ /tampão, calculada de acordo com o modelo teórico. R_p é o raio hidrodinâmico da proteína, $R_0 = 21\text{Å}$ é o raio da seção transversal das micelas. O valor de ($\phi_t - \phi_b$) foi fixo em 0,10. Os diversos símbolos correspondem aos valores de K_p obtidos experimentalmente para as seguintes proteínas: citocromo c ($\blacklozenge$, $R_p = 19\text{Å}$), ovalbumina ($\blacktriangle$, $R_p = 29\text{Å}$), BSA ($\bullet$, $R_p = 36\text{Å}$), catalase ($+$, $R_p = 52\text{Å}$), G6PD ($\blacklozenge$, $R_p = 68\text{Å}$). 45
- FIGURA 3.1** – Representação esquemática do comportamento esperado para a G6PD em sistemas micelares mistos (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas. A enzima com carga global negativa em pH neutro deve ser atraída eletrostaticamente para a fase superior, rica em micelas mistas positivamente carregadas. 52
- FIGURA 3.2** – Representação esquemática do diagrama de fases de um sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_nTAB$) de duas fases aquosas a temperatura e pressão constantes. A linha sólida representa a curva binodal. A linha tracejada representa uma linha de amarração, onde qualquer composição localizada neste segmento, tal como o ponto A, sofre separação de fases resultando em uma fase superior correspondendo ao ponto B em composição e uma fase inferior correspondendo ao ponto C em composição. 57
- FIGURA 3.3** – Recuperação da atividade da enzima G6PD em soluções contendo 2,5 mM de $C_{12}TAB$ ($-\blacktriangle-$), $C_{10}TAB$ ($-\bullet-$) e C_8TAB ($-\blacksquare-$), a 25°C . As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 63
- FIGURA 3.4** – Coeficientes de partição da G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente em sistemas micelares mistos ($C_{10}E_4/C_nTAB$) de duas fases aquosas utilizando-se $T = 26,7^\circ\text{C}$, concentração total de tensoativos de 128 mM e $\alpha_{sol} = 0,035$, para os tensoativos catiônicos C_8TAB , $C_{10}TAB$ e $C_{12}TAB$ ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB] + [C_{10}E_4])$). As barras cinzas e brancas correspondem aos tempos de partição de 3 e 21 horas, respectivamente. As barras de erro correspondem a 65

- um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.
- FIGURA 3.5** – Balanços de atividade de G6PD (BA_{G6PD}) obtidos experimentalmente em sistemas micelares mistos ($C_{10}E_4/C_nTAB$) de duas fases aquosas utilizando-se $T = 26,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, concentração total de tensoativos de 128 mM e $\alpha_{sol} = 0,035$, para os tensoativos catiônicos C_8TAB , $C_{10}TAB$ e $C_{12}TAB$ ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB]+[C_{10}E_4])$). As barras cinzas e brancas correspondem aos tempos de partição de 3 e 21 horas, respectivamente. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 66
- FIGURA 3.6** – Coeficientes de partição da G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com temperatura $T = 30,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\alpha_{sol} = 0,20$, e no sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com temperatura $T = 30,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\alpha_{sol} = 0,06$ ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB]+[C_{10}E_4])$). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 68
- FIGURA 3.7** – Balanços de atividade de G6PD (BA_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com temperatura $T = 30,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\alpha_{sol} = 0,20$, e no sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com temperatura $T = 30,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\alpha_{sol} = 0,06$ ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB]+[C_{10}E_4])$). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 68
- FIGURA 3.8** – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão a $26,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (♦) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As intersecções da curva binodal com a linha de amarração (•) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de C_8TAB nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração (●) corresponde à condição de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de C_8TAB obtidos. 71
- FIGURA 3.9** – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão a $30,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (♦) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As intersecções da curva binodal com a linha de amarração (•) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de C_8TAB nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração (●) corresponde à condição de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de C_8TAB obtidos. 72

- FIGURA 3.10** – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão a 26,7 °C (♦) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As intersecções da curva binodal com a linha de amarração (●) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de $C_{10}TAB$ nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração (●) corresponde à condição de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de $C_{10}TAB$ obtidos. 73
- FIGURA 3.11** – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão a 30,0 °C (♦) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As intersecções da curva binodal com a linha de amarração (●) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de $C_{10}TAB$ nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração (●) corresponde às condições de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de $C_{10}TAB$ obtidos. 74
- FIGURA 3.12** – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão a 26,7 °C (♦) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As intersecções da curva binodal com a linha de amarração (●) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de $C_{12}TAB$ nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração (●) corresponde às condições de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de $C_{12}TAB$ obtidos. 75
- FIGURA 3.13** – Coeficientes de partição de G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente nos sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão (barras cinzas) e os valores correspondentes obtidos no sistema $C_{10}E_4$ /tampão (barras brancas), mantendo-se o volume de exclusão constante. $C_{12}TAB$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, $C_{10}TAB-1$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, $C_{10}TAB-2$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,06$, C_8TAB-1 corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, e C_8TAB-2 corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,20$. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 78

- FIGURA 3.14** – Comparação entre os valores de K_{G6PD} obtidos experimentalmente (barras cinzas) e os estimados pela teoria (barras brancas). $C_{12}TAB$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB/tampão$ com $\alpha_{sol} = 0,035$, $C_{10}TAB-1$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB/tampão$ com $\alpha_{sol} = 0,035$, $C_{10}TAB-2$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB/tampão$ com $\alpha_{sol} = 0,06$. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos experimentalmente. 83
- FIGURA 4.1** – Representação esquemática do comportamento esperado para uma proteína em sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade em solução. O ligante deve influenciar a partição da proteína alvo para a mesma fase para a qual ele migra preferencialmente. 89
- FIGURA 4.2** – Estrutura química dos corantes derivados da triazina *procion red* HE-3B e *cibacron blue* 3GA, ambos inibidores da G6PD. 91
- FIGURA 4.3** – Estrutura química da coenzima $NADP^+$, a qual se liga a um sítio específico na G6PD. 91
- FIGURA 4.4** – Estrutura química da p-aminobenzamidina (p-AB) – inibidor competitivo da UK. 92
- FIGURA 4.5** – Estrutura química do aminoácido arginina – substrato da uroquinase. 92
- FIGURA 4.6** – Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo recíproco de cinética enzimática) na presença e na ausência de inibidores competitivo (curva em vermelho) e não competitivo (curva em azul). V_{max} é a velocidade máxima da reação enzimática, K_m é a constante de Michaelis, V_{max}^{app} e K_m^{app} são a velocidade máxima e a constante aparente de Michaelis, respectivamente, na presença do inibidor. 103
- FIGURA 4.7** – Variação do coeficiente de partição (K_p) estimado em função do volume de exclusão ($\phi_t - \phi_b$) para as enzimas G6PD (—) e UK (—). 105

- FIGURA 4.8** – Coeficientes de partição da UK (K_{UK}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60% (p/p), na presença do ligante de afinidade p-aminobenzamidina (barra amarela) ou não (barra branca). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 107
- FIGURA 4.9** – Balanços de atividade de UK (BA_{UK}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60% (p/p), na presença do ligante de afinidade p-aminobenzamidina (barra amarela) ou não (barra branca). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 108
- FIGURA 4.10** – Coeficientes de partição dos ligantes *cibacron blue* (barra azul) e *procion red* (barra vermelha) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60% (p/p). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 111
- FIGURA 4.11** – Ilustração da partição preferencial do corante *cibacron blue* para a fase superior, rica em micelas, do sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas. 111
- FIGURA 4.12** – Balanços de atividade da G6PD (BA_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($(\phi_t - \phi_b) = 0,069$) e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60%, na ausência de ligantes de afinidade (barra branca), na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 113
- FIGURA 4.13** – Coeficientes de partição da G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($(\phi_t - \phi_b) = 0,069$) e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60% (p/p), na ausência de ligantes de afinidade (barra branca), na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 114

- FIGURA 4.14** – Coeficientes de partição da G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 19,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($(\phi_t - \phi_b) = 0,026$) e concentração de $C_{10}E_4$ de 2,50% (p/p), na ausência de ligantes de afinidade (barra branca), na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 115
- FIGURA 4.15** – Balanços de atividade da G6PD (BA_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 19,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($(\phi_t - \phi_b) = 0,026$) e concentração de $C_{10}E_4$ de 2,50% (p/p), na ausência de ligantes de afinidade (barra branca), na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 116
- FIGURA 4.16** – Coeficientes de partição dos ligantes *cibacron blue* (barra azul) e *procion red* (barra vermelha) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 19,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e concentração de $C_{10}E_4$ de 2,50% (p/p). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 117
- FIGURA 4.17** – Curva da velocidade inicial (V) da reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ($[NADP^+]$) em solução tampão sem inibidor (♦), com inibidor *procion red* 0,01 mg/g (■) e com inibidor *cibacron blue* 0,05 mg/g (▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 119
- FIGURA 4.18** – Curva da velocidade inicial (V) da reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ($[NADP^+]$) em solução de $C_{10}E_4$ a 6,4% (fase superior) sem inibidor (♦), com inibidor *procion red* 0,05 mg/g (■) e com inibidor *cibacron blue* 0,05 mg/g (▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 119

- FIGURA 4.19** – Curva da velocidade inicial (V) da reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ($[NADP^+]$) em solução de $C_{10}E_4$ a 0,35% (fase inferior) sem inibidor (♦), com inibidor *procion red* 0,05 mg/g (■) e com inibidor *cibacron blue* 0,05 mg/g (▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 120
- FIGURA 4.20** – Gráficos de Lineweaver-Burk para a reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ($[NADP^+]$) sem inibidor (♦) e com inibidor *procion red* (■) em solução tampão (I), solução de $C_{10}E_4$ a 6,4% - fase superior (II) e solução de $C_{10}E_4$ a 0,35% - fase inferior (III). 121
- FIGURA 4.21** – Gráficos de Lineweaver-Burk para a reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ($[NADP^+]$) sem inibidor (♦) e com inibidor *cibacron blue* (▲) em solução tampão (I), solução de $C_{10}E_4$ a 6,4% - fase superior (II) e solução de $C_{10}E_4$ a 0,35% - fase inferior (III). 122
- FIGURA 4.22** – Comparação entre os valores de K_{G6PD} obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($(\phi_t - \phi_b) = 0,069$) na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha) e os estimados pela teoria (barras brancas). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 126
- FIGURA 4.23** – Variação de K_{G6PD} em função da concentração do inibidor *procion red*, $[I]_t$, em sistema $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas com $(\phi_t - \phi_b) = 0,069$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, calculada de acordo com o modelo teórico. 127
- FIGURA 5.1** – Representação esquemática do processo de purificação em dois estágios, sendo o primeiro constituído de sistema micelar não-iônico ($C_{10}E_4$) de duas fases aquosas e o segundo de sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$) de duas fases aquosas, aplicado para a purificação de G6PD presente em homogeneizado de *S. cerevisiae*. 139
- FIGURA A1** – Curva de calibração de absorbância em função da concentração de *cibacron blue* obtida experimentalmente. 165

FIGURA A2 – Curva de calibração de absorbância em função da 165
concentração de *procion red* obtida experimentalmente.

FIGURA A3 – Curva de calibração da concentração total de proteínas 166
obtida pelo método de BCA. As barras de erro
correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos
valores obtidos.

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1	– Resultados experimentais da partição da G6PD em sistema $C_{10}E_4$ /tampão, para diferentes temperaturas e concentrações de tensoativo $C_{10}E_4$. K_{G6PD} corresponde ao coeficiente de partição, BA_{G6PD} corresponde ao balanço de atividade e R corresponde à razão volumétrica entre as fases. Os erros apresentados correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	41
TABELA 2.2	– Valores de concentração de $C_{10}E_4$ resultantes nas fases superior (C_t) e inferior (C_b) de cada experimento, obtidos com base na curva binodal para o sistema $C_{10}E_4$ /tampão, e os respectivos valores de $(\phi_t - \phi_b)$ calculados. ϕ_t e ϕ_b correspondem às frações volumétricas de tensoativo nas fases superior e inferior, respectivamente.	42
TABELA 3.1	– Rendimento de G6PD na fase superior rica em micelas, $Y_{G6PD,t}$, para os sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão ($n = 8, 10$, e 12) nas condições estudadas.	70
TABELA 3.2	– Coeficientes de partição (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente e diferenças de concentração total de tensoativos, $\Delta[C_{10}E_4 + C_nTAB]_{t,b}$, e de concentração de tensoativo catiônico, $\Delta[C_nTAB]_{t,b}$, entre as fases superior e inferior para os sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão estudados.	76
TABELA 3.3	– Caracterização das fases formadas no sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão a $26,7^\circ\text{C}$. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; $[\text{monômeros}]$ e $[C_{12}TAB]_{mon}$ são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de $C_{12}TAB$.	80
TABELA 3.4	– Caracterização das fases formadas no sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão a $26,7^\circ\text{C}$. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; $[\text{monômeros}]$ e $[C_{10}TAB]_{mon}$ são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de $C_{10}TAB$.	80

TABELA 3.5 – Caracterização das fases formadas no sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão a $30,0^\circ C$. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; $[monômeros]$ e $[C_{10}TAB]_{mon}$ são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de $C_{10}TAB$.	81
TABELA 3.6 – Caracterização das fases formadas no sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão a $26,7^\circ C$. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; $[monômeros]$ e $[C_8TAB]_{mon}$ são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de C_8TAB .	81
TABELA 3.7 – Caracterização das fases formadas no sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão a $30,5^\circ C$. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; $[monômeros]$ e $[C_8TAB]_{mon}$ são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de C_8TAB .	82
TABELA 4.1 – Composições das soluções utilizadas para determinação dos parâmetros cinéticos K_M , V_{max} e K_i da G6PD. Os símbolos + e – correspondem à presença ou não do respectivo inibidor enzimático (<i>procion red</i> ou <i>cibacron blue</i>).	97
TABELA 4.2 – Propriedades das enzimas G6PD e UK. A carga efetiva foi calculada conforme descrito no Apêndice 2. O raio hidrodinâmico da G6PD foi calculado com base nas dimensões de seu cristal isomorfo (ROWLAND et al. 1994) e o raio hidrodinâmico da UK foi calculado com base no raio de giração apresentado por MANGEL et al. (1991).	104
TABELA 4.3 – Resultados de coeficiente de partição (K_{p-AB}) e balanço de massa (BM_{p-AB}) de p-aminobenzamidina obtidos no sistema $C_{10}E_4$ /tampão a $20^\circ C$ contendo 3,60% (p/p) de tensoativo. Os erros apresentados correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	106

TABELA 4.4 – Valores de velocidade inicial máxima (V_{max}), constante de Michaelis (K_M) e constante de inibição (K_i) de G6PD obtidos experimentalmente. Os valores apresentam um erro padrão de aproximadamente 5%.	123
TABELA 5.1 – Resultados de coeficientes de partição de G6PD (K_{G6PD}) e de proteínas totais (K_P), balanço de atividade de G6PD (BA_{G6PD}), balanço de massa de proteínas totais (BM_P), rendimento de G6PD na fase superior (Y_{G6PD}), seletividade (S) e fator de purificação (f_p), para o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 30,0^\circ C$, concentração total de tensoativos de 128 mM e $\alpha_{sol} = 0,06$.	142
TABELA 5.2 – Resultados de coeficientes de partição de G6PD (K_{G6PD}) e de proteínas totais (K_P), balanço de atividade de G6PD (BA_{G6PD}), balanço de massa de proteínas totais (BM_P), rendimento de G6PD na fase inferior do sistema micelar não-iônico ou superior do sistema micelar misto (Y_{G6PD}), seletividade (S) e fator de purificação (f_p), para o processo de purificação de G6PD presente em homogeneizado celular de <i>S. cerevisiae</i> realizado em dois estágios.	144
TABELA 5.3 – Comparação entre os valores de coeficiente de partição (K_{G6PD}) e rendimento em G6PD (Y_{G6PD}) obtidos para a G6PD pura e a partir de homogeneizado de <i>S. cerevisiae</i> contendo G6PD, utilizando-se sistema micelar misto $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão e o processo de purificação em dois estágios.	146
TABELA A1 – Valores de ponto de névoa (temperatura na qual o sistema separa de fases) obtidos experimentalmente para soluções de $C_{10}E_4$ a diferentes concentrações. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4$ /tampão (Figura 2.2).	167
TABELA A2 – Valores de concentração de $C_{10}E_4$ e de C_8TAB correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a $26,7^\circ C$. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão na respectiva temperatura (Figura 3.8).	168

TABELA A3	– Valores de concentração de $C_{10}E_4$ e de C_8TAB correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a 30,5 °C. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão na respectiva temperatura (Figura 3.9).	169
TABELA A4	– Valores de concentração de $C_{10}E_4$ e de $C_{10}TAB$ correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a 26,7 °C. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão na respectiva temperatura (Figura 3.10).	170
TABELA A5	– Valores de concentração de $C_{10}E_4$ e de $C_{10}TAB$ correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a 30,0 °C. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão na respectiva temperatura (Figura 3.11).	171
TABELA A6	– Valores de concentração de $C_{10}E_4$ e de $C_{12}TAB$ correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a 26,7 °C. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão na respectiva temperatura (Figura 3.12).	172
TABELA A.7	– Valores de pK_a para aminoácidos com cadeias laterais carregadas e grupos terminais de proteínas (STRYER, 1988).	178

NOMENCLATURA E ABREVIações

A	Atividade enzimática
Abs	Absorbância
A_e	Atividade específica
$A_{e,i}$	Atividade específica na solução estoque de enzima, inicialmente adicionada ao sistema.
$A_{e,x}$	Atividade específica na fase x (t ou b)
$A_{G6PD,i}$	Atividade de G6PD inicial
$A_{G6PD,sol}$	Atividade de G6PD após exposição ao tensoativo $C_{10}E_4$
Arg	Arginina
BA	Balanço de atividade
BA_{G6PD}	Balanço de atividade da G6PD
BA_{UK}	Balanço de atividade da uroquinase
BCA	Ácido bicinconínico (<i>bicinchoninic acid</i>)
BM	Balanço de massa
BM_P	Balanço de massa de proteínas totais
BM_{p-AB}	Balanço de massa da p-aminobenzamidina
C_iE_j	Fórmula geral para os tensoativos da classe dos óxidos de polietileno
$C_{10}E_4$	Óxido de <i>n</i> -deciltetraetileno
C_nTAB	Brometo de alquiltrimetilamônio
C_8TAB	Brometo de octiltrimetilamônio
$C_{10}TAB$	Brometo de deciltrimetilamônio
$C_{12}TAB$	Brometo de dodeciltrimetilamônio
$[C_{10}E_4]_{mic}$	Concentração de $C_{10}E_4$ nas micelas
$[C_{10}E_4]_{mon}$	Concentração de $C_{10}E_4$ na forma monomérica
$[C_nTAB]_{mic}$	Concentração de C_nTAB nas micelas ($n = 8, 10$ ou 12)
$[C_nTAB]_{mon}$	Concentração de C_nTAB na forma monomérica ($n = 8, 10$ ou 12)
C_t	Concentração de tensoativo na fase superior (<i>top</i>)
C_b	Concentração de tensoativo na fase inferior (<i>bottom</i>)

C_i	Concentração do componente em questão na solução estoque, inicialmente adicionada ao sistema
$C_{p,b}$	Concentração de proteína na fase inferior (<i>bottom</i>)
$C_{p,t}$	Concentração de proteína na fase superior (<i>top</i>)
$C_{G6PD,t}$	Concentração de G6PD na fase superior (<i>top</i>)
$C_{G6PD,b}$	Concentração de G6PD na fase inferior (<i>bottom</i>)
C_P	Concentração de proteínas totais
CMC	concentração micelar crítica
D	Diâmetro da proteína
D_m	Diâmetro dos poros da rede micelar
d_{min}	Distância correspondente à maior aproximação possível entre a micela e a proteína
D_{pol}	Diâmetro do novelo polimérico
e	Carga eletrônica
E	Enzima livre
EI_z	Complexo enzima-inibidor
ESI_z	Complexo enzima-substrato-inibidor
$[E]$	Concentração de enzima livre
$[E]_b$	Concentração de enzima livre na fase inferior (<i>bottom</i>)
$[E]_t$	Concentração de enzima livre na fase superior (<i>top</i>)
$[EI_z]$	Concentração de complexo enzima-inibidor
$[E_{tot}]$	Concentração total de enzima
$[E_{tot}]_b$	Concentração total de enzima na fase inferior (<i>bottom</i>)
$[E_{tot}]_t$	Concentração total de enzima na fase superior (<i>top</i>)
$E_{\lambda}^{mg/mL}$	Coeficiente de extinção
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EV	Excluded volume
exp	Exponencial
f_p	Fator de purificação
FI	Força iônica
G	Energia livre de Gibbs
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase

H	Entalpia
HUK	Uroquinase de alta massa molar
I	Inibidor livre
$[I]$	Concentração de inibidor livre
$[I]_b$	Concentração de inibidor livre na fase inferior (<i>bottom</i>)
$[I]_t$	Concentração de inibidor livre na fase superior (<i>top</i>)
k_B	Constante de Boltzmann
K_p^{EV}	Coeficiente de partição da proteína resultante das interações de volume de exclusão
K_p^{aff}	Coeficiente de partição da proteína resultante das interações de afinidade
K_p^{elec}	Coeficiente de partição da proteína resultante das interações eletrostáticas
K_p	Coeficiente de partição da proteína
K_{G6PD}	Coeficiente de partição da G6PD
K_{UK}	Coeficiente de partição da uroquinase
K_P	Coeficiente de partição das proteínas totais
$K_{ligante}$	Coeficiente de partição do ligante de afinidade
K_{p-AB}	Coeficiente de partição da p-aminobenzamidina
K_M	Constante de Michaelis
K_M^{app}	Constante aparente de Michaelis
$\perp_{c,x}$	Raio da seção transversal da micela na fase x (t ou b)
$\perp_{cationic,x}$	Comprimento da molécula de tensoativo catiônico em cada micela na fase x (t ou b)
LUK	Uroquinase de baixa massa molar
[monômeros]	Concentração total monomérica
n	Número de sítios de ligação do inibidor na enzima
n_a	Número de agregação da micela
n_c	Número de átomos de carbono na cauda do tensoativo
N_{AV}	Número de Avogadro
NAD(H)	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP(H)	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

[proteínas]	Concentração de proteínas
p-AB	p-aminobenzamidina
pl	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
POE	Polióxido de etileno
R	Razão volumétrica entre as fases superior e inferior
r	Distância radial entre o eixo de simetria da micela e o centro da proteína
R_{min}	Distância radial mínima entre o eixo de simetria da micela e o centro da proteína
R_o	Raio da sessão transversal da micela cilíndrica
R_p	Raio hidrodinâmico da proteína
RNA	Ácido ribonucléico
S	Entropia
S	Seletividade
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMDFA	Sistema micelar de duas fases aquosas
T	Temperatura
T_c	Temperatura crítica – temperatura mínima na qual se observa separação de fases para um determinado sistema
$T_{névoa}$	Ponto de névoa – temperatura na qual a solução micelar turva
UK	Uroquinase
UV	Ultravioleta
Val	Valina
V_i	Volume da solução estoque do componente em questão, inicialmente adicionada ao sistema
V_t	Volume da fase superior (<i>top</i>)
V_b	Volume da fase inferior (<i>bottom</i>)
$V_{tail,C_{10}E_4}$	Volume da cauda apolar do tensoativo C ₁₀ E ₄
$V_{tail,cationic}$	Volume da cauda apolar do tensoativo catiônico
V_{max}	Velocidade máxima da reação enzimática

V_{max}^{app}	Velocidade máxima aparente
W_m	Diâmetro da micela
x	Índice referente à fase do sistema (<i>t</i> ou <i>b</i>)
X_c	Concentração crítica de tensoativo
X_T	Concentração total de tensoativos na solução
Y_{G6PD}	Rendimento de G6PD
$Y_{G6PD,t}$	Rendimento de G6PD na fase superior (<i>top</i>)
z	Número de moléculas de inibidor ligadas à enzima
$z_{cati\tilde{on}ic}$	Valência da molécula de tensoativo catiônico

Letras gregas

α_{mic}	Composição micelar
α_{mon}	Composição monomérica
α_{sol}	Composição da solução
β^M	Parâmetro de interação molecular de misturas de tensoativos
ϕ_t	Fração volumétrica de tensoativo na fase superior (<i>top</i>)
ϕ_b	Fração volumétrica de tensoativo na fase inferior (<i>bottom</i>)
κ	Inverso do comprimento de Debye
λ	Comprimento de onda
σ_x	Densidade de carga na superfície de cada micela na fase x ($x = t$ ou b)
σ_x	Densidade de carga na superfície de cada micela na fase x ($x = t$ ou b)
σ_p	Densidade de carga na superfície da proteína
ξ_{pol}	Diâmetro dos poros da rede polimérica
$\psi_{mic,t}$	Potencial eletrostático na superfície de cada micela na fase superior (<i>top</i>)
$\psi_{mic,b}$	Potencial eletrostático na superfície de cada micela na fase inferior (<i>bottom</i>)
ψ_p	Potencial eletrostático na superfície da proteína

$\psi_{mic,x}$	Potencial eletrostático na superfície de cada micela na fase x ($x = t$ ou b)
ϵ_w	Constante dielétrica da água

RESUMO

A partição das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e uroquinase (UK) em sistemas micelares de duas fases aquosas foi investigada, teórica e experimentalmente. Inicialmente, a partição de G6PD em sistema micelar de duas fases aquosas composto pelo tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ (óxido de *n*-deciltetraetileno) foi estudada. Observou-se uma partição governada primariamente por interações repulsivas estéricas, do tipo “volume de exclusão”, sendo a G6PD recuperada preferencialmente na fase inferior do sistema, pobre em micelas, resultando em valores de K_{G6PD} inferiores a 1,0. Os tensoativos catiônicos C_nTAB (brometos de alquiltrimetilamônio, $n = 8, 10$ e 12) foram adicionados ao tensoativo $C_{10}E_4$, de modo a formar sistemas micelares mistos (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas e atrair a G6PD de carga efetiva negativa para a fase superior, rica em micelas positivamente carregadas. Os coeficientes de partição obtidos nos sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão foram no mínimo 2,5 vezes maiores que os correspondentes no sistema $C_{10}E_4$ /tampão mantendo-se o volume de exclusão constante. De uma forma geral, o sistema micelar misto $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão forneceu o melhor $K_{G6PD} = 7,7$, com um rendimento de G6PD na fase superior de 71%. A adição de ligantes de afinidade (inibidores enzimáticos) ao sistema de duas fases aquosas $C_{10}E_4$ /tampão para purificação de UK e G6PD também foi estudada. Não foram observadas diferenças significativas no perfil de partição da UK na presença ou não do ligante p-aminobenzamidina, o qual apresentou partição uniforme entre as duas fases do sistema, sendo obtidos valores de $K_{UK} \sim 0,70$ em ambos os casos. Para a G6PD, um pequeno incremento no K_{G6PD} foi observado na presença dos ligantes de afinidade *cibacron blue* e *procion red*, porém resultando ainda em valores inferiores a 1. Portanto, a utilização de inibidores enzimáticos livres em solução como ligantes de afinidade para purificação de UK e G6PD em sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas não resultou em diferenças significativas no perfil de partição das enzimas. Por fim, um sistema de purificação em dois estágios, sendo o primeiro constituído de sistema micelar não-iônico ($C_{10}E_4$) de duas fases aquosas e o segundo de sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$) de duas fases aquosas foi aplicado para a purificação de G6PD presente em homogeneizado celular de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo obtido um rendimento final de G6PD de 59%, com um fator de purificação de 1,3.

ABSTRACT

The partitioning of the hydrophilic enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and urokinase (UK) in two-phase aqueous micellar systems was investigated, both experimentally and theoretically. Initially, the partitioning of G6PD in two-phase aqueous micellar system composed of the nonionic surfactant $C_{10}E_4$ (*n*-decyl tetra(ethylene oxide)) was studied. It was observed a partitioning behavior governed primarily by repulsive, steric, excluded-volume interactions, which drove the enzyme preferentially to the bottom, micelle-poor phase, resulting in K_{G6PD} values smaller than one. The cationic surfactants C_nTAB ((alkyltrimethylammonium bromide, $n = 8, 10$, and 12) were mixed with the nonionic surfactant $C_{10}E_4$ to form two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. The measured G6PD partition coefficients in the $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer systems were at least 2.5 times larger than those in the corresponding $C_{10}E_4$ /buffer system, clearly demonstrating that the net negatively-charged G6PD was attracted electrostatically to the top, mixed micelle-rich phase, containing a greater number of positively-charged $C_{10}E_4/C_nTAB$ mixed micelles. Overall, the two-phase aqueous mixed ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$) micellar system yielded the highest $K_{G6PD} = 7.7$, with a G6PD yield in the top phase of 71%. The addition of affinity ligands (enzyme inhibitors) to the two-phase $C_{10}E_4$ /buffer systems was studied for UK and G6PD purification. No significant differences in the UK partitioning behavior was observed in the presence or not of the ligand *p*-aminobenzamidine, since the ligand was found to partition evenly between the two phases of the system. Partition coefficient values of about 0.70 were obtained in both cases. For the G6PD, the partition coefficient was found to be slightly higher in the presence of either *cibacron blue* or *procion red* as affinity ligand, however still smaller than one. Therefore, the use of competitive inhibitors free in solution as affinity ligands for UK and G6PD purification in two-phase $C_{10}E_4$ /buffer systems did not provide significant differences in the enzymes partitioning behaviors. Finally, a two-step purification process, combining a two-phase aqueous nonionic ($C_{10}E_4$) micellar system, followed by a two-phase aqueous mixed ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$) micellar system, was employed for the purification of G6PD present in a *Saccharomyces cerevisiae* cell homogenate. It was obtained a G6PD final yield of 59%, and a purification factor of 1.3.

INTRODUÇÃO

A viabilidade da produção em escala industrial de enzimas e outras proteínas de interesse depende significativamente das técnicas de purificação empregadas. A obtenção em baixas concentrações e a sensibilidade térmica, dentre outros fatores, dificultam a aplicação de diversos processos de extração e purificação no caso de biomoléculas. Desta forma, a purificação industrial de enzimas ocorre, geralmente, através de processos múltiplos que consistem em técnicas de custo elevado tais como cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica (CHAMPLUVIER, KULA, 1992; CHANG, CHASE, 1996; CHANG *et al.*, 1995; McCREATH *et al.*, 1995). Conseqüentemente, o custo de preparações enzimáticas puras é elevado, dificultando o acesso a estes reagentes de grande aplicação nos campos de pesquisa, terapêutico e diagnóstico. Portanto, o desenvolvimento de técnicas mais econômicas e simplificadas para a purificação de enzimas e biomoléculas em geral, consiste em um importante campo de pesquisa.

Os processos de extração líquido-líquido são amplamente utilizados em indústria química devido à sua simplicidade, baixo custo, e facilidade de ampliação de escala. Entretanto, a extração convencional aplicada em indústria química consiste em sistemas água - solvente orgânico, de forma a apresentar elevado risco de desnaturação protéica. Com o intuito de capitalizar os benefícios da extração líquido-líquido, fluidos aquosos complexos têm sido utilizados nos processos de extração líquido-líquido de biomoléculas (sistemas de duas fases aquosas), pois desta forma ambas as fases formadas são predominantemente aquosas, proporcionando um ambiente ameno para as biomoléculas.

O estudo de sistemas de duas fases aquosas iniciou-se há algumas décadas, com a utilização de polímeros em solução. Uma prova importante de que esse tipo de extração vem sendo assimilada pelo setor produtivo é que algumas enzimas já estão sendo purificadas em escala industrial utilizando-se sistemas poliméricos de duas fases aquosas (ex. quimosina e

endoglucanase) (LORCH, 1999). Atualmente, processos de biosseparação têm sido realizados em diversos tipos de sistemas de duas fases aquosas (JOHANSSON *et al.*, 1996, 1999; KAMEI *et al.*, 2002a; SIVARS, TJERNELD, 2000; SIVARS *et al.*, 2000). Particularmente, o sistema micelar de duas fases aquosas baseia-se no fato de que certas soluções micelares, sob determinadas condições, são capazes de se separar espontaneamente em duas fases aquosas, ainda que imiscíveis, entre as quais proteínas e outras biomoléculas podem se distribuir desigualmente (LIU *et al.*, 1998). As micelas oferecem simultaneamente ambiente hidrofóbico e hidrofílico, permitindo uma seletividade na partição de acordo com a hidrofobicidade da biomolécula (LIU *et al.*, 1996). A seletividade na partição também pode ser otimizada com a utilização de sistemas micelares mistos contendo tensoativos iônicos, ou ainda sistemas micelares contendo ligantes de afinidade.

Com base no potencial que os sistemas micelares de duas fases aquosas apresentam para a purificação de enzimas e demais biomoléculas, a pesquisa desta tecnologia faz-se importante e constitui o escopo desta tese de doutorado.

O presente trabalho encontra-se dividido em capítulos redigidos sob a forma de artigos, com exceção do Capítulo I que consiste em uma revisão bibliográfica. Conseqüentemente, determinadas informações que constam no Capítulo I são repetidas no item *introdução* dos capítulos subseqüentes. Destes artigos, aquele correspondente ao Capítulo III já foi publicado, enquanto que os demais serão submetidos para publicação em periódicos especializados. Informações complementares aos artigos estão inseridas sob a forma de anexos.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consistiu em estudar a utilização de sistemas micelares de duas fases aquosas para purificação de enzimas de interesse farmacêutico. Com esta finalidade, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Estudar (teórica e experimentalmente) a partição da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) pura em sistema micelar não-iônico de duas fases aquosas;
- Estudar (teórica e experimentalmente) a partição da enzima G6PD pura em sistemas micelares mistos (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas;
- Estudar (teórica e experimentalmente) a partição de enzimas puras (G6PD e *uroquinase*) em sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade livres em solução;
- Verificar a aplicação do sistema micelar de duas fases aquosas definido como mais adequado para a partição de G6PD pura para extração da enzima presente em homogeneizado celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA)

1.1.1. Agentes Tensoativos e Micelas

Agentes tensoativos são moléculas anfifílicas compostas de uma porção hidrofílica ou polar, comumente denominada “cabeça polar”, e uma porção hidrofóbica ou apolar, comumente denominada “cauda apolar”. Os tensoativos podem ser classificados em três classes gerais: (i) iônicos (possuindo cabeça positivamente carregada ou negativamente carregada), (ii) não-iônicos (possuindo uma cabeça polar capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água), e (iii) zwitteriônicos (possuindo uma cabeça caracterizada por um dipolo). Dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), óxido de *n*-decil tetraetileno ($C_{10}E_4$) e dioctanoilfosfatidilcolina (C_8 -lecitina) são exemplos típicos de tensoativos aniônico (negativamente carregado), catiônico (positivamente carregado), não-iônico e zwitteriônico, respectivamente (ISRAELACHVILI, 1992). A Figura 1.1 apresenta as fórmulas químicas dos tensoativos citados.

Os tensoativos em solução aquosa podem exibir diversos tipos de comportamento, dependendo da concentração. Em soluções com concentração de tensoativo abaixo da concentração micelar crítica (CMC), específica para cada tensoativo, as moléculas de tensoativo adsorvem na interface ar-água projetando suas caudas apolares em direção à fase ar, de forma a minimizar o contato com a água. Este fenômeno explica a terminologia inglesa “*surfactant*” (*surface-active agent*). A maioria dos tensoativos apresenta solubilidade mínima na fase aquosa, caracterizada pelo caráter hidrofóbico da cauda apolar. Portanto, em soluções com concentração de tensoativo superior à CMC, as moléculas de tensoativo formam agregados conhecidos como micelas, nas quais as caudas hidrofóbicas se associam no interior minimizando o contato com a água e as

cabeças polares permanecem na periferia das micelas maximizando seu contato com a água (CHEVALIER, ZEMB, 1990; TANFORD, 1980).

FIGURA 1.1 – Exemplos de tensoativos aniônico - dodecil sulfato de sódio (SDS), catiônico - brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), não-iônico - óxido de *n*-decil tetraetilenos (C₁₀E₄) e zwitteriônico - dioctanoilfosfatidilcolina (C₈-lecitina).

De uma forma superficial, as micelas podem ser consideradas como espécies químicas distintas, pois a magnitude da energia livre de inserção de uma molécula de tensoativo na micela é superior à energia livre térmica por molécula $K_B T$, onde K_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta. Entretanto, estudos cinéticos de soluções micelares demonstram que as moléculas de tensoativos são livres para deixar a micela e permanecer na solução na forma de monômeros, antes de se juntarem em uma nova micela. Em outras palavras, as micelas são compostos dinâmicos que estão continuamente e reversivelmente trocando monômeros umas com as outras (Figura 1.2). Como resultado, as micelas não possuem uma composição fixa, distinta, e uma descrição de uma solução micelar consiste

em uma especificação estatística da distribuição dos tamanhos micelares existentes em solução (BLANKSCHTEIN *et al.*, 1986).

Tempo de reação: varia de milissegundos a minutos

FIGURA 1.2 – Representação esquemática da formação de micelas. As moléculas de tensoativo são constituídas por uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. A micela e as moléculas de tensoativo que a constituem fazem parte de um equilíbrio termodinâmico reversível (SHAH, 1998).

A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo interações de van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio (TANFORD, 1980; ISRAELICHAVILI, 1992). A principal força atrativa resulta do efeito hidrofóbico associado às caudas apolares. A força repulsiva contrária é resultado das interações estérica (existente entre as cabeças hidratadas de tensoativos não iônicos) e eletrostática (existente entre as cabeças possuindo cargas semelhantes) associadas às cabeças hidrofílicas. O processo de micelização é resultado de um balanço entre estas forças atrativas e repulsivas (KAMEI, 2001).

O efeito hidrofóbico é governado pelo ganho em entropia que ocorre quando o contato entre as caudas apolares e as moléculas de água é minimizado. Apesar de haver uma perda de entropia translacional das

moléculas de tensoativo com a formação de micelas, um aumento significativo da entropia translacional das moléculas de água que rodeia as caudas hidrofóbicas ocorre. Esse aumento de entropia translacional das moléculas de água tem um efeito maior pois as moléculas de água encontram-se em maior quantidade (TANFORD, 1980).

Em diversos produtos e processos, misturas de tensoativos são utilizadas para aprimorar as propriedades do sistema. Em determinados casos a interação entre dois tensoativos ocorre de tal forma que a CMC da mistura (CMC_{12}) é um valor intermediário entre as CMC dos dois componentes do sistema (CMC_1 e CMC_2), para qualquer proporção dos dois tensoativos utilizada. Certas misturas de tensoativos, por outro lado, interagem de forma que a CMC_{12} para determinadas proporções dos dois tensoativos é inferior à CMC_1 e CMC_2 . Este fenômeno é denominado *sinergismo* na formação de micelas mistas. Ainda, em alguns casos e para determinadas proporções dos dois tensoativos utilizados, a CMC_{12} pode ser maior do que a CMC_1 e a CMC_2 , ocorrendo o *sinergismo negativo* na formação de micelas mistas (ROSEN, 1988; ZHAO, ZHU, 1986).

Usualmente, a existência ou não de *sinergismo* em uma mistura de dois agentes tensoativos pode ser determinada através da avaliação de um parâmetro de interação molecular, β^M , definido a seguir:

$$\beta^M = \frac{\ln(\alpha_{sol} CMC_{12} / \alpha_{mic,1} CMC_1)}{(1 - \alpha_{mic,1})^2} \quad (1.1)$$

em que α_{sol} é a fração molar total de tensoativo 1 em solução (portanto, a fração molar total de tensoativo 2 é igual a $1 - \alpha_{sol}$) e $\alpha_{mic,1}$ é a fração molar de tensoativo 1 nas micelas mistas. Como o valor de β^M parece estar relacionado com a energia livre de mistura dos dois tensoativos, um valor negativo indica uma interação do tipo atrativa entre os dois tensoativos e um valor positivo indica uma interação do tipo repulsiva. Quanto maior o valor absoluto de β^M , mais forte as interações atrativas ou repulsivas (dependendo do sinal) entre os dois tensoativos. Um valor próximo de zero, por sua vez, indica uma interação muito fraca ou ausência de interação entre os tensoativos, ou seja, uma mistura ideal. Em geral, as misturas de tensoativos

apresentam sinergismo na formação de micelas mistas, sendo que a força da interação atrativa entre os tensoativos decresce na seguinte ordem: aniônico-catiônico > aniônico-zwiteriônico > iônico (catiônico ou aniônico)-não-iônico derivado de polióxido de etileno (POE) > betaína-catiônico > betaína-POE > POE-POE (ROSEN, 1988).

Além da CMC, outro parâmetro que caracteriza as micelas é o número de agregação (n_a), que se refere ao número de monômeros que constituem cada micela. Em termos geométricos, o número de agregação de micelas em meio aquoso tende a aumentar rapidamente com o aumento do comprimento da cauda apolar da molécula de tensoativo, e a diminuir com o aumento da área da sessão transversal da cabeça polar ou aumento do volume da porção hidrofóbica (ROSEN, 1988). Portanto, as micelas podem ser esféricas, cilíndricas ou bicamadas (Figura 1.3). Dependendo do tipo e concentração de tensoativo, bem como das condições da solução (pH, temperatura, força iônica), as micelas podem crescer unidimensionalmente na forma de cilindros ou bicamadas (PUVVADA, BLANKSCHTEIN, 1990). O crescimento micelar é governado pelas características da cabeça polar das moléculas de tensoativo, uma vez que este fenômeno requer uma proximidade maior entre as cabeças polares. Desta forma, tensoativos iônicos na ausência de sais geralmente apresentam crescimento mínimo, formando micelas esféricas devido à forte repulsão eletrostática entre as cabeças igualmente carregadas. Em contrapartida, tensoativos não-iônicos podem exibir um crescimento significativo, pois a repulsão entre as cabeças é fraca, ocorrendo somente por efeito estérico e não eletrostático. É importante ressaltar que os sistemas micelares que exibem crescimento significativo apresentam um maior grau de polidispersão que aqueles que exibem crescimento mínimo (CHEVALIER, ZEMB, 1990; MEGURO *et al.*, 1987).

FIGURA 1.3 – Diversos tipos de geometria assumidos pelas micelas, dependendo do tipo e concentração de tensoativo, temperatura, força iônica e pH.

Para o tensoativo não-iônico óxido de *n*-decil tetraetileno ($C_{10}E_4$), as micelas apresentam uma tendência ao crescimento em longas e flexíveis microestruturas cilíndricas, com o aumento da temperatura e/ou concentração de tensoativo. Em temperaturas ou concentrações suficientemente elevadas, as micelas podem tornar-se tão longas a ponto de interagirem entre si e formarem uma rede micelar com estrutura semelhante às redes de polímeros em solução aquosa (NIKAS *et al.*, 1992). Estudos de viscosidade e técnicas de espalhamento de luz (IMAE, 1988; KATO *et al.*, 1990), bem como estudos teóricos (CARALE e BLANKSCHTEIN, 1992), mostraram existir duas formas distintas de soluções micelares. Na primeira delas, denominada de "regime diluído", as micelas encontram-se isoladas umas das outras em solução. Na segunda, denominada de "regime semidiluído ou concentrado", as micelas apresentam-se enoveladas formando uma rede.

1.1.2. Separação de Fases

Para determinados tensoativos, uma solução micelar isotrópica, homogênea submetida a determinadas condições como aumento de temperatura e adição de sais, por exemplo, pode espontaneamente se separar em duas fases líquidas aquosas e imiscíveis (LIU *et al.*, 1998). Como a concentração de tensoativos nas duas fases é superior à CMC, micelas estão presentes em ambas as fases. Porém, o tamanho médio e o

grau de polidispersão das micelas são diferentes nas duas fases, pois a concentração de tensoativo é diferente e, como discutido anteriormente, a concentração de tensoativo influencia o tamanho micelar (BLANKSCHTEIN *et al.*, 1985). O fenômeno de separação de fases pode ser representado por uma curva em forma de sino, denominada de *curva binodal* ou *curva de coexistência*, com concavidade para cima ou para baixo dependendo de a separação de fases ser induzida pelo aumento ou diminuição da temperatura, respectivamente. A curva binodal, desta forma, representa o limite, em função da temperatura e da concentração de tensoativo, no qual a solução micelar se separa em duas fases macroscópicas (NIKAS *et al.*, 1992).

Certos tensoativos não-iônicos, como os derivados de óxido de polietileno, apresentam o fenômeno de separação de fases induzido por aumento de temperatura (MITCHELL, 1983). Conseqüentemente, a curva de coexistência possui concavidade voltada para cima e o sistema exibe um ponto crítico inferior. A princípio, este fenômeno parece contra-intuitivo, pois um sistema monofásico geralmente é favorecido com o aumento da temperatura pelo efeito dominante da entropia, dado que:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.2)$$

em que ΔG é a variação da energia livre de Gibbs, ΔH a variação de entalpia, T a temperatura absoluta e ΔS a variação de entropia da solução. Entretanto, para micelas formadas por moléculas de tensoativos não-iônicos da classe dos derivados do óxido de polietileno, a força atrativa entre as micelas aumenta à medida que a temperatura aumenta (BLANKSCHTEIN *et al.*, 1985, 1986; CHEVALIER, ZEMB, 1990). Isto pode ser entendido com base no fato de que as unidades hidrofílicas de óxido de etileno destes tensoativos ligam-se significativamente às moléculas de água através de ligações de hidrogênio, apresentando-se fortemente hidratadas. Com o aumento da temperatura, a agitação térmica das moléculas em solução aumenta, e conseqüentemente as pontes de hidrogênio são enfraquecidas devido ao menor direcionamento das ligações. Desta forma, as micelas são capazes de estabelecer um contato mais próximo entre si, favorecendo

interações do tipo atrativas. Estas interações atrativas são responsáveis pela formação de uma fase rica em micelas (BLANKSCHTEIN *et al.*, 1985, 1986).

Particularmente, a separação de fases de uma solução do tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ (óxido de *n*-decil tetraetilenos) resulta em uma fase superior rica em micelas e uma fase inferior pobre em micelas, como representado na Figura 1.4. As micelas de $C_{10}E_4$ são cilíndricas, sendo mais longas e abundantes na fase superior do que na fase inferior, devido às diferenças em concentração (LIU *et al.*, 1996). As duas fases são predominantemente aquosas, sendo a fase superior composta por no mínimo 80% (p/p) de água e a fase inferior composta por no mínimo 98% (p/p) de água (KAMEI, 2001).

FIGURA 1.4 – Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosa para o tensoativo $C_{10}E_4$. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas, e com o aumento da temperatura se separa em uma fase rica em micelas (fase superior) coexistindo com uma fase pobre em micelas (fase inferior).

A Figura 1.5 representa um esboço da curva binodal do sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo $C_{10}E_4$. Considerando-se que a curva binodal para este sistema apresenta concavidade para cima, o ponto mínimo é denominado "ponto crítico inferior", sendo caracterizado pela temperatura crítica (T_c) e pela concentração crítica de agente tensoativo (X_c).

FIGURA 1.5 – Representação esquemática da curva binodal de uma solução aquosa do agente tensoativo $C_{10}E_4$ baseada no artigo de LIU *et al.* (1996). C_b corresponde à concentração do agente tensoativo na fase inferior; C_t corresponde à concentração do agente tensoativo na fase superior; V_t corresponde ao comprimento do segmento de reta da linha de amarração (*tie-line*) compreendido entre C_b e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso $4,12\%$) e cujo valor é proporcional ao volume da fase superior; V_b corresponde ao comprimento do segmento de reta da linha de amarração compreendido entre C_t e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso $4,12\%$) e cujo valor é proporcional ao volume da fase inferior.

O diagrama de fases, construído com apenas um agente tensoativo não-iônico e água, possui suas linhas de amarração ("tie-lines") paralelas e acima da tangente traçada no ponto crítico. As linhas de amarração podem ser caracterizadas pelo parâmetro R que corresponde à proporção entre o volume da fase superior (*top*), V_t , e o volume da fase inferior (*bottom*) do sistema V_b , ou seja, $R = V_t/V_b$. Portanto, para uma concentração fixa de

C₁₀E₄, o aumento da temperatura do sistema leva a uma diminuição no valor de *R*.

1.1.3. O Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

O sistema micelar de duas fases aquosas possui algumas vantagens em relação a outros métodos de purificação de biomoléculas por extração líquido-líquido, como:

- Proporciona um ambiente favorável e ameno aos materiais biológicos, pois dependendo do tipo e concentração do tensoativo a temperatura de extração é de aproximadamente 20 °C (BORDIER, 1982; LIU *et al.*, 1995; SIRIMANNE *et al.* 1998);
- Possui a habilidade de concentrar, além de proteínas, diferentes tipos de moléculas como íons metálicos, compostos orgânicos e bacteriófagos (SAITOH, HINZE, 1991; LIU *et al.*, 1998; QUINA, HINZE, 1999);
- É um método seguro, pois não utiliza compostos inflamáveis e explosivos (SAITOH, HINZE, 1991);
- Possui baixo custo, pois requer, a princípio, somente um tensoativo para a separação das fases e em baixas concentrações (QUINA, HINZE, 1999; SIRIMANNE *et al.* 1998);
- Gera resíduos de fácil manuseio, ou seja, resíduos de baixa toxicidade, fácil acondicionamento, etc. (SAITOH, HINZE, 1991; SIRIMANNE *et al.* 1998);
- É de fácil ampliação de escala, pois, a princípio, requer somente um tanque com controle de temperatura (LIU *et al.*, 1995; PRYDE, 1986);
- Possibilita o controle e otimização da partição de biomoléculas pelo ajuste das características das micelas como tamanho e forma através da variação da temperatura, concentração do tensoativo e adição de sais (LIU *et al.*, 1998);
- Oferece ambientes hidrofóbico e hidrofílico aos solutos devido ao caráter anfifílico das micelas e pode com isso aumentar a seletividade do processo de purificação em função da hidrofobicidade das biomoléculas (LIU *et al.*, 1996);

- Pode ter a seletividade da partição melhorada com a utilização de uma mistura de micelas contendo ligantes de afinidade específicos à biomolécula-alvo acoplados ao tensoativo ou pela mistura de agentes tensoativos iônicos com não-iônicos (LIU *et al.* 1998);
- Permite que a análise das amostras seja feita por diferentes técnicas como cromatografia líquida e eletroforese sem causar interferência (QUINA, HINZE, 1999; SIRIMANNE *et al.* 1998);
- A separação do material desejado das moléculas de tensoativo após a purificação pode ser facilitada pelo fato de as micelas serem de natureza auto-associativa. Por exemplo, as micelas podem ser dissociadas em monômeros através da diluição da solução micelar, e a biomolécula alvo então separada dos monômeros por filtração (LIU *et al.*, 1995). Outra possibilidade seria a utilização de técnicas de diálise.

Quando comparado ao extensivamente estudado sistema polimérico de duas fases aquosas (ABBOTT *et al.*, 1990, 1991, 1992; ALBERTSSON, 1986), o SMDFA oferece certas características únicas e desejáveis como a natureza auto-associativa das micelas que permite o controle e otimização da partição através do ajuste das características micelares (tamanho e forma) (LIU *et al.*, 1996). No sistema polimérico de duas fases aquosas, o diâmetro dos poros da rede polimérica (ξ_{pol}) é comparável ao diâmetro da proteína, ou seja, a proteína pode interagir com a rede polimérica. No caso do SMDFA, o diâmetro dos poros da rede micelar ($D_m \sim 200-300 \text{ \AA}$) é significativamente maior do que o diâmetro da proteína ($D \sim 15-70 \text{ \AA}$) e, portanto, as proteínas “ignoram” a existência da rede micelar, ou seja, o poro não interage com a proteína (Figura 1.6). Desta forma, o estudo das interações estéricas entre micelas e proteínas torna-se mais simplificado, uma vez que é possível ignorar a rede micelar e suas características, tratando as micelas como entidades rígidas cujos parâmetros geométricos podem ser determinados (NIKAS *et al.*, 1992).

FIGURA 1.6 – (a) comparação esquemática do comprimento (em escala aproximada) associado a proteínas, polímeros (tanto em regime diluído quanto em regime semidiluído) e micelas (tanto em regime diluído quanto em regime semidiluído). D é o diâmetro da molécula de proteína; D_{pol} é o diâmetro do noveto polimérico, ξ_{pol} é o diâmetro do poro da rede polimérica, $W_m=2R_o$ é o diâmetro da micela, D_m é comprimento médio de uma micela cilíndrica e ξ_m é o diâmetro do poro da rede micelar (NIKAS *et al.*, 1992).

O comportamento de uma proteína em sistema de duas fases aquosas pode ser caracterizado, quantitativamente, pelo coeficiente de partição, K_p , definido a seguir:

$$K_p \equiv \frac{C_{p,t}}{C_{p,b}} \quad (1.3)$$

em que $C_{p,t}$ e $C_{p,b}$ correspondem às concentrações de proteína nas fases superior (*top* – *t*) e inferior (*bottom* – *b*), respectivamente.

1.1.4. Separação de Biomoléculas por SMDFA

Considerável interesse tem sido verificado na utilização de sistemas micelares de duas fases aquosas (SMDFA) para purificar e concentrar compostos como albumina, bacteriófagos, antibióticos, colesterol oxidase, lisozima e outras enzimas, vitaminas lipossolúveis e compostos orgânicos (CHENG-KANG, WEN-DA, 1998; BORDIER, 1982; HOLM *et al.*, 1986; NIKAS *et al.*, 1992; PRYDE, 1986; RAMELMEIER *et al.*, 1991; SANCHES-FERRER *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1998; LEE, SU, 1999; SIVARS, TJERNELD, 2000; TANI *et al.*, 1998; CHIANG, 1999; QUINA, HINZE, 1999; SIRIMANNE *et al.* 1998). Essa técnica tem sido utilizada também para separar contaminantes com características hidrofóbicas presentes em soluções enzimáticas. Por exemplo, NÚNEZ-DELICADO *et al.* (1996) utilizaram essa técnica para reduzir em 92% o teor de compostos fenólicos presentes em uma solução contendo a enzima tirosinase, sem afetar a sua estrutura. Essa redução na concentração de fenóis por SMDFA foi suficiente para evitar o escurecimento da solução enzimática mesmo após vários ciclos de congelamento e descongelamento, ou após vários meses de estocagem a – 20 °C.

O primeiro trabalho que apresentou a possibilidade de separar proteínas por extração em sistemas de duas fases aquosas contendo agentes tensoativos foi o de BORDIER (1981). Esse autor usou o agente tensoativo não-iônico Triton X-114 para separar uma mistura de proteínas. Soluções aquosas de Triton X-114 se separam em duas fases quando a temperatura é aumentada acima de 20 °C. O trabalho desse autor mostrou

que as proteínas hidrofílicas eram encontradas exclusivamente na fase pobre em micelas enquanto que as proteínas com caráter hidrofóbico se encontravam na fase rica em micelas. Em 1984, CLEMETSON *et al.* verificaram que esse método poderia ser aplicado a sistemas complexos, como aqueles envolvendo células intactas. Nesse mesmo ano, ZHANG e HAGER concluíram que esse procedimento de purificação poderia ser aplicado, com sucesso, na purificação de lipases e proteases. QUINA e HINZE (1999) apontaram que esse processo não é utilizado somente para separar compostos protéicos, tendo sido introduzido no Japão, em 1976, por MIURA *et al.* na extração e separação de íons metálicos. Posteriormente, verificou-se que, além de íons metálicos, outros tipos de compostos como determinadas moléculas orgânicas de baixa massa molar também poderiam ser purificadas por SMDFA. Como exemplo tem-se a purificação, por SMDFA, de compostos como estriol, progesterona, β -estradiol e estrona com recuperações de 90%, 88%, 96% e 96% e fatores de concentração de 26, 29, 35 e 35 vezes, respectivamente (SAITOH, HINZE, 1991).

MINUTH *et al.* (1996), por sua vez, purificaram a enzima colesterol oxidase em somente duas etapas, SMDFA seguido de cromatografia de troca-aniônica, e conseguiram um aumento de pureza de 160 vezes e uma recuperação total de 80% da enzima. Outros estudos realizados por MINUTH *et al.* (1997) mostraram que a técnica de SMDFA foi mais efetiva que alguns métodos cromatográficos em termos de recuperação, preservação de atividade biológica, simplicidade, custo e, particularmente, adequação aos processos realizados em larga-escala. Essa técnica pode também ser uma importante alternativa na purificação de proteínas de plantas. Segundo SANCHEZ-FERRER *et al.* (1994), alguns compostos presentes em plantas que interferem nas técnicas convencionais de extração, como fenóis e clorofila, podem ser facilmente removidos por SMDFA.

Embora os agentes tensoativos, em particular os iônicos, possam se ligar e desnaturar biomoléculas como as enzimas, existem tensoativos não-carregados (não-iônicos) que não se ligam de forma intensa a essas

biomoléculas e, portanto, não as desnaturam (HELENIUS, SIMON, 1972; MAKINO, 1979; MAKINO *et al.*, 1973). Desta forma, os sistemas micelares de duas fases aquosas constituídos por agentes tensoativos não-iônicos podem proporcionar um ambiente ameno e compatível com biomoléculas.

TERSTAPPEN *et al.* (1993) verificaram que o aumento do comprimento da cauda hidrofóbica do tensoativo não-iônico, ou da temperatura, aumenta a partição do tensoativo para a fase rica em micelas e, conseqüentemente, aumenta também a partição de proteínas hidrofóbicas. Esses autores constataram que há uma correlação positiva entre a hidrofobicidade da proteína e a sua partição para a fase rica em micelas. BORDIER (1981) verificou que as proteínas hidrofílicas possuem pouca ou nenhuma interação com tensoativos não-iônicos e que suas propriedades físico-químicas não são influenciadas pela presença desses tensoativos. Estudos conduzidos por PRYDE e PHILLIPS (1986) também mostraram que é possível separar proteínas por SMDFA baseando-se na hidrofobicidade relativa. Esses autores estudaram a extração das enzimas dopamina- β -hidroxilase, ATPase e do citocromo *b561*.

Segundo QUINA e HINZE (1999), a adição de agentes tensoativos iônicos ao SMDFA em associação com um agente tensoativo não-iônico presente em maior concentração, pode favorecer a transferência de enzimas hidrofílicas para a fase micelar, devido às interações eletrostáticas. LIU *et al.* (1998) e SIVARS e TJERNELD (2000) também propõem a mistura de agentes tensoativos iônicos aos não-iônicos, que atuariam como ligantes de afinidade, para aumentar a seletividade da extração. Neste sentido, KAMEI *et al.* (2002a, b) demonstraram recentemente que as interações eletrostáticas entre proteínas e micelas de cargas opostas podem ser exploradas para aumentar o rendimento e a seletividade de sistemas micelares de duas fases aquosas.

Embora os tensoativos iônicos possam se ligar e desnaturar proteínas, tem sido demonstrado que este efeito é dependente do tipo e concentração de tensoativo iônico (GELAMO, TABAK, 2000; SEN *et al.*, 1981). Desta forma, é possível a criação de micelas mistas, visando um

incremento no coeficiente de partição de proteínas hidrofílicas, pela adição de quantidades adequadas de um tensoativo iônico a um tensoativo não-iônico passível de separação de fases. A quantidade de tensoativo iônico adicionada deve ser suficientemente alta para causar uma mudança significativa no comportamento de partição da proteína, porém suficientemente baixa para evitar desnaturação severa da proteína (KAMEI *et al.*, 2002a,b).

A seletividade na partição de proteínas em sistema micelar de duas fases aquosas pode ainda ser otimizada pela presença de ligantes de afinidade no sistema (GUZMAN *et al.*, 1989; QUINA, HINZE, 1999). Se o ligante de afinidade por si próprio apresentar uma partição direcionada para uma das fases do sistema, não é necessária a modificação química para ligar covalentemente o ligante de afinidade à molécula de tensoativo (KRONER *et al.*, 1982). Em outras palavras, um ligante de afinidade que apresente uma distribuição desigual entre as duas fases de um sistema micelar de duas fases aquosas, em tese, irá influenciar a partição da proteína alvo para a mesma fase para a qual ele migra.

1.2. Enzimas

Enzimas são moléculas (ou complexos moleculares) que aceleram uma reação química por meio da ligação ao(s) reagente(s) em posições e circunstâncias que aumentem a probabilidade da reação. Até recentemente, admitia-se que todos os catalisadores biológicos (enzimas) fossem protéicos. Entretanto, há pouco mais de uma década, foram caracterizadas certas reações celulares que têm como catalisadores determinadas moléculas de RNA, as quais apresentam um comportamento semelhante ao das proteínas enzimáticas obedecendo também à cinética de Michaelis-Menten. Seu emprego nas reações metabólicas, entretanto, está restrito a alguns casos especiais (MARZZOCO, TORRES, 1999). As enzimas desempenham um importante papel funcional em alimentos e medicamentos, assim como em sistemas biológicos. O uso crescente desses catalisadores em processos industriais deve-se à alta sensibilidade e

especificidade de suas reações químicas, bem como ao avanço das pesquisas em genética, somados à tecnologia de processos fermentativos, na área de produção de enzimas (HALL, 1996). Segundo VITOLO e ROCHE (1998), a utilização de enzimas em escala industrial é de fundamental importância, devendo ser analisada, no entanto, a relação custo/benefício.

A atividade catalítica de uma enzima protéica, deste ponto em diante denominada somente enzima, provém de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada, que se justapõe aos grupamentos específicos dos aminoácidos de tal modo a formar sítios estereoespecíficos de ligações com o substrato e cofatores. Esta estrutura terciária é mantida principalmente por um grande número de ligações não covalentes fracas, conferindo à enzima uma estrutura macromolecular muito delicada (SEGEL, 1979). A atividade catalítica da enzima depende da integridade da sua conformação molecular nativa. Esta atividade geralmente se perde caso a enzima seja desnaturada ou dissociada em sub-unidades (quando possuir estrutura quaternária) (LEHNINGER *et al.*, 1995).

A maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior com a elevação da temperatura. Esse aumento na temperatura proporciona uma maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões por unidade de tempo. Porém, no caso de reações enzimáticas, o excesso de energia cinética pode causar desnaturação da enzima através do rompimento de sua estrutura terciária, e conseqüente perda de atividade catalítica (SEGEL, 1979).

Segundo HALL (1996), na maioria dos casos, a solubilidade de uma enzima é aumentada com o aumento da temperatura desde que esta esteja situada na faixa de 0 a 40-50°C. Porém, acima desse limite de temperatura a enzima poderá ser desnaturada através da modificação das ligações não covalentes envolvidas na estabilização das suas estruturas secundária e terciária, como, por exemplo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Quando as estruturas secundária e terciária de uma proteína são desnaturadas, os grupos hidrofóbicos interagem entre si e reduzem a

hidratação da molécula. Essas interações hidrofóbicas levam à agregação, seguida de coagulação e precipitação.

Em baixas temperaturas pode também ocorrer, em alguns casos, a desestabilização das proteínas. Isto ocorre quando o principal fator de estabilização da estrutura terciária de uma enzima ocorre por interações hidrofóbicas. Esta interação é mais fraca quando submetida a baixas temperaturas. Pode-se ainda observar que, em alguns casos, baixas temperaturas provocam dissociação de subunidades de oligômeros protéicos e desestabilizam a proteína (HALL, 1996).

A quantidade de calor necessária para desnaturar uma enzima varia de acordo com a molécula. Esse processo depende também do pH, força iônica do meio e presença de outros componentes como agentes tensoativos. Por exemplo, em valores de pH extremos, bem como em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico, pI , a quantidade de calor necessária para desnaturar uma enzima é diminuída. Portanto, como a estrutura nativa de uma enzima é importante para sua funcionalidade, é fundamental trabalhar em temperaturas nas quais a mesma apresente-se estável (HALL, 1996).

1.2.2. A Enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (EC 1.1.1.49), primeira enzima da via das pentoses, catalisa a oxidação de glicose-6-fosfato utilizando $NADP^+$ ou NAD^+ gerando pentoses para a síntese de nucleotídeos, assim como $NADPH/NADH$ para utilização em biossínteses redutivas e proteção contra stress oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998; ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994).

Esta enzima hidrofílica é amplamente encontrada na natureza, estando presente em quase todos os tecidos animais e microrganismos. Na maioria das espécies, a G6PD apresenta uma subunidade com

massa molar de 50 – 60 kDa, correspondendo a aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos. Esta enzima normalmente aparece na forma de dímeros ou tetrâmeros (ROWLAND *et al.*, 1994), sendo que as G6PDs provenientes de *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae* são dímeros (COHEN, ROSEMEYER, 1969; ZAITZEVA *et al.*, 1997), enquanto que a humana constitui em um equilíbrio dímero – tetrâmero (ROWLAND *et al.*, 1994). O pH ótimo de atividade da enzima G6PD é aproximadamente 7,8 e o ponto isoelétrico é 4,6 (OLIVE, LEVY, 1971; ISHAQUE *et al.* 1974; ROWLAND *et al.*, 1994; COSGROVE *et al.*, 1998).

A deficiência enzimática de G6PD corresponde a uma das enzimopatias mais freqüentes em humanos, resultando de mais de 90 mutações genéticas diferentes (CHIM *et al.*, 2001). Em Hong Kong e no sul da China, por exemplo, 4 a 6% da população masculina é deficiente em G6PD. Apesar de ser geralmente assintomática, a deficiência de G6PD pode levar à anemia hemolítica após exposição a stress oxidativo, ou devido a certas infecções como hepatite (CHIM *et al.*, 2001; KRZELJ *et al.*, 2001). Desta forma, diversos estudos médicos e bioquímicos envolvendo esta enzima têm sido realizados (ALTIKAT *et al.*, 2001; AU *et al.*, 2000; COBAN *et al.*, 2002; ISHIBASHI *et al.*, 1999).

FIGURA 1.7 – Estrutura da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) de *L. mesenteroides* (dímero). O substrato e a coenzima NADP^+ aparecem ligados a seus sítios específicos (VOUGHT *et al.*, 2000).

A G6PD também apresenta grande interesse como reagente analítico, sendo utilizada em vários ensaios quantitativos incluindo a determinação de atividade de creatina-quinase para diagnóstico de doenças cardíacas e de músculo esquelético, medidas de concentração de hexoses, e marcador de enzima imunoensaios (LOJUDICE *et al.*, 2001). Esta enzima pode ser usada de forma eficiente e precisa para identificar e quantificar moléculas de glicose liberadas após hidrólise do amido em sucos, mesmo na presença de pedaços de frutas, pigmentos como antocianinas, elevadas concentrações de sacarose e outros tipos de polissacarídeos (CHATEL *et al.* 1996). Além disso, a G6PD pode ser empregada para a determinação de glicose em sistema de reator em fluxo contínuo, pois o NADPH formado pela reação enzimática pode ser facilmente detectado espectrofotometricamente ou fluorimetricamente (MORI *et al.*, 1999; FREY *et al.*, 1999). Essa enzima pode, ainda, detectar baixíssimos níveis de estreptavidina e biotina por ensaios de bioluminescência em reações de hibridização de DNA, sem perda da atividade enzimática (TEROUANNE *et al.* 1989; BALAGUER *et al.*, 1989).

Como biossensor, a G6PD pode monitorar rapidamente a concentração de glicose-6-fosfato no sangue com menor custo e consumo de tempo do que os métodos tradicionais como cromatografia e espectroscopia. Esse monitoramento é importante porque ele pode refletir diretamente a atividade relativa da G6PD na via metabólica e tem sido utilizado por possibilitar o controle de G6PD em eritrócitos humanos e em células de fígado de ratos (BASSI *et al.*, 1999).

A purificação industrial da enzima G6PD tem sido feita através de processos de múltiplas etapas, os quais envolvem técnicas de custo elevado como cromatografia de afinidade e cromatografia de troca-iônica (CHAMPLUVIER, KULA. 1992; CHANG, CHASE, 1996; CHANG *et al.*, 1995; MCCREATH *et al.*, 1995). Portanto, o custo desta enzima como reagente analítico é alto, o que torna a pesquisa de métodos de purificação de G6PD mais simples e econômicos bastante interessante.

1.2.3. A Enzima Urokinase

A enzima *uroquinase* (UK) (EC 3.4.21.73) é uma glicoproteína com massa molar de 54 kDa (411 resíduos de aminoácidos), responsável pela conversão do plasminogênio em sua forma ativa plasmina através da hidrólise da ligação peptídica Arg561 – Val562 (FAHEY e CHAUDHURI, 2001). O ponto isoelétrico desta enzima ocorre em pH 8,75 (PAOLETTI, SHERRY, 1977). Juntamente com o ativador de plasminogênio tecidual, a UK é o principal ativador plasminogênico endógeno (SPRAGGON *et al.*, 1995).

A UK é sintetizada no rim humano, tendo sido encontrada pela primeira vez na urina. Subseqüentemente, foi descoberta a ocorrência de UK em diversos tecidos em mamíferos, sendo que mais recentemente esta enzima tem sido obtida de culturas celulares de diversos tecidos (MALE *et al.*, 1990).

Devido à sua ação ativadora de plasminogênio, a UK tem sido utilizada em tratamento de infarte do miocárdio agudo, oclusão arterial periférica, e infarte cerebral agudo (TAKAHASHI *et al.*, 2000). Existem dois tipos de *uroquinase* presentes na urina humana, a de baixa massa molar (LUK) e a de alta massa molar (HUK), sendo a última o maior componente da UK urinária. A LUK é formada através da degradação proteolítica e/ou clivagem autolítica da HUK. Apesar das atividades enzimáticas das duas variantes serem praticamente equivalentes em presença de plasma *in vitro* (SAMAMA *et al.*, 1982), a atividade da HUK é considerada mais significativa do que a da LUK, com base em uma maior afinidade da primeira pelo substrato glu-plasminogênio *in vivo* (ABAZA *et al.*, 1998).

Ao mesmo tempo em que a UK é utilizada na terapêutica trombolítica, a demanda por inibidores de UK é crescente, pois a desregulação do sistema enzimático da UK, ou seja, a expressão descontrolada de *uroquinase* ou seus receptores, é relacionada a crescimento de câncer e metástase (REUNING *et al.*, 1998, KIM *et al.*, 1998). A utilização de inibidores de UK na diminuição de crescimento tumoral e taxa de metástase tem apresentado resultados significativos (ALONSO *et al.*, 1998). Portanto,

diversos estudos bioquímicos envolvendo a UK têm sido realizados, no sentido de melhor compreender esta enzima e o seu papel fisiológico.

FIGURA 1.8 – Estrutura do domínio catalítico de *uroquinase* (UK) humana (KATZ *et al.*, 2000).

A purificação da UK a partir de urina humana ou cultura de células renais é bastante difícil, dado que esta enzima aparece em concentrações muito baixas (1-50 ng/mL). Grande parte dos métodos de purificação descritos consiste em diversas etapas iniciais de concentração seguidas por uma série de procedimentos cromatográficos convencionais (CAO *et al.*, 1996, TAKAHASHI *et al.*, 2000). Desta forma, o processamento extensivo causa inevitavelmente um rendimento global muito baixo, assim como altos custos de operação (MALE *et al.*, 1990). Portanto, a busca de novos processos de purificação de UK proveniente de fontes naturais que forneçam melhores rendimentos e alto grau de pureza apresenta interesse considerável.

CAPÍTULO II

PARTIÇÃO DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD) EM SISTEMA MICELAR NÃO-IÔNICO DE DUAS FASES AQUOSAS

Carlota O. Rangel-Yagui¹, Daniel Blankschtein² e
Adalberto Pessoa-Jr¹

¹ Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica /FCF, Universidade
de São Paulo, São Paulo, Brasil

²Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of
Technology, Cambridge, MA, USA.

Palavras Chaves: glicose-6-fosfato desidrogenase, sistema micelar de duas
fases aquosas. purificação de proteínas.

Endereço do autor para correspondência:
Adalberto Pessoa Junior
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 16
CEP: 05508-950 – São Paulo. SP.
Tel: (11) 3091-3710
Fax: (11) 3094-3694
e-mail: peessoajr@usp.br

Este capítulo apresenta um estudo da partição da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em sistema micelar de duas fases aquosas formado pelo tensoativo não-iônico óxido de *n*-deciltetraetileno. A partição da enzima foi realizada em diferentes temperaturas e a curva binodal do sistema foi determinada. Os resultados obtidos são discutidos, inclusive teoricamente, e comparados com resultados de partição previamente obtidos para outras proteínas hidrofílicas.

2.1. Introdução

Considerável interesse tem sido verificado na utilização de sistemas micelares de duas fases aquosas para purificar e concentrar compostos como albumina, bacteriófagos, antibióticos, colesterol oxidase, lisozima, vitaminas lipossolúveis e compostos orgânicos (CHENG-KANG, WEN-DA, 1998; BORDIER, 1982; HOLM *et al.*, 1986; NIKAS *et al.*, 1992; PRYDE, 1986; RAMELMEIER *et al.*, 1991; SANCHES-FERRER *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1998; LEE, SU, 1999; SIVARS, TJERNELD, 2000; TANI *et al.*, 1998; CHIANG, 1999; QUINA, HINZE, 1999; SIRIMANNE *et al.*, 1998).

O primeiro trabalho que apresentou a possibilidade de extração de proteínas por sistemas micelares de duas fases aquosas, utilizando-se o tensoativo não-iônico Triton X-114, foi o de BORDIER (1981). Mais recentemente MINUTH *et al.* (1996) realizaram a purificação da enzima colesterol oxidase em somente duas etapas, SMDFA seguido de cromatografia de troca-iônica, e conseguiram um aumento de pureza de 160 vezes e uma recuperação total de 80% da enzima.

Os sistemas micelares de duas fases aquosas exploram o fato de que determinadas soluções micelares, sob condições apropriadas, são capazes de espontaneamente separar-se em duas fases aquosas, ainda que imiscíveis, dentre as quais proteínas e outras biomoléculas podem se distribuir de forma desigual (LIU *et al.*, 1998). Mais especificamente, uma solução aquosa de tensoativo não-iônico é capaz de separar-se macroscopicamente em duas fases, com o aumento da temperatura, resultando em uma fase rica em micelas e uma fase pobre em micelas (LIU *et al.*, 1996). Ambas as fases contêm micelas cilíndricas, as quais podem ser modeladas como micelas formadas por um corpo cilíndrico terminando em duas micelas hemisféricas nas extremidades (PUVVADA, BLANKSCHTEIN, 1990; ZOELLER *et al.*, 1997). Entretanto, as micelas presentes na fase rica em micelas são maiores (mais alongadas) e mais abundantes do que aquelas presentes na fase pobre em micelas. Esta diferença no ambiente físico-químico das duas fases consiste na base da utilização destes sistemas em processos de extração (LIU *et al.*, 1996).

Quando comparado ao sistema polimérico de duas fases aquosas (ABBOTT *et al.*, 1990, 1991, 1992; ALBERTSSON, 1986), os sistemas micelares de duas fases aquosas apresentam uma série de características únicas e desejáveis, incluindo a natureza auto-associativa das micelas que permite o controle e a otimização da partição através do ajuste das características micelares (LIU *et al.*, 1996). Além disso, no sistema polimérico de duas fases aquosas, o diâmetro dos poros da rede polimérica é comparável ao diâmetro da proteína, ou seja, a proteína pode interagir com a rede polimérica. No caso do sistema micelar de duas fases aquosas o diâmetro dos poros da rede micelar (~200-300 Å) é significativamente maior do que o diâmetro de proteínas (~15-70 Å) e, portanto, as proteínas “ignoram” a existência da rede micelar. Desta forma, o estudo das interações estéricas entre micelas e proteínas torna-se mais simplificado, uma vez que é possível ignorar a rede micelar, tratando as micelas como entidades rígidas cujos parâmetros geométricos podem ser determinados. (NIKAS *et al.*, 1992).

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (EC 1.1.1.49) é uma enzima amplamente encontrada na natureza, estando presente em quase todos os tecidos animais e microrganismos. Na maioria das espécies, a G6PD apresenta uma subunidade com massa molar de 50 – 60 kDa, correspondendo a aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos. Esta enzima normalmente aparece na forma de dímeros ou tetrâmeros (ROWLAND *et al.*, 1994), sendo que a G6PD proveniente de *Leuconostoc mesenteroides*, fonte utilizada no presente estudo, é um dímero (COHEN, ROSEMEYER, 1969). Por ser a primeira enzima da via das pentoses, a G6PD catalisa a oxidação de glicose-6-fosfato utilizando NADP⁺ ou NAD⁺ gerando pentoses para a síntese de nucleotídeos, assim como NADPH/NADH para utilização em biossínteses redutivas e proteção contra stress oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998; ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994).

A G6PD apresenta um grande interesse como reagente analítico, sendo utilizada em vários ensaios quantitativos incluindo a determinação de

atividade de creatina-quinase para diagnóstico de doenças cardíacas e de músculo esquelético, medidas de concentração de hexoses, e marcador de enzima imunoensaios (LOJUDICE *et al.*, 2001).

A purificação industrial da enzima G6PD tem sido feita através de processos de múltiplas etapas, os quais envolvem técnicas de custo elevado como cromatografia de afinidade e cromatografia de troca-iônica (CHAMPLUVIER, KULA, 1992; CHANG, CHASE, 1996; CHANG *et al.*, 1995; MCCREATH *et al.*, 1995). Embora estudos de partição da G6PD em sistemas *poliméricos* de duas fases aquosas (visando redução de custos e simplicidade de processo) tenham sido realizados no passado (ALRED *et al.*, 1994; BHIDE *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1992), não foram encontrados na literatura relatos referentes ao estudo da purificação desta enzima utilizando-se sistemas *micelares* de duas fases aquosas. Portanto, o estudo da utilização deste tipo de sistema para a purificação de G6PD apresenta-se como uma nova alternativa a ser explorada em termos de purificação desta enzima de interesse comercial.

Neste trabalho, a partição da enzima G6PD em sistema micelar de duas fases aquosas composto pelo tensoativo não-iônico óxido de *n*-deciltetraetileno ($C_{10}E_4$) foi estudada, teórica e experimentalmente. Para o tensoativo $C_{10}E_4$, a fase superior é a rica em micelas e a fase inferior é a pobre em micelas.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Materiais

O tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ (lote no. 6011) foi adquirido da empresa Nikko Chemicals (Tóquio, Japão). A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* (lote no. 50K8612), a glicose-6-fosfato (lote no. 40K7014), e o fosfato de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NADP⁺, lote no. 80K7046) foram todos obtidos da Sigma (St. Louis, MO). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em tampão de Mcllvaine pH 7,2, consistindo de

16,4 mM de fosfato de sódio dibásico e 1,82 mM de ácido cítrico. Foi utilizada água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Toda a vidraria utilizada nos experimentos foi lavada em um banho de hidróxido de sódio 1 M em solução alcoólica a 50%, seguido de um banho de ácido nítrico 1 M, enxaguada abundantemente com água Milli-Q, e finalmente seca em estufa a 90 °C.

2.2.2. Determinação da Concentração de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A determinação da concentração de G6PD em solução aquosa, contendo ou não tensoativo, foi baseada no ensaio enzimático (BERGMEYER, 1983), com algumas modificações devido às condições dos experimentos de partição. Desta forma, o Tampão McIlvaine foi utilizado ao invés de tampão Tris-HCl e a temperatura foi diminuída de 37 °C para 15 °C para prevenir a ocorrência de turbidez/separação de fases durante a medida de atividade. A atividade de G6PD foi medida determinando-se a velocidade de formação de NADPH, o qual absorve em comprimento de onda U.V. a 340 nm (coeficiente de extinção molar $E = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma unidade de G6PD (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de NADP^+ por minuto, nas condições de ensaio. As concentrações de cada reagente na cubeta espectrofotométrica foram: 900 μL de tampão McIlvaine pH 7.2, 20 μL de solução de glicose-6-fosfato 250 mM, 5 μL de solução de NADP^+ 131 mM e 20 μL de amostra contendo G6PD a ser determinada. O aumento de absorbância foi acompanhado por 50 segundos, logo após adição da amostra, em aparelho espectrofotômetro Shimadzu UV-160U.

2.2.3. Avaliação da Estabilidade da G6PD na Presença do Tensoativo C_{10}E_4

Antes de se iniciar os estudos de extração, a estabilidade da enzima G6PD frente ao agente tensoativo utilizado foi avaliada. Para isso, soluções contendo 0,0068% (p/p) de G6PD foram preparadas a partir de uma solução

estoque e incubadas a 15 °C por 6 horas, na presença de diferentes concentrações de C₁₀E₄. A atividade de cada solução ao final do tempo de exposição foi determinada ($A_{G6PD,sol}$) e, com base na atividade inicial da solução ($A_{G6PD,i}$), a recuperação da atividade foi calculada. A concentração de G6PD foi a mesma utilizada nos ensaios de extração.

$$\text{Recuperação Atividade (\%)} = \frac{A_{G6PD,sol} \times 100}{A_{G6PD,i}} \quad (2.1)$$

2.2.4. Preparação do Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

O sistema micelar de duas fases aquosas foi preparado em tubos de ensaio graduados de 10 mL, pela adição de C₁₀E₄ e G6PD nas quantidades desejadas em tampão McIlvaine, resultando em um volume total de 3 mL. Como o ensaio enzimático para determinação de G6PD é bastante sensível, a concentração de enzima utilizada foi de apenas 0,0068% (p/p), prevenindo alterações na curva binodal. Os componentes do sistema foram adicionados por pesagem, homogeneizados manualmente e equilibrados a 4 °C de modo a exibir uma única fase límpida e homogênea. Subseqüentemente, as soluções foram transferidas para um banho de temperatura controlada, previamente ajustado na temperatura desejada, e mantidas em repouso por 3 horas para obtenção da separação de fases e equilíbrio das mesmas. Após o repouso, o volume das fases superior e inferior foi medido e amostras das duas fases foram cuidadosamente retiradas, com auxílio de seringa e agulha, para análise de atividade enzimática conforme descrito no Item 2.2.2. Cada experimento de partição da G6PD foi realizado em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança foram calculados. A Figura 2.1 ilustra o procedimento experimental de extração por sistemas micelares de duas fases aquosas.

FIGURA 2.1 – Esquema ilustrando o procedimento experimental de extração por sistemas micelares de duas fases aquosas: 1 - Tubo de ensaio graduado contendo todos os componentes do sistema: tampão, tensoativo e enzima (sistema monofásico); 2 - Incubação do tubo contendo os componentes na temperatura desejada (variação de $\pm 0,03$ °C) por um período de 3 horas; 3 - Tubo após a separação de fases (sistema bifásico) e coleta de fases com auxílio de seringa e agulha; 4 - Amostras das fases superior (4a) e inferior (4b) para determinações posteriores de atividade enzimática.

2.2.5. Construção da Curva Binodal para o Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão

Para compreender melhor o comportamento da G6PD no sistema micelar de duas fases aquosas e para poder implementar o modelo teórico proposto por NIKAS *et al.* (1992) que descreve interações do tipo volume de exclusão, é necessário conhecer a concentração de tensoativo não-iônico em cada uma das fases do sistema. Portanto, a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4$ /tampão foi determinada.

A curva binodal de solução aquosa tamponada de $C_{10}E_4$ foi determinada de acordo com o método do “ponto de névoa” descrito por BLANKSCHTEIN *et al.* (1986). Este método consiste em, visualmente, identificar a temperatura, $T_{névoa}$, na qual soluções com concentrações conhecidas de tensoativo tornam-se turvas a medida que se aumenta a

temperatura. Soluções contendo diferentes concentrações de $C_{10}E_4$ foram colocadas em um banho transparente termorregulável. Inicialmente cada solução foi resfriada a uma temperatura suficientemente baixa ($\sim 15^\circ\text{C}$) para que o sistema apresentasse uma única fase, clara e homogênea. A partir desse ponto, a temperatura foi lentamente aumentada (de 0,01 em 0,01 $^\circ\text{C}$) até que a solução se tornasse turva. Durante o processo, as soluções foram mantidas sob agitação utilizando-se barras magnéticas e agitador magnético. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada valor de concentração e o ponto de névoa definido como a média dos três valores de temperatura determinados. A curva binodal foi obtida traçando-se os valores de $T_{névoa}$ em função da concentração do tensoativo.

2.3. Teoria de Partição de Proteínas Hidrofílicas Baseada em Interações por Volume de Exclusão

O comportamento de uma proteína em um sistema de duas fases aquosas pode ser caracterizado pelo coeficiente de partição, K_p , definido a seguir:

$$K_p \equiv \frac{C_{p,t}}{C_{p,b}} \quad (2.2)$$

em que $C_{p,t}$ e $C_{p,b}$ são as concentrações de proteína nas fases superior (*top* – *t*) e inferior (*bottom* – *b*), respectivamente

Proteínas hidrofílicas são capazes de se ligar cooperativamente a tensoativos iônicos, resultando em alterações conformacionais da proteína e até mesmo desnaturação completa, dependendo das características da proteína e da quantidade e tipo de tensoativo (CARDAMONE *et al.*, 1994; GODDARD, ANANTHAPADMANABHAN, 1993). Por outro lado, existem evidências consideráveis de que proteínas hidrofílicas, como via de regra, praticamente não se ligam a tensoativos não-iônicos e, portanto, não sofrem desnaturação e nem são incorporadas nas micelas desses tensoativos (GODDARD, ANANTHAPADMANABHAN, 1993). Com base nisto, os tensoativos não-iônicos são preferidos em relação às outras classes de tensoativos (iônicos, zwitteriônicos) para utilização em sistemas micelares de

duas fases aquosas. NIKAS *et al.* (1992) apresentaram uma formulação teórica para descrever e estimar a partição de proteínas hidrossolúveis em sistemas micelares de duas fases aquosas contendo micelas cilíndricas e não-carregadas. De acordo com esta teoria, assume-se que partição de proteínas hidrofílicas é governada primariamente por interações repulsivas estéricas, do tipo “volume de exclusão” (EV). Apesar da diferença de tamanho das micelas e de densidade de micelas entre as duas fases do sistema, o coeficiente de partição micela/água em cada uma das fases do sistema de duas fases aquosas é o mesmo, devido ao fato de as proteínas hidrofílicas praticamente não interagirem com as micelas não-carregadas.

Para aplicação da teoria, os ensaios de partição são realizados em concentrações diluídas de proteínas (até aproximadamente 0,5 g/L). Desta forma, a separação de fases da solução micelar praticamente não sofre alterações pela presença da proteína. Esta observação explica o fato de que, como uma primeira aproximação, o efeito da proteína na forma, tamanho e distribuição de tamanho das micelas, bem como as interações proteína-proteína, são ignorados no cálculo de K_p . Além disso, as proteínas (hidrofílicas) são tratadas como esferas rígidas. As soluções micelares que constituem as duas fases coexistentes são modeladas sob condições de idealidade com relação ao solvente, no que diz respeito às micelas. Nestas condições, as interações atrativas (do tipo van der Waals) e as de volume de exclusão existentes entre as micelas de tensoativo não-iônico cancelam-se entre si. Portanto, as interações atrativas intermicelares são ignoradas e assume-se que as micelas cilíndricas sejam interpenetráveis e polidispersas, e que interajam somente com proteínas adjacentes, através de efeito estérico de volume de exclusão. O efeito da existência de uma diferença de potencial eletrostático na interface do sistema (devido à presença dos sais do tampão) também não é considerado, pois acredita-se que o efeito de volume de exclusão seja dominante sobre qualquer outro efeito. Considera-se ainda no modelo que os monômeros em solução não exercem nenhum efeito significativo na partição das proteínas, pois estão presentes em baixas concentrações e a concentração é aproximadamente a mesma nas duas

fases. Com base nestas aproximações, o coeficiente de partição de proteínas hidrofílicas em sistemas micelares não-iônicos de duas fases aquosas foi modelado e a seguinte equação foi obtida (KAMEI et al., 2002b; LUE, BLANKSCHTEIN, 1996; NIKAS et al., 1992):

$$K_p^{EV} = \exp \left[-(\phi_t - \phi_b) \left(1 + \frac{R_p}{R_o} \right)^2 \right] \quad (2.3)$$

em que ϕ_t e ϕ_b são as frações volumétricas de tensoativo nas fases superior e inferior, respectivamente, R_p é o raio hidrodinâmico da proteína e R_o é o raio da sessão transversal de cada micela cilíndrica. De acordo com a equação (3.3), a partição de proteínas hidrofílicas em sistemas micelares de duas fases aquosas é governada primariamente por interações estéricas repulsivas do tipo volume de exclusão (EV), as quais direcionam a proteína preferencialmente para a fase pobre em micelas, na qual a mesma encontra um maior volume livre (LUE, BLANKSCHTEIN, 1996). O raio hidrodinâmico da G6PD, calculado com base nas dimensões de seu cristal isomorfo (ROWLAND et al. 1994), é de 68 Å. O raio da sessão transversal das micelas de C₁₀E₄ foi estimado em 21 Å, baseando-se no modelo molecular de micelização desenvolvido por PUVVADA, BLANKSCHTEIN (1990). O valor de $(\phi_t - \phi_b)$ pode ser obtido a partir da curva binodal, uma vez que ambas as fases apresentam massa específica de aproximadamente 1 g/mL e, portanto, as frações de massa podem ser aproximadas como frações volumétricas.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Curva Binodal para o Sistema C₁₀E₄/Tampão

Para compreender melhor o comportamento da G6PD no sistema micelar de duas fases aquosas a curva binodal foi determinada. Esta curva representa o limite, em função da temperatura e da concentração de tensoativo, no qual a solução micelar se separa em duas fases

macroscópicas (NIKAS *et al.*, 1992). Na Figura 2.2 a curva binodal obtida experimentalmente para o sistema $C_{10}E_4$ /tampão é apresentada.

FIGURA 2.2 – Curva binodal para o sistema $C_{10}E_4$ /tampão, obtida experimentalmente. Cada ponto na curva corresponde a um ponto de névoa, caracterizando a transição do sistema monofásico para o sistema de duas fases aquosas. A linha em vermelho representa uma linha de amarração, sendo C_t e C_b as concentrações de $C_{10}E_4$ nas fases superior e inferior, respectivamente, do sistema submetido à separação de fases na temperatura correspondente à linha de amarração. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A curva binodal obtida está de acordo com curvas descritas previamente na literatura para o sistema $C_{10}E_4$ /tampão McIlvaine (NIKAS *et al.*, 1992). A diferença existente consiste apenas em um deslocamento com relação ao eixo das ordenadas, que pode ser justificado pelo fato de ter sido utilizado $C_{10}E_4$ de lotes diferentes em cada caso, apesar de o fabricante ser o mesmo. Essa diferença ocorre devido ao fato de que os tensoativos da classe dos C_iE_j de uma forma geral, e nesse caso particularmente o $C_{10}E_4$,

apresentam um certo grau de polidispersão no polímero de óxido de etileno que constitui a parte polar da molécula. A presença de impurezas provenientes da síntese do tensoativo também pode causar pequenas diferenças nos valores dos pontos de névoa, porém o perfil da curva permanece sempre constante para um dado tensoativo. Considerando-se que a curva binodal para este sistema apresenta concavidade para cima, o ponto mínimo é denominado "ponto crítico inferior", sendo caracterizado pela temperatura crítica (T_c) e pela concentração crítica de agente tensoativo (X_c). Para uma dada temperatura, uma linha de amarração (*tie-line*) pode ser traçada no diagrama de fases, como esquematizado na Figura 2.2 pela linha tracejada em vermelho. Para esta temperatura, qualquer solução de $C_{10}E_4$ cuja concentração corresponda a um ponto na linha de amarração apresenta separação de fases resultando em uma fase superior de composição C_t (% p/p) e uma fase inferior de composição C_b (% p/p). O que difere de acordo com a concentração inicial de tensoativo adicionada ao sistema é o volume de cada fase. Como ambas as fases apresentam massa específica de aproximadamente 1 g/mL, as porcentagens de $C_{10}E_4$ em massa são aproximadamente iguais às porcentagens volumétricas. Portanto, o valor de $(\phi_t - \phi_b)$ corresponde ao comprimento da linha de amarração dividido por 100 (para conversão de porcentagem em fração volumétrica), ou seja, $(\phi_t - \phi_b) = (C_t - C_b)/100$.

A linha de amarração pode ser caracterizada pela razão volumétrica entre as fases ($R = V_t/V_b$), sendo que o segmento de reta da linha de amarração que une os pontos referentes à concentração inicial da solução e a concentração da fase inferior é proporcional ao volume da fase superior (V_t), e o segmento de reta da linha de amarração que une os pontos referentes à concentração inicial da solução e a concentração da fase superior é proporcional ao volume da fase inferior (V_b).

De acordo com a teoria de partição de proteínas em sistemas micelares não-iônicos de duas fases aquosas e com a análise do diagrama de fases apresentado na Figura 2.2, para uma dada proteína hidrofílica (R_p constante) e um dado tensoativo (R_o constante), o aumento da temperatura

de extração (T) causa um aumento no efeito de volume de exclusão ($\phi_t - \phi_b$) e conseqüente redução no valor de K_p .

2.4.2. Avaliação da Estabilidade da G6PD na Presença do Tensoativo $C_{10}E_4$

A Figura 2.3 apresenta os resultados da análise da estabilidade da G6PD na presença de $C_{10}E_4$. Como pode ser observado, a enzima mostrou-se bastante estável frente ao tensoativo, sendo que uma recuperação de aproximadamente 100%, considerando-se o erro experimental, foi obtida para concentrações de até 8% de $C_{10}E_4$. Apesar de observar-se um efeito de perda de estabilidade com o aumento da concentração de tensoativo, praticamente 90% da atividade de G6PD é recuperada mesmo em soluções apresentando altas concentrações de $C_{10}E_4$ (12 - 14% p/p).

FIGURA 2.3 – Recuperação da atividade da enzima G6PD após 6 horas de exposição a diferentes concentrações de $C_{10}E_4$. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Portanto, pode-se concluir que o tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ é ameno à G6PD, não apresentando um alto grau de ligação na proteína, e que a técnica de extração por sistema micelar não-iônico de duas fases aquosas é adequada para a G6PD. Além disto, o fato de a G6PD praticamente não se ligar ao tensoativo $C_{10}E_4$ é importante para aplicação do modelo teórico apresentado, uma vez que o mesmo só considera interações do tipo volume de exclusão entre proteínas e micelas.

2.4.3. Partição da G6PD no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão

A partição da G6PD em sistema $C_{10}E_4$ /tampão foi estudada para diferentes temperaturas e concentrações de tensoativo. Na Figura 2.4, o sistema $C_{10}E_4$ /tampão obtido é apresentado, podendo-se observar claramente a presença de duas fases aquosas transparentes, imiscíveis, separadas por uma interface.

FIGURA 2.4 – Ilustração do sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas obtido.

Os resultados de coeficiente de partição (K_{G6PD}) e balanço de atividade (BA_{G6PD}) obtidos estão apresentados na Tabela 2.1. sendo o balanço de atividade definido a seguir:

$$BA_{G6PD} = \frac{C_{G6PD,t}V_t + C_{G6PD,b}V_b}{C_{G6PD,i}V_i} \times 100\% \quad (3.11)$$

em que $C_{G6PD,t}$, $C_{G6PD,b}$ e $C_{G6PD,i}$ referem-se às concentrações de G6PD nas fases superior, inferior, e na solução estoque de enzima inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. V_t , V_b e V_i são os volumes das fases superior, inferior, e da solução estoque de G6PD inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente.

TABELA 2.1 – Resultados experimentais da partição da G6PD em sistema $C_{10}E_4$ /tampão, para diferentes temperaturas e concentrações de tensoativo $C_{10}E_4$. K_{G6PD} corresponde ao coeficiente de partição, BA_{G6PD} corresponde ao balanço de atividade e R corresponde à razão volumétrica entre as fases. Os erros apresentados correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

EXPERIMENTO	$[C_{10}E_4]$ (% p/p)	T (°C)	R (V_t/V_b)	K_{G6PD}	BA_{G6PD} (%)
1	2.50	19,5	0,76	$0,53 \pm 0,04$	97 ± 9
2	3.60	20,0	1,00	$0,36 \pm 0,00$	104 ± 4
3	3.25	20.4	0.60	$0,33 \pm 0,01$	108 ± 7
4	3.00	21.5	0,35	$0,20 \pm 0,04$	101 ± 6
5	5.00	22,0	0,60	$0,10 \pm 0,01$	101 ± 2

De acordo com a Tabela 2.1, os resultados de balanço de atividade (BA_{G6PD}) foram de aproximadamente 100% para todos os experimentos realizados, portanto reafirmado que a G6PD apresenta-se estável nos sistemas de duas fases aquosas contendo o tensoativo $C_{10}E_4$, sem perda significativa de atividade. Esta observação confirma a aplicabilidade desta técnica para a extração da G6PD. Como era previsto, o valor de K_{G6PD} para todas as condições testadas foi inferior a 1, pois a enzima é hidrofílica e, portanto não é atraída hidrofobicamente para a fase superior, rica em

micelas não-carregadas. Ao contrário, a enzima migra preferencialmente para a fase inferior, pobre em micelas, onde existe um maior volume disponível. Os resultados de K_{G6PD} mostram ainda que, com o aumento da temperatura do sistema ocorre uma diminuição no valor de K_{G6PD} obtido.

Para se comparar os resultados experimentais de K_{G6PD} apresentados na Tabela 2.1 com o modelo matemático proposto por NIKAS *et al.* (1992) (Eq. 2.3) é necessário conhecer o valor de $(\phi_t - \phi_b)$ para cada experimento realizado. Como explicado no Item 2.4.1, o valor de $(\phi_t - \phi_b)$ pode ser obtido a partir da curva binodal, uma vez que a temperatura de separação de fases é conhecida. A Tabela 2.2 apresenta os valores de concentração de C_{10E4} resultantes nas fases superior e inferior de cada experimento, obtidos com base na curva binodal para o sistema C_{10E4} /tampão, e os respectivos valores de $(\phi_t - \phi_b)$ calculados.

TABELA 2.2 – Valores de concentração de C_{10E4} resultantes nas fases superior (C_t) e inferior (C_b) de cada experimento, obtidos com base na curva binodal para o sistema C_{10E4} /tampão, e os respectivos valores de $(\phi_t - \phi_b)$ calculados. ϕ_t e ϕ_b correspondem às frações volumétricas de tensoativo nas fases superior e inferior, respectivamente.

EXPERIMENTO	$[C_{10E4}]$ (% p/p)	T (°C)	C_t (% p/p)	C_b (% p/p)	$(\phi_t - \phi_b)$
1	2,50	19,5	5,2	0,70	0,046
2	3,60	20,0	7,0	0,40	0,066
3	3,25	20,4	8,0	0,15	0,079
4	3,00	21,5	10,0	0,10	0,105
5	5,00	22,0	12,0	0,20	0,118

Como pode ser observado na Tabela 2.2, o valor de $(\phi_t - \phi_b)$ aumenta com o aumento da temperatura de extração. Este efeito pode ser mais bem visualizado analisando-se a curva binodal apresentada na Figura 2.2. Os valores de $(\phi_t - \phi_b)$ obtidos foram utilizados para calcular os coeficientes de partição aplicando-se a teoria de volume de exclusão apresentada no Item

2.3. A Figura 2.5 apresenta a comparação entre os valores de K_{G6PD} obtidos experimentalmente e os obtidos com base na teoria.

FIGURA 2.5 – Comparação entre os valores de K_{G6PD} obtidos experimentalmente no sistema $C_{10}E_4$ /tampão (■) e os estimados pela teoria (—), em função do volume de exclusão $(\phi_t - \phi_b)$. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos experimentalmente.

As curvas apresentadas na Figura 2.5 mostram uma boa correlação quantitativa entre os coeficientes de partição estimados pela teoria e os obtidos experimentalmente. Um dos fatores que pode ter influenciado na diferença entre os valores teóricos obtidos a partir do modelo e os valores experimentais atribui-se ao fato de que a G6PD é uma proteína globular, porém com formato elipsoidal (ROWLAND *et al.* 1994), sendo que no modelo as proteínas são aproximadas como esferas rígidas. Além disso, outras simplificações são feitas para facilitar o tratamento matemático. Desta forma, as interações proteína-proteína, as interações micela-micela e a diferença de potencial eletrostático presente na interface do sistema são ignorados.

A expulsão da G6PD da fase superior (rica em micelas), refletida pela diminuição do valor de K_{G6PD} , está relacionada ao aumento da diferença de fração volumétrica de tensoativo entre as fases superior e inferior ($\phi_t - \phi_b$). Portanto, quanto menor o espaço disponível na fase superior, menor o valor de K_{G6PD} .

LIU *et al.* (1995) estudaram a extração de diversas proteínas (citocromo c, ovalbumina, albumina de soro bovino - BSA e catalase) em diferentes temperaturas e também obtiveram boa correlação entre os valores de coeficiente de partição obtidos teórica e experimentalmente. Comparando-se os valores de K_{G6PD} apresentados na Tabela 2.1 com os dados obtidos por esses autores verifica-se que, para uma dada temperatura (valor de $(\phi_t - \phi_b)$ fixo), o coeficiente de partição diminui conforme o tamanho da proteína aumenta. Desta forma, para $(\phi_t - \phi_b) = 0,10$ a G6PD, cujo raio hidrodinâmico é o maior ($R_p = 68 \text{ \AA}$), apresentou o menor coeficiente de partição, seguida da catalase ($R_p = 52 \text{ \AA}$), BSA ($R_p = 36 \text{ \AA}$), ovalbumina ($R_p = 29 \text{ \AA}$) e por fim o citocromo c ($R_p = 19 \text{ \AA}$) com o maior coeficiente de partição obtido. Esta tendência está de acordo com a teoria do volume de exclusão, pois para um dado valor de $(\phi_t - \phi_b)$, proteínas maiores são mais excluídas para a fase inferior, pobre em micelas, do que proteínas menores. É importante ter em mente que o valor de R_0 é fixo para um determinado sistema (ver Eq. 2.3). A Figura 2.6 mostra a variação de K_p em função de R_p/R_0 para um efeito de volume de exclusão $(\phi_t - \phi_b)$ constante, obtida teórica e experimentalmente com base nos resultados apresentados por LIU *et al.* (1995) e nos resultados obtidos para a G6PD.

FIGURA 2.6 – Variação do valor de K_p em função de R_p/R_0 em sistema $C_{10}E_4$ /tampão, calculada de acordo com o modelo teórico. R_p é o raio hidrodinâmico da proteína, $R_0 = 21\text{Å}$ é o raio da seção transversal das micelas. O valor de $(\phi_t - \phi_b)$ foi fixo em 0,10. Os diversos símbolos correspondem aos valores de K_p obtidos experimentalmente para as seguintes proteínas: citocromo c ($\blacklozenge$, $R_p = 19\text{ Å}$), ovalbumina ($\blacktriangle$, $R_p = 29\text{ Å}$), BSA ($\bullet$, $R_p = 36\text{ Å}$), catalase ($\blacksquare$, $R_p = 52\text{ Å}$), G6PD ($\blacklozenge$, $R_p = 68\text{ Å}$).

Considerando os resultados obtidos nesse trabalho e os encontrados na literatura (LIU *et al.*, 1995, 1996), pode-se afirmar que o modelo proposto apresenta uma razoável aproximação no cálculo de coeficiente de partição de proteínas hidrofílicas em sistemas micelares não-iônicos de duas fases aquosas, auxiliando no estudo e otimização deste processo.

2.5. Conclusões

A partição da enzima G6PD em sistema micelar de duas fases aquosas formado pelo tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ foi estudada. O sistema mostrou-se adequado para a G6PD, não sendo observado efeito de desnaturação da enzima. Em todos os experimentos realizados, a G6PD foi recuperada preferencialmente na fase inferior do sistema $C_{10}E_4$ /tampão, na

qual existe um volume maior disponível, sendo excluída da fase superior, concentrada em micelas. Este fato pode ser comprovado pelos valores de coeficiente de partição inferiores a 1. Observou-se ainda que a expulsão da G6PD da fase superior (rica em micelas), refletida pela diminuição do valor de K_{G6PD} , está relacionada ao aumento da diferença de fração volumétrica de tensoativo entre as fases superior e inferior ($\phi_t - \phi_b$). Como esta diferença aumenta com o aumento da temperatura, o valor de K_{G6PD} diminui com o aumento da temperatura.

A teoria baseada em interações do tipo volume de exclusão, recentemente desenvolvida por NIKAS *et al.* (1992), foi utilizada para estimar o coeficiente de partição de G6PD em sistema micelar de duas fases aquosas C₁₀E₄/tampão. Os valores de K_{G6PD} estimados pela teoria apresentaram uma boa correlação quantitativa com os valores obtidos experimentalmente, demonstrando a aplicabilidade da teoria no direcionamento de estratégias de purificação de proteínas.

Concluindo, o sistema micelar não-iônico de duas fases aquosas pode ser considerado adequado para a purificação da enzima G6PD. Apesar de os valores de coeficiente de partição obtidos serem inferiores a 1, esta técnica apresenta-se promissora para a purificação de G6PD. Porém, estudos referentes à partição desta enzima em sistemas micelares mistos contendo tensoativos iônicos, ou ainda sistemas micelares contendo ligantes de afinidade devem ser conduzidos com o intuito de se investigar a possibilidade de melhores resultados na partição.

CAPÍTULO III

PARTIÇÃO DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD) EM SISTEMAS MICELARES MISTOS (NÃO-IÔNICO/CATIÔNICO) DE DUAS FASES AQUOSAS

Carlota O. Rangel-Yagui^{1,2}, Henry Lam¹, Daniel T. Kamei^{1,†}, Daniel I. C. Wang¹, Adalberto Pessoa-Jr², and Daniel Blankschtein¹

¹Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139

² Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology /FCF, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Palavras chaves: Glicose-6-fosfato desidrogenase, sistema micelar misto de duas fases aquosas, purificação de proteínas, interações eletrostáticas.

Endereço do autor para correspondência:

Daniel Blankschtein

MIT - Department of Chemical Engineering, Room 66-444

77 Massachusetts Avenue

Cambridge, MA 02139

Tel: (617) 253-4594

Fax: (617) 252-1651

e-mail: dblank@mit.edu

[†] Present address: Biotechnology Process Engineering Center, MIT, Cambridge, MA 02139.

* Artigo publicado no periódico *Biotechnology and Bioengineering* (ver Anexo 4).

Este capítulo apresenta um estudo da partição da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em sistema micelar *misto* (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas. Foram estudados sistemas formados pelo tensoativo não-iônico óxido de n-deciltetraetileno ($C_{10}E_4$) adicionado de um tensoativo catiônico do tipo brometo de alquiltrimetilamônio (C_nTAB , $n = 8, 10$ e 12). A partição da enzima foi realizada nos três sistemas, em diferentes concentrações de tensoativo catiônico, sendo que a curva binodal de cada sistema, em temperatura fixa, foi determinada. Os resultados obtidos são discutidos, inclusive teoricamente, e comparados com resultados de partição obtidos em sistema micelar *não-iônico* de duas fases aquosas.

3.1. Introdução

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (EC 1.1.1.49), primeira enzima da via das pentoses, catalisa a oxidação de glicose-6-fosfato utilizando NADP^+ ou NAD^+ gerando pentoses para a síntese de nucleotídeos. assim como NADPH/NADH para utilização em biossínteses redutivas e proteção contra stress oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998; ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994).

Esta enzima hidrofílica é amplamente encontrada na natureza, estando presente em quase todos os tecidos animais e microrganismos. Na maioria das espécies, a G6PD apresenta uma subunidade com massa molar de 50 – 60 kDa, correspondendo a aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos. Esta enzima normalmente aparece na forma de dímeros ou tetrâmeros (ROWLAND *et al.*, 1994), sendo que a G6PD proveniente de *Leuconostoc mesenteroides*, fonte utilizada no presente estudo, é um dímero (COHEN, ROSEMEYER, 1969).

A deficiência enzimática de G6PD corresponde a uma das enzimopatias mais freqüentes em humanos, resultando de mais de 90 mutações genéticas diferentes (CHIM *et al.*, 2001). Apesar de ser geralmente assintomática, a deficiência de G6PD pode levar à anemia hemolítica após exposição a stress oxidativo, ou devido a certas infecções como hepatite (CHIM *et al.*, 2001, KRZELJ *et al.*, 2001). Desta forma, diversos estudos médicos e bioquímicos envolvendo esta enzima têm sido realizados (ALTIKAT *et al.*, 2001; AU *et al.*, 2000; COBAN *et al.*, 2002; ISHIBASHI *et al.*, 1999).

A G6PD também apresenta grande interesse como reagente analítico, sendo utilizada em vários ensaios quantitativos incluindo a determinação de atividade de creatina-quinase para diagnóstico de doenças cardíacas e de músculo esquelético, medidas de concentração de hexoses, e marcador de enzima imunoensaios (LOJUDICE *et al.*, 2001). Como biossensor, a G6PD pode monitorar rapidamente a concentração de glicose-6-fosfato no sangue com menor custo e consumo de tempo do que os métodos tradicionais como cromatografia e espectroscopia (BASSI *et al.*, 1999).

A purificação industrial da enzima G6PD tem sido feita através de processos de múltiplas etapas, os quais envolvem técnicas de custo elevado como cromatografia de afinidade e cromatografia de troca-iônica (CHAMPLUVIER, KULA, 1992; CHANG, CHASE, 1996; CHANG *et al.*, 1995, MCCREATH *et al.*, 1995). Portanto, o custo desta enzima como reagente analítico é alto, o que torna a pesquisa de métodos de purificação de G6PD mais simples e econômicos bastante interessante.

A extração líquido-líquido tem sido considerada uma técnica promissora no campo de purificação de proteínas, sendo que biosseparações têm sido conduzidas em diferentes tipos de sistemas de duas fases aquosas compostos por fluidos complexos (ALBERTSSON, 1956; BORDIER, 1982; JOHANSSON *et al.*, 1996, 1999; KAMEI *et al.*, 2002a; SIVARS, TJERNELD, 2000; SIVARS *et al.*, 2000). Particularmente, os sistemas micelares de duas fases aquosas exploram o fato de que determinadas soluções micelares, sob condições apropriadas, são capazes de espontaneamente separar-se em duas fases aquosas, ainda que imiscíveis, dentre as quais proteínas e outras biomoléculas podem se distribuir de forma desigual (LIU *et al.*, 1998).

Uma solução aquosa do tensoativo óxido de *n*-decil tetraetileno ($C_{10}E_4$), por exemplo, é capaz de separar-se macroscopicamente em duas fases, com o aumento da temperatura, resultando em uma fase rica em micelas e uma fase pobre em micelas. Como a concentração de $C_{10}E_4$ em ambas as fases excede a concentração micelar crítica (CMC), micelas estão presentes tanto na fase superior quanto na fase inferior (LIU *et al.*, 1996). Mais especificamente, ambas as fases contêm micelas cilíndricas, as quais podem ser modeladas como micelas formadas por um corpo cilíndrico terminando em duas micelas hemisféricas nas extremidades (PUVVADA, BLANKSCHTEIN, 1990; ZOELLER *et al.*, 1997). Entretanto, as micelas de $C_{10}E_4$ presentes na fase superior são maiores (mais alongadas) e mais abundantes do que as micelas de $C_{10}E_4$ presentes na fase inferior. Esta diferença no ambiente físico-químico das duas fases consiste na base da utilização destes sistemas em processos de extração (LIU *et al.*, 1996).

Quando comparado ao extensivamente estudado sistema polimérico de duas fases aquosas (ABBOTT *et al.*, 1990, 1991, 1992; ALBERTSSON, 1986), os sistemas micelares de duas fases aquosas apresentam uma série de características únicas e desejáveis, incluindo a natureza auto-associativa das micelas, que permite o controle e a otimização da partição através do ajuste das características micelares, e a capacidade das micelas de oferecerem simultaneamente ambientes hidrofílico e hidrofóbico aos solutos, permitindo maior seletividade na partição de acordo com a hidrofobicidade da biomolécula (LIU *et al.*, 1996). Além disso, a partição pode se tornar ainda mais seletiva através da utilização de micelas mistas compostas de tensoativos carregados ou tensoativos do tipo ligante de afinidade, misturados com tensoativos não-iônicos (LEE, SU, 1999; SAITOH, HINZE, 1995; SIVARS *et al.*, 2000). Neste sentido, KAMEI *et al.* (2002a,b) recentemente demonstraram que atrações eletrostáticas entre proteínas carregadas e micelas mistas de carga oposta podem ser exploradas para aumentar o rendimento e a seletividade de sistemas micelares mistos compostos de tensoativos não-iônico e aniônico.

Embora os tensoativos iônicos possam se ligar a proteínas e causar desnaturação das mesmas, tem sido demonstrado que este efeito é dependente do tipo e concentração de tensoativo iônico (GELAMO, TABAK, 2000; SEN *et al.*, 1981). Desta forma, é possível a criação de micelas mistas, visando a um incremento no coeficiente de partição de proteínas hidrofílicas, pela adição de quantidades adequadas de um tensoativo iônico a um tensoativo não-iônico passível de separação de fases. A quantidade de tensoativo iônico adicionada deve ser suficientemente alta para causar uma mudança significativa no comportamento de partição da proteína, porém suficientemente baixa para evitar desnaturação severa da proteína (KAMEI *et al.*, 2002a,b).

Neste trabalho, a partição da enzima G6PD em sistemas micelares mistos de duas fases aquosas compostos pelo tensoativo não-iônico óxido de n-deciltetraetileno ($C_{10}E_4$) e pelo tensoativo catiônico brometo de alquiltrimetilamônio (C_nTAB , $n = 8, 10$ e 12) foi estudada, teórica e

experimentalmente. Semelhantemente ao sistema micelar não-iônico de duas fases aquosas ($C_{10}E_4$ /tampão), o sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão) apresenta uma única fase micelar, homogênea, que pode se separar em uma fase superior, rica em micelas, e uma fase inferior, pobre em micelas, com o aumento da temperatura. Porém, todas as micelas presentes no sistema $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão são micelas mistas, compostas tanto pelo tensoativo $C_{10}E_4$ quanto pelo tensoativo C_nTAB ($n = 8, 10$ ou 12) (KAMEI *et al.*, 2002a). Essas micelas mistas ($C_{10}E_4/C_nTAB$) positivamente carregadas devem influenciar o perfil de partição da qualquer proteína carregada. Especificamente, a enzima G6PD que possui uma carga global negativa em pH neutro deve ser atraída eletrostaticamente para a fase superior, rica em micelas mistas positivamente carregadas, como esquematizado na Figura 3.1.

FIGURA 3.1 – Representação esquemática do comportamento esperado para a G6PD em sistemas micelares mistos (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas. A enzima com carga global negativa em pH neutro deve ser atraída eletrostaticamente para a fase superior, rica em micelas mistas positivamente carregadas.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Materiais

O tensoativo não-iônico óxido de *n*-deciltetraetileno ($C_{10}E_4$, lote no. 6011) foi adquirido da Nikko Chemicals (Tóquio, Japão). Os tensoativos catiônicos brometo de *n*-octiltrimetilamônio (C_8TAB , lote no. OGK01) e brometo de *n*-deciltrimetilamônio ($C_{10}TAB$, lote no. OGI01) foram obtidos da TCI-America (Portland, OR). O tensoativo catiônico brometo de *n*-dodeciltrimetilamônio ($C_{12}TAB$, lote no. 63H0519), a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* (lote no. 50K8612), a glicose-6-fosfato (lote no. 40K7014), e o fosfato de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NADP⁺, lote no. 80K7046) foram todos obtidos da Sigma (St. Louis, MO). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em tampão de McIlvaine pH 7,2, consistindo de 16,4 mM de fosfato de sódio dibásico e 1,82 mM de ácido cítrico. Foi utilizada água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Toda a vidraria utilizada nos experimentos foi lavada em um banho de hidróxido de sódio 1 M em solução alcoólica a 50%, seguido de um banho de ácido nítrico 1 M, enxaguada abundantemente com água Milli-Q, e finalmente seca em estufa a 90 °C.

3.2.2. Determinação da Concentração de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A determinação da concentração de G6PD em solução aquosa, contendo ou não tensoativos, foi baseada no ensaio enzimático (BERGMEYER, 1983), com algumas modificações devido às condições dos experimentos de partição. Desta forma, o Tampão McIlvaine foi utilizado ao invés de tampão Tris-HCl e a temperatura foi diminuída de 37 °C para 15 °C para prevenir a ocorrência de turbidez/separação durante a medida de atividade. A concentração de G6PD foi considerada proporcional à atividade enzimática, medida determinando-se a velocidade de formação de NADPH, o qual absorve em comprimento de onda U.V. a 340 nm (coeficiente de

extinção molar $E = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma unidade de G6PD (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de NADP^+ por minuto, nas condições de ensaio. As concentrações de cada reagente na cubeta espectrofotométrica foram: 900 μL de tampão McIlvaine pH 7,2, 20 μL de solução de glicose-6-fosfato 250 mM, 5 μL de solução de NADP^+ 131 mM e 20 μL de amostra contendo G6PD a ser determinada. O aumento de absorbância foi acompanhado por 50 segundos, logo após adição da amostra, em aparelho espectrofotômetro Shimadzu UV-160U.

3.2.3. Determinação da Concentração de Tensoativo Catiônico

A concentração de tensoativo catiônico em cada uma das duas fases micelares foi determinada com base na metodologia de titulação de duas fases descrita por TSUBOUCHI *et al.* (1981). Entretanto, ao invés de solução tampão de fosfato pH 6,0 presente no protocolo original, utilizou-se tampão McIlvaine pH 6,0 dado que este tampão foi utilizado nos ensaios de partição. Em um frasco Erlenmeyer de 200mL colocaram-se 5mL de solução tampão, 2 gotas do indicador éster etílico de tetrabromofenolftaleína (solução a 0,2% em etanol) e 1 mL de 1,2-dicloroetano. Em seguida, adicionou-se a amostra contendo o tensoativo catiônico (0,1 a 0,8 mL, dependendo da concentração aproximada de tensoativo presente na amostra). A mistura foi titulada utilizando-se solução de tetrafenilborato de sódio 10 mM, sob agitação manual contínua de forma a garantir o equilíbrio entre as fases orgânica (1,2-dicloroetano) e aquosa.

Na ausência do titulante tetrafenilborato, o indicador tetrabromofenolftaleína forma um par iônico com o tensoativo catiônico ionizado. Neste complexo, o indicador encontra-se na forma dissociada e absorve luz em $\lambda_{\text{máx}} = 610 \text{ nm}$ (azul). No decorrer da titulação, o tetrafenilborato adicionado vai complexando com o tensoativo catiônico, sendo que o indicador retorna à sua forma não-dissociada. Ao fim da titulação, quando todo o indicador encontra-se não dissociado, a coloração da fase orgânica muda de azul céu para um amarelo pálido ($\lambda_{\text{máx}} = 410 \text{ nm}$).

Portanto, a concentração de tensoativo catiônico pode ser calculada com base na quantidade de titulante tetrafenilborato de sódio gasta na titulação.

3.2.4. Avaliação da Estabilidade da G6PD na Presença dos Tensoativos C_nTAB (n = 8, 10 ou 12)

Antes de se iniciar os estudos de extração, a estabilidade da enzima G6PD frente aos três tensoativos catiônicos estudados foi avaliada. Para isso, soluções contendo 0,0068% (p/p) de G6PD foram preparadas a partir de uma solução estoque e incubadas a 25 °C na presença de 2,5 mM de cada um dos tensoativos C_nTAB. Esta concentração de tensoativo catiônico assegurou que apenas monômeros estivessem presentes em solução, uma vez que o valor utilizado é inferior às CMCs dos três tensoativos estudados. Desta forma, o efeito comparativo de desnaturação da G6PD pelos monômeros de cada tensoativo pôde ser avaliado. A atividade enzimática nas soluções foi acompanhada durante um período de 7 horas (420 minutos) e a recuperação da atividade foi calculada em diferentes períodos de tempo, de acordo com a equação:

$$\text{Recuperação Atividade (\%)} = \frac{A_{G6PD, \text{sol}} \times 100}{A_{G6PD, i}} \quad (2.1)$$

em que $A_{G6PD, \text{sol}}$ corresponde à atividade enzimática determinada na solução, no respectivo intervalo de tempo, e $A_{G6PD, i}$ é a atividade inicial da solução. A concentração de G6PD foi a mesma utilizada nos ensaios de extração.

3.2.5. Preparação do Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

Os sistemas micelares de duas fases aquosas foram preparados em tubos de ensaio graduados de 10 mL, pela adição de C₁₀E₄, C_nTAB (n = 8, 10, ou 12), e G6PD nas quantidades desejadas em tampão McIlvaine, resultando em um sistema de massa total de 3 g. Como o ensaio enzimático para determinação de G6PD é bastante sensível, a concentração

de enzima utilizada foi de apenas 0,0068% (p/p), prevenindo alterações nas curvas binodais. Os componentes do sistema foram adicionados por pesagem, homogeneizados manualmente e equilibrados a 4 °C de modo a exibir uma única fase límpida e homogênea. Subseqüentemente, as soluções foram transferidas para um banho de temperatura controlada, previamente ajustado para o valor desejado, e mantidas em repouso por 3 horas para obtenção da separação de fases e equilíbrio das mesmas. Experimentos preliminares mostraram que o perfil de partição da G6PD após 3 horas de repouso é o mesmo que o observado após 21 horas de repouso, justificando o tempo escolhido (ver Item 3.4.1). Após o repouso, o volume das fases superior e inferior foi medido e amostras das duas fases foram cuidadosamente retiradas, com auxílio de seringa e agulha, para análise de atividade enzimática conforme descrito no Item 3.2.2. Cada experimento de partição da G6PD foi realizado em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança foram calculados.

3.2.6. Construção das Curvas Binodais para os Sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /Tampão

Para compreender melhor o comportamento da G6PD no sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_nTAB$) de duas fases aquosas e para poder implementar o modelo teórico proposto por KAMEI *et al.* (2002a) que descreve além das interações de volume de exclusão as interações eletrostáticas, é necessário conhecer as concentrações de tensoativos não-iônico e catiônico em cada uma das fases do sistema. A concentração de tensoativo catiônico foi determinada por titulação, conforme descrito no Item 3.2.3. Portanto, as curvas binodais para os diversos sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão estudados foram mapeadas, nas mesmas temperaturas utilizadas nos experimentos de partição, para determinação das concentrações de tensoativo não-iônico em cada uma das fases a partir das intersecções da linha de amarração com a curva binodal. Para um sistema micelar $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão a uma dada temperatura e pressão, a curva binodal pode ser representada como uma curva de concentração de

$C_{10}E_4$ em função da concentração de C_nTAB , como esquematizado na Figura 3.2.

FIGURA 3.2 – Representação esquemática do diagrama de fases de um sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_nTAB$) de duas fases aquosas a temperatura e pressão constantes. A linha sólida representa a curva binodal. A linha tracejada representa uma linha de amarração, onde qualquer composição localizada neste segmento, tal como o ponto **A**, sofre separação de fases resultando em uma fase superior correspondendo ao ponto **B** em composição e uma fase inferior correspondendo ao ponto **C** em composição.

De acordo com a Figura 3.2, uma solução de tensoativos com composição representada pelo ponto **A** exibe separação de fases e a composição das fases superior e inferior resultantes correspondem aos pontos **B** e **C**, respectivamente. A linha conectando os pontos **B** e **C** é uma linha de amarração, sendo que qualquer sistema com composição representada por pontos nesta linha exibe separação de fases resultante em fases superior e inferior com composições correspondentes aos pontos **B** e **C**, diferindo apenas os volumes das fases conforme a composição inicial (ALBERTSSON, 1986). Se conhecermos as concentrações de tensoativo catiônico nas fases superior e inferior de um sistema micelar misto de duas

fases aquosas em temperatura e pressão constantes (isto é, as coordenadas do eixo x para os pontos **B** e **C** na Figura 3.2), é possível determinar as concentrações de tensoativo não-iônico nas fases superior e inferior (isto é, as coordenadas do eixo y para os pontos **B** e **C** na Figura 3.2) a partir da curva binodal obtida experimentalmente.

Para o mapeamento das curvas binodais, foi utilizado o procedimento previamente descrito por KAMEI *et al.* (2002a), similar àquele empregado para determinação de curvas de coexistência de sistemas poliméricos de duas fases aquosas (ALBERTSSON, 1986). Este procedimento baseia-se no fato de que a curva binodal marca a transição entre uma solução clara, transparente (uma fase) e uma “solução” turva (duas fases), visível a olho nu. Uma massa conhecida (aproximadamente 0,5 mg) de solução concentrada de $C_{10}E_4$ em tampão foi equilibrada à temperatura desejada em um banho termorregulado, apresentando-se turva. Uma solução de concentração conhecida de C_nTAB ($n = 8, 10, \text{ ou } 12$) em tampão foi adicionada, gota por gota, até que a solução se tornasse límpida, transparente. As concentrações de C_nTAB e $C_{10}E_4$ foram então calculadas baseando-se na concentração inicial de $C_{10}E_4$ e na massa de solução de C_nTAB adicionada. As concentrações resultantes correspondem às coordenadas de um ponto na curva binodal, caracterizando a transição da região bifásica para a região monofásica. A solução foi mantida sob agitação durante todo o procedimento, utilizando-se barra magnética e agitador magnético. Em sequência, uma massa conhecida de tampão foi adicionada ao sistema, que se tornou turvo novamente, indicando uma composição posicionada na região bifásica do diagrama. A solução de C_nTAB foi adicionada, gota a gota, até que a solução se tornasse límpida, e as concentrações de C_nTAB e $C_{10}E_4$ correspondentes às coordenadas de outro ponto na curva binodal foram calculadas. Este procedimento foi repetido até que um número suficiente de pontos para caracterizar a curva binodal fosse obtido. Conectando-se os dois pontos na curva binodal correspondentes às concentrações de tensoativo catiônico (determinadas através de titulação) em cada fase do sistema em questão, obtém-se uma linha de amarração. A

linha de amarração obtida deve passar pelo ponto correspondente à condição experimental de partição de G6PD para o respectivo sistema, à respectiva temperatura.

3.3. Teoria de Partição de Proteínas Hidrofílicas Baseada em Interações por Volume de Exclusão e Interações Eletrostáticas

O comportamento de uma proteína em um sistema de duas fases aquosas pode ser caracterizado pelo coeficiente de partição, K_p , definido a seguir:

$$K_p \equiv \frac{C_{p,t}}{C_{p,b}} \quad (3.1)$$

em que $C_{p,t}$ e $C_{p,b}$ são as concentrações de proteína nas fases superior (*top* – *t*) e inferior (*bottom* – *b*), respectivamente.

O comportamento de proteínas hidrofílicas em sistemas micelares de duas fases aquosas compostos de micelas cilíndricas foi recentemente modelado, e a seguinte equação baseada em interações do tipo volume de exclusão (*excluded-volume* – *EV*) mostrou-se adequada para a estimativa de coeficientes de partição (LUE, BLANKSCHTEIN, 1996; NIKAS *et al.*, 1992):

$$K_p^{EV} \approx \exp \left[-(\phi_t - \phi_b) \left(1 + \frac{R_p}{R_o} \right)^2 \right] \quad (3.2)$$

em que ϕ_t e ϕ_b são as frações volumétricas de tensoativo nas fases superior e inferior, R_p é o raio hidrodinâmico da proteína e R_o é o raio da sessão transversal de cada micela cilíndrica. De acordo com a equação (3.2), a partição de proteínas hidrofílicas em sistemas micelares de duas fases aquosas é governado primariamente por interações estéricas repulsivas do tipo volume de exclusão (*EV*), as quais direcionam a proteína preferencialmente para a fase inferior, pobre em micelas, na qual a mesma encontra um maior volume livre (LUE, BLANKSCHTEIN, 1996). O raio hidrodinâmico da G6PD, calculado com base nas dimensões de seu cristal isomorfo (ROWLAND *et al.* 1994), é de 68 Å. O raio da sessão transversal das micelas de C₁₀E₄ foi estimado em 21 Å, com base no modelo molecular

de micelização desenvolvido por PUVVADA, BLANKSCHTEIN (1990). O valor de $(\phi_t - \phi_b)$ pode ser obtido a partir da curva binodal, uma vez que ambas as fases apresentam densidade de aproximadamente 1 g/mL e, portanto, as frações de massa podem ser aproximadas como frações volumétricas.

Entretanto, a partição de proteínas em sistemas micelares *mistos* (não-iônico/iônico) de duas fases aquosas não pode ser quantificada utilizando-se apenas a equação (3.2), pois as interações eletrostáticas existentes entre as proteínas carregadas e as micelas carregadas não foram consideradas na derivação desta equação. Portanto, uma teoria detalhada de partição de proteínas que inclui tanto interações de volume de exclusão quanto interações eletrostáticas foi recentemente desenvolvida (KAMEI *et al.*, 2002a), com base na teoria molecular-termodinâmica de micelização de misturas de tensoativos (SHILOACH, BLANKSCHTEIN, 1998; ZOELLER, BLANKSCHTEIN, 1995; ZOELLER *et al.*, 1996). No contexto da nova teoria, o coeficiente de partição de uma proteína hidrofílica em um sistema micelar misto (não-iônico/iônico) de duas fases aquosas pode ser expresso pela seguinte equação (KAMEI *et al.*, 2002a):

$$K_p = K_p^{EV} K_p^{elec} \quad (3.3)$$

sendo que K_p^{EV} refere-se à contribuição do volume de exclusão no coeficiente de partição da proteína, expresso pela equação (3.2), e K_p^{elec} refere-se à contribuição eletrostática no coeficiente de partição da proteína, expresso pela equação a seguir (KAMEI *et al.*, 2002a):

$$K_p^{elec} = \exp \left[\frac{-\epsilon_w R_p}{2R_o^2 k_B T} \left[(\psi_{mic,t}^2 + \psi_p^2) I_t \phi_t - (\psi_{mic,b}^2 + \psi_p^2) I_b \phi_b \right] \right] \quad (3.4)$$

em que ϵ_w é a constante dielétrica da água, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, $\psi_{mic,x}$ é o potencial eletrostático na superfície de cada micela presente na fase x (superior (t) ou inferior (b)), ψ_p é o potencial eletrostático na superfície da proteína, e I_x é uma integral referente ao volume total da fase x , refletindo as interações eletrostáticas entre a micela carregada e a proteína, dada pela equação a seguir:

$$I_x = \int_{R_{min}}^c \left[\frac{2\psi_{mic,x}\psi_p}{\psi_{mic,x}^2 - \psi_p^2} \ln \left[\frac{1 + \exp(-\kappa(r - R_o - R_p))}{1 - \exp(-\kappa(r - R_o - R_p))} \right] + \ln[1 - \exp(-2\kappa(r - R_o - R_p))] \right] r dr \quad (3.5)$$

em que κ é o inverso do comprimento de Debye baseado nos íons dos sais do tampão (ver Apêndice 3), $(r - R_o - R_p)$ é a distância da superfície da micela até a superfície da proteína, e r é a distância radial do eixo de simetria da micela cilíndrica até o centro da proteína. O limite inferior da integral, R_{min} , corresponde à distância radial mínima entre o eixo de simetria da micela e o centro da proteína, e é dado pela soma do raio hidrodinâmico da proteína, R_p , o raio da sessão transversal da micela, R_o , e a distância referente à maior aproximação possível entre a micela e a proteína, d_{min} , dada pela equação:

$$R_{min} = R_o + R_p + d_{min} \quad (3.6)$$

Foi admitido para d_{min} uma distância de aproximadamente 2 moléculas de água (~ 6 Å) (FRANKS, 1983), assumindo-se que a micela e a proteína podem se posicionar bem próximas, porém ainda assim tendo algumas moléculas de água de hidratação entre elas.

As expressões para $\psi_{mic,x}$ ($x = t$ ou b) e ψ_p utilizadas (ambas no sistema cgs de unidades) são fornecidas a seguir (BOCKRIS, REDDY, 1970; HIEMENZ, RAJAGOPALAN, 1997):

$$\psi_{mic,x} = \frac{4\pi\sigma_x}{\kappa\epsilon_w} \quad (3.7)$$

e

$$\psi_p = \frac{4\pi\sigma_p R_p}{\epsilon_w(1 + \kappa R_p)} \quad (3.8)$$

em que σ_x é a densidade de carga na superfície de cada micela na fase x e σ_p é a densidade de carga na superfície da proteína (no caso a G6PD). O valor de σ_p foi obtido modelando-se a enzima como globular (esférica) e estimando-se sua carga efetiva como - 42,2 em pH 7,2 por meio da equação de Henderson-Hasselbalch (ver Apêndice 4). O valor de σ_x foi calculado de acordo com a seguinte equação (KAMEI, 2001):

$$\sigma_x = \frac{\alpha_{mic} z_{cationic} e \rho_{c,x}^2}{2\ell_{cationic,x} [(1 - \alpha_{mic}) V_{tail,C_{10}E_4} + \alpha_{mic} V_{tail,cationic}]} \quad (3.9)$$

em que α_{mic} corresponde à composição micelar de tensoativo catiônico em mols ($\alpha_{mic} = [C_nTAB]_{mic}/([C_nTAB]_{mic} + [C_{10}E_4]_{mic})$) na fase x (t ou b), $z_{cationic} = +1$ é a valência da molécula de tensoativo catiônico, e é a carga eletrônica, $\rho_{c,x}$ é o raio da seção transversal da micela mista na fase x , $\ell_{cationic,x}$ é o comprimento da molécula de tensoativo catiônico em cada micela na fase x , e $V_{tail,C_{10}E_4}$ e $V_{tail,cationic}$ correspondem aos volumes das caudas apolares dos tensoativos não-iônico e catiônico, respectivamente, sendo obtidos pela equação a seguir (PUVVADA, BLANKSCHTEIN, 1990):

$$V_{tail} = 27,4 + 26,9(n_c - 1) \quad (3.10)$$

em que n_c corresponde ao número de átomos de carbono na cauda do tensoativo.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Avaliação da Estabilidade da G6PD na Presença dos Tensoativos C_nTAB ($n = 8, 10$ ou 12)

A Figura 3.3 apresenta os resultados da análise de estabilidade da G6PD na presença de monômeros dos três tensoativos C_nTAB estudados. Como pode ser observado, a G6PD mostrou-se mais estável na presença de monômeros de C_8TAB , seguido de $C_{10}TAB$ e por fim $C_{12}TAB$, que apresentou desnaturação considerável da enzima. A tendência de estabilidade da G6PD observada na Figura 3.3 pode ser entendida com base no mecanismo de desnaturação protéica induzida por tensoativos iônicos. Em geral, sabe-se que a desnaturação de proteínas por tensoativos iônicos resulta de uma combinação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (CARDAMONE *et al.*, 1994). Em uma solução contendo uma proteína e um tensoativo iônico, os monômeros do tensoativo iônico se ligam primariamente por interações eletrostáticas aos resíduos de aminoácidos de carga oposta na superfície da proteína (*ligação sítio-específica*), induzindo

uma expansão da estrutura terciária da proteína. Essa expansão, por sua vez, permite uma maior interação das caudas apolares das moléculas de tensoativo com o interior apolar da proteína (*ligação cooperativa, não-específica*) levando ao desenovelamento da proteína e perda de estrutura secundária. Neste segundo estágio, dependendo da concentração de tensoativo, os monômeros interagem com as proteínas formando agregados estruturalmente semelhantes a micelas (GODDARD, ANANTHAPADMANABHAN, 1993).

FIGURA 3.3 – Recuperação da atividade da enzima G6PD em soluções contendo 2,5 mM de C₁₂TAB (-▲-), C₁₀TAB (-●-) e C₈TAB (-■-) a 25 °C. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Estudos referentes à ligação de pequenas moléculas, particularmente ácidos graxos e tensoativos, com albumina sugerem que as interações hidrofóbicas não específicas são mais fortes que as eletrostáticas, porém estas últimas não deixam de ser significativas uma vez que cadeias de

hidrocarbonetos não carregadas apresentam menor afinidade de ligação à proteína (JOST, GRIFFITH, 1982). Desta forma, em concordância com a tendência observada na Figura 3.3, tensoativos catiônicos C_n TAB de cadeias hidrocarbônicas mais curtas (menor valor de n) causam um menor grau de desnaturação de proteínas (G6PD), pois as interações hidrofóbicas não específicas entre as moléculas de tensoativo e a proteína são mais fracas. O conhecimento prévio da tendência de desnaturação dos tensoativos C_n TAB não nos permite assumir que o C_8 TAB, mais ameno à G6PD, seria mais adequado para utilização em sistema micelar $C_{10}E_4/C_n$ TAB/tampão de duas fases aquosas. A interação entre o tensoativo catiônico e o não-iônico em uma solução mista pode causar alterações nos valores de CMC dos tensoativos. No caso de sinergismo no processo de micelização, por exemplo, uma diminuição nos valores de CMC deve ocorrer. Além disso, a força da atração eletrostática entre as micelas mistas e a G6PD nos sistemas micelares mistos de duas fases aquosas contendo cada um dos C_n TAB deve ser avaliada.

3.4.2. Partição da G6PD nos Sistemas $C_{10}E_4/C_n$ TAB/Tampão

A partição da enzima G6PD foi estudada em sistemas $C_{10}E_4/C_n$ TAB/tampão com cada um dos três tensoativos catiônicos considerados ($n = 8, 10, \text{ e } 12$), nas mesmas condições iniciais, para determinação do sistema mais efetivo para a purificação da G6PD. Os experimentos de partição foram realizados a 26.7 °C de temperatura, 128 mM de concentração total de tensoativos e composição da solução de $\alpha_{sol} = 0,035$. A composição da solução representa a fração molar de tensoativo catiônico na solução, ou seja, $\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB]+[C_{10}E_4])$. As condições experimentais utilizadas foram baseadas em ensaios preliminares realizados com C_{12} TAB, nos quais valores de α_{sol} maiores que 0,035 causaram perda de atividade severa da G6PD (dados não apresentados). Para este primeiro grupo de experimentos, o efeito do tempo de partição na obtenção do equilíbrio pelo sistema foi estudado. Mais especificamente, a partição da G6PD foi realizada por períodos de 3 horas e 21 horas, para os

três sistemas examinados ($C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão, $n = 8, 10, \text{ e } 12$), sendo os resultados de coeficiente de partição e balanço de atividade da enzima apresentados nas Figura 3.4 e 3.5, respectivamente.

FIGURA 3.4 – Coeficientes de partição da G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente em sistemas micelares mistos ($C_{10}E_4/C_nTAB$) de duas fases aquosas utilizando-se $T = 26,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, concentração total de tensoativos de 128 mM e $\alpha_{sol} = 0,035$, para os tensoativos catiônicos C_8TAB , $C_{10}TAB$ e $C_{12}TAB$ ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB]+[C_{10}E_4])$). As barras cinzas e brancas correspondem aos tempos de partição de 3 e 21 horas, respectivamente. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 3.4, não houve diferenças significativas entre os valores de coeficiente de partição de G6PD, K_{G6PD} , obtidos após 3 horas ou 21 horas. Portanto, um tempo de partição de 3 horas foi considerado suficiente para obtenção do equilíbrio e adotado em todos os ensaios subsequentes.

Ainda na Figura 3.4, pode-se observar que o maior valor de coeficiente de partição, $K_{G6PD} = 4,4$, foi obtido com o sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão, seguido por $K_{G6PD} = 1,8$ para o sistema

$C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão, e o menor valor, $K_{G6PD} = 0,10$, para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão. Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão gerou atrações eletrostáticas mais fortes com a G6PD do que os demais sistemas estudados. Para melhor entender este comportamento, é necessário conhecer a composição das duas fases de cada sistema e, portanto, a tendência de K_{G6PD} observada na Figura 3.4 será discutida posteriormente (ver Item 3.4.3).

FIGURA 3.5 – Balanços de atividade de G6PD (BA_{G6PD}) obtidos experimentalmente em sistemas micelares mistos ($C_{10}E_4/C_nTAB$) de duas fases aquosas utilizando-se $T = 26,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, concentração total de tensoativos de 128 mM e $\alpha_{sol} = 0,035$, para os tensoativos catiônicos C_8TAB , $C_{10}TAB$ e $C_{12}TAB$ ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB] + [C_{10}E_4])$). As barras cinzas e brancas correspondem aos tempos de partição de 3 e 21 horas, respectivamente. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Por outro lado, os resultado de balanço de atividade apresentados na Figura 3.5 mostram que a G6PD é mais estável no sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão (103% para $t = 3\text{ h}$, 96% para $t = 21\text{ h}$), seguida do sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão (85% para $t = 3\text{ h}$, 81% para $t = 21\text{ h}$), e por

último o sistema C₁₀E₄/C₁₂TAB/tampão (75% para t = 3 h, 80% para t = 21 h), sendo o balanço de atividade (BA_{G6PD}) definido a seguir:

$$BA_{G6PD} = \frac{C_{G6PD,i} V_i + C_{G6PD,b} V_b}{C_{G6PD,i} V_i} \times 100\% \quad (3.11)$$

em que $C_{G6PD,i}$, $C_{G6PD,b}$ e $C_{G6PD,i}$ referem-se às concentrações de G6PD na fase superior, na fase inferior e na solução estoque de enzima inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. V_i , V_b e V_i são os volumes da fase superior, fase inferior e da solução estoque de G6PD inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente.

Portanto, o tensoativo não-iônico C₁₀E₄ não interferiu no padrão de ligação eletrostática, sítio-específica, do tensoativo catiônico C_nTAB com a proteína, não alterando a tendência de desnaturação induzida pelo C_nTAB.

Com base nos resultados de balanço de atividade apresentados na Figura 3.5, experimentos adicionais de partição da G6PD foram realizados nos sistemas C₁₀E₄/C_nTAB/tampão (n = 8 e 10), utilizando-se concentrações mais altas de C₈TAB e C₁₀TAB. O objetivo destes ensaios foi de aumentar os valores de K_{G6PD} para estes dois sistemas, porém mantendo um nível aceitável de atividade de G6PD. Os maiores valores de coeficiente de partição obtidos em cada sistema, correspondendo às maiores composições de solução testadas ($\alpha_{sol} = 0,20$ para C₈TAB e $\alpha_{sol} = 0,06$ para C₁₀TAB), estão representados nas Figuras 3.6 e 3.7. Nesses experimentos a temperatura teve que ser aumentada para que se pudesse observar separação de fases. Mais especificamente, foi utilizada temperatura T = 30,0 °C para o sistema C₁₀E₄/C₁₀TAB/tampão e T = 30,5 °C para o sistema C₁₀E₄/C₈TAB/tampão.

FIGURA 3.6 – Coeficientes de partição da G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com temperatura $T = 30,5\text{ }^{\circ}C$ e $\alpha_{sol} = 0,20$, e no sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com temperatura $T = 30,0\text{ }^{\circ}C$ e $\alpha_{sol} = 0,06$ ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB]+[C_{10}E_4])$). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 3.7 – Balanços de atividade de G6PD (BA_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com temperatura $T = 30,5\text{ }^{\circ}C$ e $\alpha_{sol} = 0,20$, e no sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com temperatura $T = 30,0\text{ }^{\circ}C$ e $\alpha_{sol} = 0,06$ ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB]+[C_{10}E_4])$). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Comparando-se os resultados de K_{G6PD} para os sistemas $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão e $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão apresentados nas Figuras 3.4 e 3.6, pode-se afirmar que a utilização de concentrações de tensoativo catiônico mais altas resultou em valores de K_{G6PD} maiores. Observa-se ainda, de acordo com a Figura 3.7, que os coeficientes de partição aumentaram, porém mantendo-se um balanço de atividade de G6PD semelhante àquele obtido para o sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão (ver Figura 3.5).

Quando comparado aos outros dois sistemas, o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão não proporcionou uma atração eletrostática entre as micelas mistas positivamente carregadas e a enzima G6PD negativamente carregada suficientemente forte para aumentar significativamente a partição das enzimas para a fase superior, rica em micelas. Mesmo com a utilização de $\alpha_{sol} = 0,20$, o que significa que 20% da totalidade de tensoativos utilizada correspondeu ao tensoativo catiônico C_8TAB , um coeficiente de partição de apenas 1,3 foi obtido. Por outro lado, um valor de $\alpha_{sol} = 0,06$ no sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão resultou no coeficiente de partição de G6PD mais alto observado ($K_{G6PD} = 7,7$, ver Figura 3.5).

Apesar dos balanços de atividade obtidos serem inferiores a 100%, deve-se ter em mente que é sempre possível aumentar este valor, em qualquer um dos três sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão estudados, através da adição de quantidades menores de tensoativo catiônico, porém às custas de obtenção de menores valores de K_{G6PD} . Para um melhor entendimento da vantagem da adição de quantidades maiores de tensoativo catiônico, a Tabela 3.1 apresenta os valores de rendimento de G6PD na fase superior ($Y_{G6PD,t}$) para cada condição estudada, sendo $Y_{G6PD,t}$ definido a seguir:

$$Y_{G6PD,t} = \frac{C_{G6PD,t} V_t}{C_{G6PD,i} V_i} \times 100\% \quad (3.12)$$

TABELA 3.1 – Rendimento de G6PD na fase superior rica em micelas, $Y_{G6PD,t}$, para os sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão ($n = 8, 10, \text{ e } 12$) nas condições estudadas.

Sistema	T (°C)	α_{sol}^*	$Y_{G6PD,t}$ (%)
$C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão	26,7	0,035	2,5
$C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão	26,7	0,035	48
$C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão	26,7	0,035	60
$C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão	30,5	0,200	49
$C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão	30,0	0,060	71

* α_{sol} é a fração molar de tensoativo catiônico C_nTAB na solução antes da separação de fases ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB] + [C_{10}E_4])$).

Como pode ser visto na Tabela 3.1, o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,06$ forneceu o melhor balanço entre o efeito de desnaturação da G6PD e as atrações eletrostáticas entre as micelas mistas $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ positivamente carregadas e a enzima de carga efetiva negativa, resultando em um valor de $Y_{G6PD,t}$ de 71%. Observa-se ainda que a maior estabilidade da G6PD no sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$ não compensa o menor valor de K_{G6PD} de 1,8, resultando em um rendimento de G6PD na fase superior relativamente baixo, $Y_{G6PD,t} = 48\%$.

3.4.3. Curvas Binodais para os Sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /Tampão

Para melhor entender a partição da G6PD, é necessário conhecer a composição das fases superior e inferior do sistema $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão nas condições estudadas. Portanto, as curvas binodais dos três sistemas estudados foram determinadas, nas mesmas temperaturas utilizadas nos ensaios de partição da G6PD. As linhas de amarração correspondentes aos ensaios de partição da G6PD foram obtidas baseando-se nas concentrações de C_nTAB determinadas por titulação. As Figuras 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 e 3.12 apresentam as curvas binodais e as respectivas linhas de amarração obtidas para os sistemas estudados, junto com os pontos equivalentes às concentrações de tensoativo catiônico nas fases superior e inferior e a

composição inicial do sistema no qual a partição da G6PD foi estudada, na respectiva temperatura.

FIGURA 3.8 – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão a $26,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\blacklozenge$) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As intersecções da curva binodal com a linha de amarração ($\bullet$) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de C_8TAB nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração ($\bullet$) corresponde à condição de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de C_8TAB obtidos.

FIGURA 3.9 – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão a 30,5 °C (♦) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As intersecções da curva binodal com a linha de amarração (•) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de C_8TAB nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração (•) corresponde à condição de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de C_8TAB obtidos.

FIGURA 3.10 – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão a $26,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\blacklozenge$) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As intersecções da curva binodal com a linha de amarração ($\bullet$) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de $C_{10}TAB$ nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração ($\bullet$) corresponde à condição de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de $C_{10}TAB$ obtidos.

FIGURA 3.11 – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão a $30,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (♦) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As interseções da curva binodal com a linha de amarração (•) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de $C_{10}TAB$ nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração (•) corresponde à condição de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de $C_{10}TAB$ obtidos.

FIGURA 3.12 – Curva binodal obtida para o sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão a $26,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (♦) e sua respectiva linha de amarração, representada pela linha tracejada. As intersecções da curva binodal com a linha de amarração (•) foram obtidas por meio da determinação das concentrações de $C_{12}TAB$ nas fases superior e inferior. O ponto intermediário da linha de amarração (●) corresponde à condição de partição da G6PD para este sistema. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores de concentração de $C_{12}TAB$ obtidos.

Como pode ser observado nas figuras acima, existe uma boa correlação entre as composições das fases superior e inferior e a composição inicial da solução para cada experimento de partição, uma vez que, em todos os casos, a linha de amarração obtida passa pelo ponto correspondente à composição experimental inicial de separação de fases, considerando-se o erro associado à determinação de tensoativo catiônico.

Na Tabela 3.2 estão apresentados os valores de K_{G6PD} determinados experimentalmente e as diferenças de concentração de tensoativos entre as fases superior e inferior para os sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão estudados, obtidas a partir das curvas binodais.

TABELA 3.2 – Coeficientes de partição (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente e diferenças de concentração total de tensoativos, $\Delta[C_{10}E_4 + C_nTAB]_{t,b}$, e de concentração de tensoativo catiônico, $\Delta[C_nTAB]_{t,b}$, entre as fases superior e inferior para os sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão estudados.

SISTEMA	T (°C)	α_{sol}^*	K_{G6PD}	$\Delta[C_{10}E_4 + C_nTAB]_{t,b}$ (wt%)	$\Delta[C_nTAB]_{t,b}$ (wt%)
$C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão	26,7	0,035	0,1	17,43	0,13
$C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão	30,5	0,200	1,3	3,16	0,09
$C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão	26,7	0,035	1,8	7,86	0,20
$C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão	30,0	0,060	7,7	7,22	0,25
$C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão	26,7	0,035	4,4	7,40	0,25

* α_{sol} é a fração molar de tensoativo catiônico C_nTAB na solução antes da separação de fases ($\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB] + [C_{10}E_4])$).

Como pode ser observado na Tabela 3.2, o coeficiente de partição de G6PD aumenta de 1,3 para 7,7 com o aumento da diferença de concentração de tensoativo catiônico entre as fases superior e inferior, $\Delta[C_nTAB]_{t,b}$, de 0,09 para 0,25. Este resultado mostra a importância destacada das atrações eletrostáticas na partição da enzima G6PD. Pode-se observar ainda que, para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, apesar de $\Delta[C_nTAB]_{t,b} = 0,13$ ser maior que o valor obtido para o mesmo sistema com $\alpha_{sol} = 0,20$ ($\Delta[C_nTAB]_{t,b} = 0,09$), um coeficiente de partição de apenas 0,10 ocorreu. Este valor extremamente baixo de K_{G6PD} obtido neste caso é resultado do efeito de volume de exclusão pronunciado, que pode ser claramente observado na diferença de concentração total de tensoativos entre as fases superior e inferior ($\Delta[C_{10}E_4 + C_nTAB]_{t,b} = 17,43\%$). Portanto, para se obter um valor ótimo de coeficiente de partição é necessário considerar não apenas o efeito eletrostático, mas também o efeito de volume de exclusão.

3.4.4. Partição da G6PD no Sistema C₁₀E₄/Tampão

A partição da G6PD em sistema simples C₁₀E₄/tampão foi estudada com o intuito de desacoplar os efeitos de atração eletrostática e de volume de exclusão, e conseqüentemente provar a força das atrações eletrostáticas entre a proteína negativamente carregada e as micelas mistas de C₁₀E₄/C_nTAB positivamente carregadas. Para isso, estudos de partição da G6PD em sistemas C₁₀E₄/tampão foram realizados de tal forma que as condições utilizadas propiciaram o mesmo efeito de volume de exclusão observado nos sistemas micelares mistos.

Com o auxílio do programa de computação *MIX 2* desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. Daniel Blankschtein do Massachusetts Institute of Technology - M.I.T. (ZOELLER, BLANKSCHTEIN, 1995; ZOELLER *et al.*, 1996), estimou-se que o raio da seção transversal da micela mista cilíndrica (R_o), para todos os experimentos, foi igual ao de micelas cilíndricas de C₁₀E₄ puro. O programa *MIX 2* baseia-se na teoria molecular-termodinâmica de micelização de misturas de tensoativos desenvolvida por SHILOACH, BLANKSCHTEIN (1998). Através deste programa e conhecendo-se a composição da solução micelar mista, as estruturas químicas de cada tensoativo em solução, a temperatura e a força iônica, é possível estimar certas propriedades de soluções micelares como a CMC, o número de agregação médio das micelas, a composição micelar ($\alpha_{mic} = [C_nTAB]_{mic}/([C_nTAB]_{mic}+[C_{10}E_4]_{mic})$), a composição monomérica ($\alpha_{mon} = [C_nTAB]_{mon}/([C_nTAB]_{mon}+[C_{10}E_4]_{mon})$), a forma característica das micelas e o raio da seção transversal. O raio hidrodinâmico da G6PD (R_p), por sua vez, é um valor fixo. Portanto, as interações do tipo volume de exclusão podem ser mantidas constantes se o valor de $(\phi_t - \phi_b)$ for fixo (ver equação 3.2). Em outras palavras, o volume de exclusão pode ser mantido constante pela partição da G6PD em sistema C₁₀E₄/tampão a uma temperatura que corresponda a uma linha de amarração de mesmo valor de $(\phi_t - \phi_b)$ observado par o sistema C₁₀E₄/C_nTAB/tampão em consideração. Para isto, foi utilizada a curva binodal referente ao sistema C₁₀E₄/tampão apresentada no Capítulo II (Item 2.4.1, Figura 2.2), dado que o C₁₀E₄ em ambos os

experimentos pertencia ao mesmo lote. Os resultados de coeficiente de partição em sistema $C_{10}E_4$ /tampão obtidos, bem como os correspondentes valores para os sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão, estão apresentados na Figura 3.13.

FIGURA 3.13 – Coeficientes de partição de G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente nos sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão (barras cinzas) e os valores correspondentes obtidos no sistema $C_{10}E_4$ /tampão (barras brancas), mantendo-se o volume de exclusão constante. $C_{12}TAB$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, $C_{10}TAB-1$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, $C_{10}TAB-2$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,06$, C_8TAB-1 corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, e C_8TAB-2 corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,20$. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como pode ser observado na Figura 3.13, os valores de K_{G6PD} obtidos nos sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão são significativamente maiores que os correspondentes obtidos no sistema $C_{10}E_4$ /tampão com o mesmo volume de

exclusão. Desta forma, torna-se evidente que a enzima G6PD, de carga efetiva negativa, é atraída eletrostaticamente para a fase superior, que contém um número maior de micelas mistas de $C_{10}E_4/C_nTAB$ positivamente carregadas. É importante ressaltar que mesmo no caso C_8TAB -1, correspondente ao sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, o valor de K_{G6PD} obtido é 2,5 vezes maior na presença de tensoativo catiônico do que no sistema simples $C_{10}E_4/C_nTAB$, observando-se um incremento de 0,04 para 0,1. Pode-se observar ainda que um valor de K_{G6PD} de 7,7 (22 vezes maior que no sistema $C_{10}E_4/C_nTAB$) é obtido no caso $C_{10}TAB$ -2, correspondente ao sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,06$. Portanto, os resultados experimentais de K_{G6PD} apresentados na Figura 3.13 demonstram claramente que as atrações eletrostáticas contribuem de forma bastante significativa para a partição preferencial da G6PD para a fase superior, rica em micelas mistas.

3.4.5. Utilização da Teoria de Partição Baseada em Interações por Volume de Exclusão e Interações Eletrostáticas para Estimar Coeficientes de Partição de G6PD

Para o cálculo dos K_{G6PD} teóricos foram utilizados diversos parâmetros incluindo a composição micelar (α_{mic}) e os valores das frações volumétricas de tensoativos nas fases superior e inferior (ϕ_t e ϕ_b). Os valores de ϕ_t e ϕ_b foram obtidos pela somatória das concentrações dos dois tensoativos, $[C_{10}E_4]$ (% p/p) e $[C_nTAB]$ (% p/p), em cada fase utilizando-se as curvas binodais apresentadas nas Figuras 3.8 a 3.12. Os valores de α_{mic} para cada fase dos sistemas estudados foram estimados com o auxílio do programa de computação *MIX 2* (ZOELLER, BLANKSCHTEIN, 1995; ZOELLER *et al.*, 1996). As Tabelas 3.3 a 3.7 apresentam algumas características das fases superior e inferior dos sistemas micelares mistos, obtidas com auxílio do programa *MIX 2*.

TABELA 3.3 – Caracterização das fases formadas no sistema C₁₀E₄/C₁₂TAB/tampão a 26,7 °C. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; [monômeros] e [C₁₂TAB]_{mon} são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de C₁₂TAB.

FASE SUPERIOR	FASE INFERIOR
$X_T = 235,6 \text{ mM}$	$X_T = 13,8 \text{ mM}$
$\alpha_{sol} = 0,035$	$\alpha_{sol} = 0,022$
$\alpha_{mic} = 0,035$	$\alpha_{mic} = 0,023$
$\alpha_{mon} = 0,004$	$\alpha_{mon} = 0,002$
[monômeros] = 0,567 mM	[monômeros] = 0,576 mM
[C ₁₂ TAB] _{mon} = 0,002 mM	[C ₁₂ TAB] _{mon} = 0,001 mM

* Valores obtidos com o auxílio do programa MIX 2.

TABELA 3.4 – Caracterização das fases formadas no sistema C₁₀E₄/C₁₀TAB/tampão a 26,7 °C. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; [monômeros] e [C₁₀TAB]_{mon} são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de C₁₀TAB.

FASE SUPERIOR	FASE INFERIOR
$X_T = 249,5 \text{ mM}$	$X_T = 13,99 \text{ mM}$
$\alpha_{sol} = 0,030$	$\alpha_{sol} = 0,100$
$\alpha_{mic} = 0,030$	$\alpha_{mic} = 0,088$
$\alpha_{mon} = 0,054$	$\alpha_{mon} = 0,311$
[monômeros] = 0,606 mM	[monômeros] = 0,741 mM
[C ₁₀ TAB] _{mon} = 0,033 mM	[C ₁₀ TAB] _{mon} = 0,230 mM

* Valores obtidos com o auxílio do programa MIX 2.

TABELA 3.5 – Caracterização das fases formadas no sistema C₁₀E₄/C₁₀TAB/tampão a 30,0 °C. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; [monômeros] e [C₁₀TAB]_{mon} são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de C₁₀TAB.

FASE SUPERIOR	FASE INFERIOR
$X_T = 230,6 \text{ mM}$	$X_T = 12,9 \text{ mM}$
$\alpha_{sol} = 0,050$	$\alpha_{sol} = 0,185$
$\alpha_{mic} = 0,050$	$\alpha_{mic} = 0,141$
$\alpha_{mon} = 0,123$	$\alpha_{mon} = 0,625$
[monômeros] = 0,623 mM	[monômeros] = 1,161 mM
[C ₁₀ TAB] _{mon} = 0,076 mM	[C ₁₀ TAB] _{mon} = 0,72 mM

* Valores obtidos com o auxílio do programa MIX 2.

TABELA 3.6 – Caracterização das fases formadas no sistema C₁₀E₄/C₈TAB/tampão a 26,7 °C. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; [monômeros] e [C₈TAB]_{mon} são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de C₈TAB.

FASE SUPERIOR	FASE INFERIOR
$X_T = 526,7 \text{ mM}$	$X_T = 3,77 \text{ mM}$
$\alpha_{sol} = 0,017$	$\alpha_{sol} = 1,00$
$\alpha_{mic} = 0,017$	-
$\alpha_{mon} = 0,261$	$\alpha_{mon} = 1,0$
[monômeros] = 0,754 mM	[monômeros] = 3,77 mM
[C ₈ TAB] _{mon} = 0,20 mM	[C ₈ TAB] _{mon} = 3,77 mM

* Valores obtidos com o auxílio do programa MIX 2.

TABELA 3.7 – Caracterização das fases formadas no sistema C₁₀E₄/C₈TAB/tampão a 30,5 °C. X_T corresponde à concentração total de tensoativos na respectiva fase; α_{sol} , α_{mic} e α_{mon} correspondem às composições total, micelar e monomérica; [monômeros] e [C₈TAB]_{mon} são as concentrações de monômeros totais e de monômeros de C₈TAB.

FASE SUPERIOR	FASE INFERIOR
$X_T = 160,0 \text{ mM}$	$X_T = 64,7 \text{ mM}$
$\alpha_{sol} = 0,171$	$\alpha_{sol} = 0,370$
$\alpha_{mic} = 0,129$	$\alpha_{mic} = 0,183$
$\alpha_{mon} = 0,948$	$\alpha_{mon} = 0,975$
[monômeros] = 8,266 mM	[monômeros] = 15,270 mM
[C ₈ TAB] _{mon} = 7,84 mM	[C ₈ TAB] _{mon} = 14,89 mM

* Valores obtidos com o auxílio do programa MIX 2.

A teoria de partição não foi utilizada para o sistema C₁₀E₄/C₈TAB/tampão pois, como pode ser observado nas tabelas 3.3 a 3.7, os monômeros de C₈TAB estão presentes em concentrações significantes enquanto que para os outros dois sistemas a concentração de C_nTAB (n = 10 e 12) na forma monomérica pode ser negligenciada em relação à concentração de C_nTAB (n = 10 e 12) nas micelas mistas de C₁₀E₄/C_nTAB. Além disso, a diferença de concentração de monômeros de C₈TAB nas fases superior e inferior do sistema C₁₀E₄/C₈TAB/tampão é significativa, e a teoria utilizada não leva em consideração o efeito eletrostático associado aos monômeros de tensoativo catiônico. Esta teoria foi desenvolvida primariamente para sistemas micelares mistos nos quais as concentrações de monômeros de tensoativo iônico nas fases superior e inferior são comparáveis ou são negligenciáveis em relação à concentração de tensoativo iônico compondo as micelas (KAMEI *et al.*, 2002a). Para aplicar a teoria no sistema C₁₀E₄/C₈TAB/tampão, seria necessária a incorporação de um novo termo ao modelo de energia livre de Gibbs excedente, utilizado para caracterizar cada fase, associado às atrações eletrostáticas existentes entre a proteína e os monômeros de C₈TAB.

A Figura 3.14 apresenta a comparação entre os coeficientes de partição experimentais determinados nos sistemas $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão e $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão e os coeficientes de partição estimados pela teoria apresentada no Item 3.3.

FIGURA 3.14 – Comparação entre os valores de K_{G6PD} obtidos experimentalmente (barras cinzas) e os estimados pela teoria (barras brancas). $C_{12}TAB$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, $C_{10}TAB-1$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,035$, $C_{10}TAB-2$ corresponde ao sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão com $\alpha_{sol} = 0,06$. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos experimentalmente.

Como pode ser observado na Figura 3.14, existe uma correlação quantitativa considerável entre os coeficientes de partição estimados pela teoria e os obtidos experimentalmente. Portanto, a teoria de partição de proteína aplicada neste trabalho pode ser considerada como uma ferramenta útil no estabelecimento de diretrizes para a otimização de purificação de proteínas em sistemas micelares mistos (não-iônico/iônico) de duas fases aquosas.

3.5. Conclusões

Foi estudada a partição da enzima G6PD em sistemas micelares mistos (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas. Tensoativos catiônicos do tipo $C_n\text{TAB}$ ($n = 8, 10, \text{ e } 12$) foram adicionados ao tensoativo não-iônico $C_{10}\text{E}_4$. Micelas mistas de $C_{10}\text{E}_4/C_n\text{TAB}$ positivamente carregadas foram formadas, apresentando carga suficiente para atrair eletrostaticamente a G6PD para a fase superior, rica em micelas, e ao mesmo tempo não exibir desnaturação severa da enzima. Os coeficientes de partição de G6PD obtidos nos sistemas $C_{10}\text{E}_4/C_n\text{TAB}$ /tampão foram no mínimo 2,5 vezes maiores que aqueles obtidos no sistema $C_{10}\text{E}_4$ /tampão correspondente, demonstrando que a enzima negativamente carregada é, de fato, eletrostaticamente atraída para a fase superior que contém um número maior de micelas mistas de $C_{10}\text{E}_4/C_n\text{TAB}$ positivamente carregadas.

Para uma concentração fixa de tensoativo catiônico, o sistema $C_{10}\text{E}_4/C_{12}\text{TAB}$ /tampão proporcionou atrações eletrostáticas mais fortes, resultando no maior valor de K_{G6PD} . Entretanto, no caso dos sistemas $C_{10}\text{E}_4/C_8\text{TAB}$ /tampão e $C_{10}\text{E}_4/C_{10}\text{TAB}$ /tampão foi possível aumentar a quantidade de tensoativo catiônico sem acarretar em desnaturação severa da G6PD. Como resultado, os valores de K_{G6PD} também aumentaram. Particularmente, o sistema $C_{10}\text{E}_4/C_{10}\text{TAB}$ /tampão forneceu o melhor coeficiente de partição ($K_{G6PD} = 7,7$), acarretando em um aumento de 22 vezes na partição da G6PD para a fase superior quando comparado ao sistema $C_{10}\text{E}_4$ /tampão com o mesmo volume de exclusão, e em um rendimento de G6PD na fase superior de 71%.

Os resultados apresentados neste trabalho utilizando-se sistemas micelares mistos de duas fases aquosas compararam-se favoravelmente aos resultados encontrados na literatura para sistemas poliméricos de duas fases aquosas. Por exemplo, ALRED *et al.* (1994) apresentam um valor de K_{G6PD} de aproximadamente 0,75 em sistema $\text{EO}_{20}\text{PO}_{80}$ /Dextran-T500.

A teoria molecular-termodinâmica combinando os fenômenos de formação de micela mista e interações proteína-tensoativo, recentemente desenvolvida por KAMEI *et al.* (2002a), foi utilizada para estimar o

coeficiente de partição de G6PD em sistemas micelares mistos (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas. Os valores de K_{G6PD} estimados pela teoria apresentaram uma correlação quantitativa considerável com os valores obtidos experimentalmente, demonstrando a aplicabilidade da teoria no direcionamento de estratégias de purificação de proteínas.

Concluindo, os sistemas micelares mistos (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas podem ser considerados como uma alternativa promissora para a purificação da enzima G6PD. Dentre os três sistemas estudados, o sistema C₁₀E₄/C₁₀TAB/tampão mostrou-se mais adequado para a purificação de G6PD, fornecendo um balanço ótimo entre os efeitos de desnaturação e atração eletrostática. Estudos referentes à partição de G6PD em sistemas micelares mistos (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas na presença de outras proteínas, bem como de homogeneizados celulares, devem ser realizados futuramente para verificação do efeito da presença de outros componentes no perfil de partição da G6PD.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DA PARTIÇÃO DAS ENZIMAS GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE E UROQUINASE EM SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS CONTENDO LIGANTE DE AFINIDADE

Carlota O. Rangel-Yagui¹, Daniel Blankschtein² e
Adalberto Pessoa-Jr¹

¹ Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica /FCF, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

²Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA.

Palavras Chaves: glicose-6-fosfato desidrogenase, *uroquinase*, sistema micelar de duas fases aquosas, ligantes de afinidade, purificação de proteínas.

Endereço do autor para correspondência:
Adalberto Pessoa Junior
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 16
CEP: 05508-950 – São Paulo, SP.
Tel: (11) 3091-3710
Fax: (11) 3094-3694
e-mail: pessoajr@usp.br

Este capítulo apresenta um estudo da partição de enzimas em sistema micelar de duas fases aquosas formado pelo tensoativo não-iônico óxido de *n*-deciltetraetileno contendo ligantes de afinidade livres em solução. Foi estudada a influência da adição do ligante *p*-aminobenzamidina na partição da enzima *uroquinase* (UK), e a influência da adição dos ligantes *cibacron blue* e *procion red* (corantes derivados da triazina) na partição da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Os resultados obtidos são discutidos, inclusive teoricamente.

4.1. Introdução

A extração líquido-líquido tem sido considerada uma técnica promissora no campo de purificação de proteínas (ALBERTSSON PÅ, 1986). Dentre os diversos sistemas de extração líquido-líquido, o sistema micelar de duas fases aquosas oferece certas propriedades únicas e desejáveis como a natureza auto-associativa das micelas, que permite o controle e otimização da partição através do ajuste das características micelares (LIU *et al.*, 1996).

Uma solução aquosa micelar do tensoativo óxido de *n*-decil tetraetileno ($C_{10}E_4$), é capaz de separar-se macroscopicamente em duas fases, com o aumento da temperatura, resultando em uma fase rica em micelas e uma fase pobre em micelas. Como a concentração de $C_{10}E_4$ em ambas as fases excede a concentração micelar crítica (CMC), micelas estão presentes tanto na fase superior quanto na fase inferior (LIU *et al.*, 1996). Mais especificamente, ambas as fases contêm micelas cilíndricas, as quais podem ser modeladas como micelas formadas por um corpo cilíndrico terminando em duas micelas hemisféricas nas extremidades (PUVVADA, BLANKSCHTEIN, 1990; ZOELLER *et al.*, 1997). Entretanto, as micelas de $C_{10}E_4$ presentes na fase superior são maiores (mais alongadas) e mais abundantes do que as micelas de $C_{10}E_4$ presentes na fase inferior. Esta diferença no ambiente físico-químico das duas fases consiste na base da utilização deste sistema em processos de extração (LIU *et al.*, 1996).

A seletividade na partição de proteínas em sistema micelar de duas fases aquosas pode ser otimizada pela presença de ligantes de afinidade no sistema (GUZMAN *et al.*, 1989; QUINA, HINZE, 1999). Se o ligante de afinidade por si próprio apresentar uma partição direcionada para uma das fases do sistema, não é necessário a modificação química para ligar covalentemente o ligante de afinidade à molécula de tensoativo (KRONER *et al.*, 1982). Em outras palavras, um ligante de afinidade que apresente uma distribuição desigual entre as duas fases de um sistema micelar de duas fases aquosas, em tese, irá influenciar a partição da proteína alvo para a mesma fase para a qual ele migra, como esquematizado na Figura 4.1.

FIGURA 4.1 – Representação esquemática do comportamento esperado para uma proteína em sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade em solução. O ligante deve influenciar a partição da proteína alvo para a mesma fase para a qual ele migra preferencialmente.

No presente trabalho, a partição das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e *uroquinase* em sistema micelar de duas fases aquosas composto pelo tensoativo não-iônico C₁₀E₄ em presença de ligantes de afinidade livres em solução foi estudada, teórica e experimentalmente.

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (EC 1.1.1.49) é uma enzima encontrada em quase todos os tecidos animais e microrganismos. Na maioria das espécies, a G6PD apresenta uma subunidade com massa molar de 50 – 60 kDa, (aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos). Esta enzima normalmente aparece na forma de dímeros ou tetrâmeros (ROWLAND *et al.*, 1994), sendo que a G6PD proveniente de *Leuconostoc mesenteroides*, fonte utilizada no presente estudo, é um dímero (COHEN, ROSEMEYER, 1969). Por ser a primeira enzima da via das pentoses, a G6PD catalisa a oxidação de glicose-6-fosfato utilizando NADP⁺ ou NAD⁺ gerando pentoses para a síntese de nucleotídeos, assim como NADPH/NADH para utilização em biossínteses redutivas e proteção contra stress oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998; ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994). A G6PD também apresenta um grande interesse como reagente analítico, sendo utilizada em vários ensaios quantitativos incluindo a determinação de atividade de creatina-quinase para diagnóstico de doenças

cardíacas e de músculo esquelético, medidas de concentração de hexoses, e marcador de enzima imunoensaios (LOJUDICE *et al.*, 2001).

A enzima *uroquinase* (UK) (EC 3.4.21.73), por sua vez, é uma glicoproteína com massa molar de 54 kDa (411 resíduos de aminoácidos), responsável pela conversão do plasminogênio em sua forma ativa, plasmina, através da hidrólise da ligação peptídica Arg561–Val562 Edward (FAHEY, CHAUDHURI, 2001). A UK é sintetizada no rim humano, tendo sido encontrada pela primeira vez na urina. Subseqüentemente, foi descoberta a ocorrência de UK em diversos tecidos de mamíferos, sendo que mais recentemente esta enzima tem sido obtida de culturas celulares de tecidos (MALE *et al.*, 1990). Devido à sua ação ativadora de plasminogênio, a UK encontra aplicação em tratamento de infarte do miocárdio agudo, oclusão arterial periférica e infarte cerebral agudo (TAKAHASHI *et al.*, 2000).

A purificação industrial das enzimas G6PD e UK têm sido feita através de processos de múltiplas etapas, os quais envolvem técnicas de custo elevado como processos cromatográficos (CHAMPLUVIER, KULA, 1992; CHANG, CHASE, 1996; CHANG *et al.*, 1995; MCCREATH *et al.*, 1995; CAO *et al.*, 1996, TAKAHASHI *et al.*, 2000). Portanto, o estudo da utilização de sistema micelar de duas fases aquosas para a purificação de enzimas de interesse como a G6PD e a UK apresenta-se como uma nova alternativa frente aos processos convencionais.

Nos estudos de partição da G6PD foram utilizados como ligantes de afinidade os corantes derivados da triazina *cibacron blue* 3GA (azul) e *procion red* HE-3B (vermelho), ambos inibidores dessa enzima. Os corantes *cibacron blue* 3GA e *procion red* HE-3B (Figura 4.2) apresentam estruturas químicas que os permitem mimetizar as coenzimas NAD(P)⁺ e a molécula de ATP, devido à presença de partes hidrofóbicas, grupos carregados e alta flexibilidade (KOPPERSCHLÄGER, 1994). Portanto, os corantes derivados da triazina são amplamente utilizados como ligantes de afinidade para purificação de desidrogenases (CHAMPLUVIER, KULA, 1992; CHANG *et al.*, 1995; KRONER *et al.*, 1982; WANG *et al.*, 1992). De acordo com KRONER *et al.* (1982), estas substâncias são apresentadas como inibidores competitivos

da G6PD, com valores de constantes de inibição (K_i) de G6PD de 18 μM (0,014 mg/g) e 20-50 μM (0,029-0,074 mg/g) para *cibacron blue* e *procion red*, respectivamente.

PROCION RED HE-3B

CIBACRON BLUE 3GA

FIGURA 4.2 – Estrutura química dos corantes derivados da triazina *procion red* HE-3B e *cibacron blue* 3GA, ambos inibidores da G6PD.

FIGURA 4.3 – Estrutura química da coenzima NADP^+ , a qual se liga a um sítio específico na G6PD.

Nos estudos de partição da UK foi utilizado como ligante de afinidade o composto químico *p*-aminobenzamidina (Figura 4.4), o qual é um inibidor competitivo dessa enzima. Este composto mimetiza a cadeia lateral do aminoácido arginina, pois apresenta tanto um grupo catiônico amidina quanto um anel aromático hidrofóbico de tamanho comparável ao grupo grupamento da arginina reconhecido pela enzima (HAUPTMANN, STÜRZEBECKER, 1999). Conseqüentemente, a *p*-aminobenzamidina tem sido utilizada como um ligante de afinidade em processos cromatográficos de purificação de UK (MALE *et al.*, 1990; TAKAHASHI *et al.*, 2000). A constante de inibição (K_i) de UK por *p*-aminobenzamidina apresenta um valor aproximado de 76 μM (MALE *et al.*, 1990).

FIGURA 4.4 – Estrutura química da *p*-aminobenzamidina (p-AB) – inibidor competitivo da UK.

FIGURA 4.5 – Estrutura química do aminoácido arginina – substrato da uroquinase.

Embora existam vários trabalhos a respeito da utilização dos compostos citados (corantes derivados da triazina e *p*-aminobenzamidina) como ligantes de afinidade em técnicas cromatográficas (CHAMPLUVIER, KULA, 1992; CHANG *et al.*, 1995; TAKAHASHI *et al.*, 2000) e até mesmo na purificação de G6PD por sistemas poliméricos de duas fases aquosas (KRONER *et al.*, 1982; WANG *et al.*, 1992), a utilização de ligantes de afinidade livres em solução na purificação de enzimas por *sistemas micelares de duas fases aquosas* ainda é muito pouco explorada.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Materiais

O tensoativo não-iônico C₁₀E₄ (lote no. 6011) foi adquirido da Nikko Chemicals (Tóquio, Japão). A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* (lote no. 50K8612), a enzima *uroquinase* de células renais humanas (lote no. 32K1118), glicose-6-fosfato (lote no. 40K7014), fosfato de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NADP⁺, lote no. 80K7046), p-aminobenzamidina (lote no. 128H3627) e os corantes *Cibacron blue* 3GA (lote no. 26H1369) e *Procion red* HE-3B (lote no. 70H0782) foram todos obtidos da Sigma (St. Louis, MO). O substrato para *uroquinase* (UK-substrate: H-glu-gly-arg-pNA acetato, lote no. 0545330) foi obtido da Bachem (King of Prussia, PA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em tampão de McIlvaine pH 7,2, consistindo de 16,4 mM de fosfato de sódio dibásico e 1,82 mM de ácido cítrico. Foi utilizada água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Toda a vidraria utilizada nos experimentos foi lavada em um banho de hidróxido de sódio 1 M em solução alcoólica a 50%, seguido de um banho de ácido nítrico 1 M, enxaguada abundantemente com água Milli-Q, e finalmente seca em estufa a 90°C.

4.2.2. Determinação da Concentração de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A determinação da concentração de G6PD em solução aquosa, contendo ou não C₁₀E₄, *cibacron blue* e *procion red*, foi baseada no ensaio enzimático (BERGMEYER, 1983), com algumas modificações devido às condições dos experimentos de partição. Desta forma, o tampão McIlvaine foi utilizado ao invés de tampão Tris-HCl e a temperatura foi diminuída de 37°C para 15°C para prevenir a ocorrência de turbidez/separação de fases durante a medida de atividade. A concentração de G6PD foi considerada proporcional à atividade enzimática, medida determinando-se a velocidade

de formação de NADPH, o qual absorve em comprimento de onda U.V. a 340 nm (coeficiente de extinção molar $E = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma unidade de G6PD (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de NADP^+ por minuto, nas condições de ensaio. As concentrações de cada reagente na cubeta espectrofotométrica foram: 900 μL de tampão Mcllvaine pH 7,2, 20 μL de solução de glicose-6-fosfato 250 mM, 5 μL de solução de NADP^+ 131 mM e 20 μL de amostra contendo G6PD a ser determinada. O aumento de absorbância foi acompanhado por 50 segundos, logo após adição da amostra, em aparelho espectrofotômetro Shimadzu UV-160U.

4.2.3. Determinação da Concentração de Uroquinase

A determinação da concentração de UK em solução aquosa, contendo ou não C_{10}E_4 e/ou p-aminobenzamidina, foi baseada no ensaio enzimático (WOHL *et al.*, 1980), com algumas modificações devido às condições dos experimentos de partição. Desta forma, o Tampão Mcllvaine pH 7,2 foi utilizado ao invés de tampão Tris-HCl pH 9,0 e a temperatura foi diminuída de 37°C para 15°C para prevenir a ocorrência de turbidez/separação durante a medida de atividade. A concentração da UK foi considerada proporcional à atividade enzimática, medida determinando-se a velocidade de consumo do substrato H-glu-gly-arg-pNA acetato, que resulta na liberação do grupamento p-nitroanilida (p-NA), o qual absorve em comprimento de onda de 405 nm (coeficiente de extinção molar $E = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma unidade de UK (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de p-nitroanilida por minuto, nas condições de ensaio. As concentrações de cada reagente na cubeta espectrofotométrica foram: 50 μL de solução de H-glu-gly-arg-pNA acetato a 10 mM em tampão Mcllvaine, e 850 μL de amostra contendo UK a ser determinada. O aumento de absorbância foi acompanhado por 5 minutos em aparelho espectrofotômetro Shimadzu UV-160U.

4.2.4. Determinação da Concentração de p-Aminobenzamidina

A concentração do ligante de afinidade p-aminobenzamidina foi determinada por medida espectrofotométrica de absorbância em comprimento de onda de 290 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-160U. Para isso, o coeficiente de extinção de p-aminobenzamidina em solução aquosa foi determinado, sendo encontrado o valor $E_{290}^{mg/mL} = 73,3$. O comprimento de onda utilizado foi baseado na varredura do espectro UV (dados do fornecedor).

Nas análises de concentração de p-aminobenzamidina em soluções contendo C₁₀E₄ (fases superior e inferior dos sistemas de duas fases aquosas), a interferência do tensoativo foi considerada através da leitura de absorbância a 290 nm de soluções de C₁₀E₄ de concentração igual à da amostra a ser determinada. Esse valor foi subtraído do valor obtido para a amostra contendo p-aminobenzamidina.

4.2.5. Determinação da Concentração de Cibacron Blue

A concentração do ligante de afinidade *cibacron blue* foi determinada por medida espectrofotométrica de absorbância em espectrofotômetro Shimadzu UV-160U. Para determinação do comprimento de onda a ser utilizado, uma varredura do espectro visível foi realizada, sendo encontrado um pico de absorbância em $\lambda = 611$ nm. Portanto, uma curva de calibração de absorbância em função da concentração de *cibacron blue* em solução aquosa foi construída. Nas análises de concentração de *cibacron blue* em soluções contendo C₁₀E₄ (fases superior e inferior dos sistemas de duas fases aquosas), a interferência do tensoativo foi considerada através da medida de absorbância a 611 nm de soluções de C₁₀E₄ de concentração igual à da amostra a ser determinada. Esse valor foi subtraído do valor obtido para a amostra contendo *cibacron blue*.

4.2.6. Determinação da Concentração de *Procion Red*

A concentração do ligante de afinidade *procion red* foi determinada por medida espectrofotométrica de absorbância em aparelho espectrofotômetro Shimadzu UV-160U. Para determinação do comprimento de onda a ser utilizado, uma varredura do espectro visível foi realizada, sendo encontrado um pico de absorbância em $\lambda = 515$ nm. Portanto, uma curva de calibração de absorbância em função da concentração de *procion red* em solução aquosa foi construída. Nas análises de concentração de *procion red* em soluções contendo $C_{10}E_4$ (fases superior e inferior dos sistemas de duas fases aquosas), a interferência do tensoativo foi considerada através da medida de absorbância a 515 nm de soluções de $C_{10}E_4$ de concentração igual à da amostra a ser determinada. Esse valor foi subtraído do valor obtido para a amostra contendo *procion red*.

4.2.7. Determinação da Tensão superficial de Soluções Aquosas de *Procion red* e *Cibacron Blue*

A influência dos corantes derivados da triazina *procion red* e *cibacron blue* na tensão superficial da água foi estudada. Para isto, medidas de tensão superficial da água e de soluções aquosas de 0,20 mg/g de *procion red* e de 0,20 mg/g de *cibacron blue* foram realizada a 25°C, por meio do método da placa de Wilhelmy, em tensiômetro digital Krüss – K10T.

4.2.8. Determinação dos Parâmetros Cinéticos da enzima G6PD

Para poder aplicar a teoria de partição de enzimas hidrofílicas em sistemas micelares de duas fases aquosas contendo inibidores enzimáticos como ligantes de afinidade, os parâmetros cinéticos da G6PD, K_M (constante de Michaelis) e V_{max} (velocidade máxima), foram determinados em função da concentração de coenzima $NADP^+$. As constantes de inibição (K_i) de G6PD em presença dos inibidores *cibacron blue* e *procion red* também foram determinadas. Desta forma, medidas de atividade enzimática foram realizadas (conforme descrito no Item 4.2.2) em soluções de G6PD, variando-se a concentração de $NADP^+$ de 5 a 1200 μM . As soluções de

G6PD foram preparadas com uma concentração fixa de inibidor (*cibacron blue* ou *procion red*) e concentrações de $C_{10}E_4$ iguais às fases superior e inferior do experimento de partição da enzima e somente em tampão. Os parâmetros cinéticos K_M , V_{max} também foram determinados em ausência de inibidor, em soluções de $C_{10}E_4$ (com concentrações iguais às fases superior e inferior) e solução tampão. A Tabela 4.1 apresenta um resumo dos ensaios realizados.

Os valores de K_M , V_{max} e K_i foram obtidos pelo método de Lineweaver-Burk, ou seja, pela construção de gráficos de $1/V$ em função de $1/[NADP^+]$ (STRYER, 1988) (ver Item 4.3).

TABELA 4.1 – Composições das soluções utilizadas para determinação dos parâmetros cinéticos K_M , V_{max} e K_i da G6PD. Os símbolos + e – correspondem à presença ou não do respectivo inibidor enzimático (*procion red* ou *cibacron blue*).

	Solução Tampão	6,4% $C_{10}E_4$ Fase Superior	0,35% $C_{10}E_4$ Fase Inferior
<i>Procion Red</i>	+	+	+
	-	-	-
<i>Cibacron Bue</i>	+	+	+
	-	-	-

4.2.9. Preparação do Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

O sistema micelar de duas fases aquosas foi preparado em tubos de ensaio graduados de 10 mL, pela adição de $C_{10}E_4$, ligantes de afinidade (*cibacron blue* ou *procion red* no caso da G6PD e p-aminobenzamidina no caso da UK) e a enzima (G6PD ou UK), nas quantidades desejadas em tampão Mcllvaine, resultando em um sistema de massa total de 3 g. Como os ensaios enzimáticos para determinação de G6PD e UK são bastante sensíveis e devido ao custo destes reagentes, a concentração de G6PD utilizada nos experimentos de partição foi de 0,0068% (p/p), e a concentração de UK foi de 0,0003% (p/p). A utilização de pequenas concentrações de enzima também previne alterações na curva binodal. Os

componentes do sistema foram adicionados por pesagem (utilizando-se soluções estoque de concentrações conhecidas), homogeneizados manualmente e equilibrados a 4°C de modo a exibir uma única fase límpida e homogênea. Subseqüentemente, as soluções foram transferidas para um banho de temperatura controlada, previamente ajustado na temperatura desejada, e mantidas em repouso por 3 horas para obtenção da separação de fases e equilíbrio das mesmas. Após o repouso, o volume das fases superior e inferior foi medido e amostras das duas fases foram cuidadosamente retiradas, com auxílio de seringa e agulha, para análise de atividade enzimática e/ou determinação da concentração do ligante de afinidade. Foram realizadas separações de fases de sistemas contendo apenas C₁₀E₄ e tampão, nas mesmas condições utilizadas nos ensaios contendo ligantes, para verificação de interferência nas análises de concentração de p-aminobenzamidina, *cibacron blue* e *procion red*. Cada experimento de partição foi realizado em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança foram calculados.

4.3. Teoria de Partição de Enzimas Hidrofílicas em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Contendo Inibidores enzimáticos como Ligantes de Afinidade

O comportamento de uma proteína em um sistema de duas fases aquosas pode ser caracterizado pelo coeficiente de partição, K_p , definido a seguir:

$$K_p \equiv \frac{C_{p,t}}{C_{p,b}} \quad (4.1)$$

em que $C_{p,t}$ e $C_{p,b}$ são as concentrações de proteína nas fases superior (*top* – *t*) e inferior (*bottom* – *b*), respectivamente.

O comportamento de proteínas hidrofílicas em sistemas micelares de duas fases aquosas compostos de micelas cilíndricas foi recentemente modelado, e a seguinte equação baseada em interações do tipo volume de exclusão (*excluded-volume* – *EV*) mostrou-se adequada para a estimativa de

coeficientes de partição (KAMEI et al., 2002b; LUE, BLANKSCHTEIN, 1996; NIKAS et al., 1992):

$$K_p^{EV} = \exp \left[-(\phi_t - \phi_b) \left(1 + \frac{R_p}{R_o} \right)^2 \right] \quad (4.2)$$

em que ϕ_t e ϕ_b são as frações volumétricas de tensoativo nas fases superior e inferior, respectivamente, R_p é o raio hidrodinâmico da proteína e R_o é o raio da sessão transversal de cada micela cilíndrica. O raio da sessão transversal das micelas de C₁₀E₄ foi estimado em 21 Å, com base no modelo molecular de micelização desenvolvido por PUVVADA, BLANKSCHTEIN (1990). O valor de $(\phi_t - \phi_b)$, por sua vez, pode ser obtido a partir da curva binodal. Deste modo, a curva binodal referente ao sistema C₁₀E₄/tampão apresentada no Capítulo II (Item 2.4.1, Figura 2.2) foi utilizada, dado que o C₁₀E₄ em ambos os experimentos pertencia ao mesmo lote. De acordo com a equação (4.2), a partição de proteínas hidrofílicas em sistemas micelares de duas fases aquosas é governada primariamente por interações estéricas repulsivas do tipo volume de exclusão, as quais direcionam a proteína preferencialmente para a fase inferior, pobre em micelas, na qual a mesma encontra um maior volume livre (LUE, BLANKSCHTEIN, 1996).

Entretanto, a partição de proteínas em sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade não pode ser quantificada utilizando-se apenas a equação (4.2), pois as interações existentes entre a proteína e o ligante de afinidade não são consideradas na derivação desta equação. Portanto, a contribuição da interação proteína-ligante deve ser introduzida no modelo. Com este propósito, o modelo matemático de partição de proteínas em sistemas poliméricos de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade proposto por CORDES et al. (1987) foi adaptado ao caso particular de partição de enzimas em sistemas micelares de duas fases aquosas contendo inibidores como ligantes de afinidade.

Em uma solução aquosa contendo enzima e um inibidor, competitivo ou não-competitivo, como ligante de afinidade, ambos são encontrados na forma livre (E e I , respectivamente) e ligada (EI_z – complexo enzima-

inibidor). É importante ressaltar que, no caso de um inibidor não-competitivo, existe ainda a possibilidade de formação de complexo enzima-substrato-inibidor (ESI_z). Porém, como estamos considerando uma solução contendo somente enzima e inibidor, o complexo ESI_z não está presente no sistema.

Sabendo-se que z corresponde ao número de moléculas de inibidor ligadas à enzima, e sendo n o número de sítios de ligação presentes na proteína, podemos afirmar que o número de complexos enzima-inibidor possíveis de serem formados corresponde a:

$$\frac{n!}{z!(n-z)!} \quad (4.3)$$

Se assumirmos que os sítios de ligação da enzima são todos iguais e independentes uns dos outros, o equilíbrio enzima-inibidor pode ser representado por:

sendo a constante de dissociação do complexo EI_z ou constante de inibição (K_i) correspondente a

$$K_i^z = \frac{[E][I]^z}{[EI_z]} \quad (4.4)$$

Se considerarmos $[EI_z]$ como a concentração total de todos os possíveis complexos enzima-inibidor, combinando as (4.3) e (4.4), obtemos:

$$[EI_z] = \frac{n!}{z!(n-z)!} \frac{[E][I]^z}{K_i^z} \quad (4.5)$$

Por outro lado, a concentração total de enzima no sistema, $[E_{tot}]$, corresponde à somatória das concentrações de todos os possíveis complexos EI_z , expressa a seguir:

$$[E_{tot}] = \sum_{z=0}^n [EI_z] \quad (4.6)$$

É importante ressaltar que quando $z = 0$, o complexo EI_z corresponde à enzima livre (E) e, portanto, esta forma é considerada no cálculo da concentração total de enzima no sistema de acordo com a equação (4.6). A equação (4.5) pode ser substituída na equação (4.6), resultando em:

$$[E_{tot}] = \sum_{z=0}^n \frac{n!}{z!(n-z)!} \frac{[E][I]^z}{K_i^z} \quad (4.7)$$

A concentração de enzima livre ($[E]$) pode ser extraída do termo somatório, e a equação (4.7) reescrita da seguinte forma:

$$[E_{tot}] = [E] \sum_{z=0}^n \frac{n!}{z!(n-z)!} \left(\frac{[I]}{K_i} \right)^z \quad (4.8)$$

Como pode ser observado, o termo somatório na equação (4.8) corresponde à expansão binomial de $\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)^n$, e portanto temos:

$$[E_{tot}] = [E] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)^n \quad (4.9)$$

Portanto, para um sistema micelar de duas fases aquosas contendo inibidor enzimático, competitivo ou não-competitivo, como ligante de afinidade, o coeficiente de partição da enzima pode ser escrito da seguinte forma:

$$K_p = \frac{[E_{tot}]_t}{[E_{tot}]_b} = \frac{[E]_t \left(1 + \frac{[I]_t}{K_{i,t}}\right)^n}{[E]_b \left(1 + \frac{[I]_b}{K_{i,b}}\right)^n} \quad (4.10)$$

sendo que os índices t e b indicam as fases superior (*top*) e inferior (*bottom*), respectivamente. A razão entre as concentrações de enzima livre nas fases superior e inferior corresponde ao coeficiente de partição da enzima na ausência de inibidor, governado pelo efeito de volume de exclusão:

$$K_p^{EV} = \frac{[E]_t}{[E]_b} \quad (4.11)$$

Sabendo-se que o coeficiente de partição do inibidor ($K_{ligante}$) corresponde à razão entre a concentração de inibidor na fase superior, $[I]_t$, e a concentração de inibidor na fase inferior, $[I]_b$, temos:

$$K_{\text{ligante}} = \frac{[I]_t}{[I]_b} \quad \text{ou} \quad [I]_b = \frac{[I]_t}{K_{\text{ligante}}} \quad (4.12)$$

Substituindo-se as equações (4.11) e (4.12) na equação 4.10, tem-se:

$$K_p = K_p^{EV} \left(\frac{1 + ([I]_t / K_{i,t})}{1 + ([I]_t / (K_{i,b} K_{\text{ligante}}))} \right)^n \quad (4.13)$$

Portanto, o coeficiente de partição de uma enzima em sistema micelar não-iônico de duas fases aquosas contendo inibidor competitivo ou não-competitivo como ligante de afinidade pode ser estimado por:

$$K_p = K_p^{EV} K_p^{aff} \quad (4.14)$$

sendo que K_p^{EV} corresponde à contribuição devido a interações do tipo volume de exclusão, dada pela equação (4.2), e K_p^{aff} corresponde à contribuição devido a interações de afinidade entre a enzima e inibidor, expressa por (CORDES *et al.*, 1987):

$$K_p^{aff} = \left(\frac{1 + ([I]_t / K_{i,t})}{1 + ([I]_t / (K_{i,b} K_{\text{ligante}}))} \right)^n \quad (4.15)$$

A concentração de inibidor na fase superior ($[I]_t$) e o coeficiente de partição do ligante (K_{ligante}) podem ser determinados experimentalmente. As constantes de inibição nas fases superior e inferior do sistema ($K_{i,t}$ e $K_{i,b}$) podem ser obtidas pelo método de Lineweaver-Burk, ou seja, pela construção de gráficos do inverso da velocidade inicial ($1/V$) em função do inverso da concentração de substrato ($1/S$), ou nesse caso concentração de NADP⁺. A Figura 4.6 apresenta o gráfico de Lineweaver-Burk esperado para sistemas enzimáticos em presença ou não de inibidor.

FIGURA 4.6 – Gráficos de Lineweaver-Burk (duplo recíproco de cinética enzimática) na presença e na ausência de inibidores competitivo (curva em vermelho) e não-competitivo (curva em azul). V_{max} , é a velocidade máxima da reação enzimática, K_m é a constante de Michaelis, V_{max}^{app} e K_m^{app} são a velocidade máxima e a constante aparente de Michaelis, respectivamente, na presença do inibidor.

Portanto, graficamente pode-se obter os parâmetros cinéticos da enzima, sendo que (STRYER, 1988):

$$K_m^{app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (4.16)$$

e

$$V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (4.17)$$

em que V_{max} , é a velocidade máxima da reação enzimática, K_m é a constante de Michaelis, K_m^{app} é a constante aparente de Michaelis na presença do inibidor competitivo e V_{max}^{app} é a velocidade máxima aparente na presença do inibidor não-competitivo.

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Análise teórica da partição das enzimas G6PD e UK em sistema micelar C₁₀E₄/tampão de duas fases aquosas

A Tabela 4.2 apresenta um resumo de algumas propriedades das duas enzimas estudadas.

TABELA 4.2 – Propriedades das enzimas G6PD e UK. A carga efetiva foi calculada conforme descrito no Apêndice 2. O raio hidrodinâmico da G6PD foi calculado com base nas dimensões de seu cristal isomorfo (ROWLAND *et al.* 1994) e o raio hidrodinâmico da UK foi calculado com base no raio de giração apresentado por MANGEL *et al.* (1991).

Propriedade	UK	G6PD
Massa molar	54.000 Da ¹	104.000 Da ³
Ponto isoelétrico (pI)	8,7 ²	4,6 ³
Carga efetiva (pH 7.2)	+ 16,5	- 42,2
Raio hidrodinâmico (R _p)	40 Å	68 Å

¹ FAHEY, CHAUDHURI, 2001

² PAOLETTI, SHERRY, 1977

³ OLIVE, LEVY, 1971

Os valores de massa molar e raio hidrodinâmico na Tabela 4.2 mostram que a UK é uma proteína menor e menos hidrofílica do que a G6PD e, portanto, deve apresentar valores de coeficiente de partição (K_p) em sistema micelar de duas fases aquosas formado pelo tensoativo C₁₀E₄ maiores do que a G6PD. Em outras palavras, a UK é menos excluída para a fase inferior, devido à presença de alta densidade de micelas na fase superior, do que a G6PD.

A Figura 4.7 compara os coeficientes de partição estimados para UK e G6PD, com base na teoria de volume de exclusão. As curvas de K_p em função da diferença de fração volumétrica de tensoativo nas fases superior e inferior ($\phi_t - \phi_b$), diretamente relacionada ao efeito de volume de exclusão, confirmam a partição mais extrema da G6PD para a fase inferior devido ao raio hidrodinâmico desta enzima ser maior do que o da UK.

FIGURA 4.7 – Variação do coeficiente de partição (K_p) estimado em função do volume de exclusão ($\phi_t - \phi_b$) para as enzimas G6PD (—) e UK (—).

4.4.2. Estudo da Partição de UK no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão contendo o Ligante de Afinidade p-Aminobenzamidina Livre em Solução

4.4.2.1. Partição da p-Aminobenzamidina no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão

Inicialmente foi estudada a partição do ligante p-aminobenzamidina em sistema $C_{10}E_4$ /tampão. A concentração de ligante utilizada foi de 0,030 mg/g, de forma a não causar alterações da curva binodal e ainda resultando em bons valores de absorbância na determinação da concentração de p-aminobenzamidina nas fases formadas. Foi utilizada uma concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60% (p/p) e temperatura de 20°C para separação de fases, resultando em fases superior e inferior de volumes iguais ($R = V_t/V_b = 1$). A Tabela 4.3 contém os resultados de coeficiente de partição e balanço de massa de p-aminobenzamidina obtidos, sendo o balanço de massa (BM) definido por:

$$BM = \frac{C_t V_t + C_b V_b}{C_i V_i} \times 100\% \quad (4.18)$$

em que C_t , C_b e C_i referem-se às concentrações do componente (ligante ou enzima) nas fases superior, inferior e na solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. V_t , V_b e V_i são os volumes das fases superior, inferior e da solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. No caso das enzimas, como a determinação de concentração é feita por medida de atividade enzimática, adotou-se o termo balanço de atividade (BA).

TABELA 4.3 – Resultados de coeficiente de partição (K_{p-AB}) e balanço de massa (BM_{p-AB}) de p-aminobenzamidina obtidos no sistema $C_{10}E_4$ /tampão a 20°C contendo 3,60% (p/p) de tensoativo. Os erros apresentados correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

K_{p-AB}	BM_{p-AB} (%)
$1,05 \pm 0,06$	108 ± 10

A molécula de p-aminobenzamidina, da mesma forma que íons e outras moléculas pequenas, não sofre efeito de volume de exclusão. Portanto, uma partição preferencial desta molécula para uma das fases seria observada somente em caso de interações (por exemplo hidrofóbicas, repulsivas) com as micelas. No entanto, segundo os resultados apresentados na Tabela 4.3, a p-aminobenzamidina se distribuiu uniformemente no sistema $C_{10}E_4$ /tampão, resultando em um coeficiente de partição de 1,05. Desta forma, pode-se afirmar que a p-aminobenzamidina não interage com as micelas de $C_{10}E_4$ e, portanto, apresenta partição uniforme entre as duas fases do sistema. O resultado de balanço de massa mostra que houve recuperação total da molécula de p-aminobenzamidina após a separação de fases do sistema.

4.4.2.2. Partição da Enzima UK no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão, em Presença ou Não do Ligante de Afinidade p-Aminobenzamidina

A partição da enzima UK foi estudada em sistema $C_{10}E_4$ /tampão, na presença do ligante de afinidade p-aminobenzamidina. Para realização deste

experimento, foram utilizadas as mesmas condições do experimento de partição de p-aminobenzamidina (0,030 mg/g de p-aminobenzamidina, 3,60% (p/p) de $C_{10}E_4$ e temperatura de 20°C). É importante ressaltar que, segundo a estequiometria da reação enzima-ligante, considerando-se o número de sítios de ligação $n = 1$, a p-aminobenzamidina foi adicionada em excesso. Um experimento de partição da UK em sistema $C_{10}E_4$ /tampão em ausência de p-aminobenzamidina também foi realizado, para que se pudesse avaliar o efeito da interação enzima-ligante no coeficiente de partição. Como a UK na concentração utilizada não interfere na curva binodal, o efeito de volume de exclusão foi mantido constante utilizando-se as mesmas condições do experimento contendo ligante de afinidade (3,60% (p/p) de $C_{10}E_4$ e temperatura de 20°C). As Figuras 4.8 e 4.9 apresentam os resultados de coeficiente de partição (K_{UK}) e balanço de atividade da UK, respectivamente, no sistema $C_{10}E_4$ /tampão contendo ou não o ligante p-aminobenzamidina.

FIGURA 4.8 – Coeficientes de partição da UK (K_{UK}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20^\circ\text{C}$ e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60% (p/p), na presença do ligante de afinidade p-aminobenzamidina (barra amarela) ou não (barra branca). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 4.9 – Balanços de atividade de UK (BA_{UK}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60% (p/p), na presença do ligante de afinidade p-aminobenzamidina (barra amarela) ou não (barra branca). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os resultados apresentados na Figura 4.8 mostram que o comportamento da UK em sistema $C_{10}E_4$ /tampão não foi alterado pela presença do ligante de afinidade p-aminobenzamidina, o que se reflete nos valores de coeficiente de partição da enzima semelhantes na presença ou não do ligante, considerando-se o erro experimental. Este resultado pode ser explicado pelo fato de a p-aminobenzamidina apresentar distribuição uniforme entre as duas fases do sistema e, portanto, não interferir no perfil de partição da UK. Deve-se ressaltar que o coeficiente de partição obtido experimentalmente para UK, $K_{UK} = 0,70$, está de acordo com o estimado pela teoria do volume de exclusão, $K_{UK}^{EV} = 0,67$, reforçando a aplicabilidade do modelo proposto. Observou-se ainda que o perfil de partição do ligante p-aminobenzamidina não foi alterado pela presença da UK, sendo obtido um mesmo valor de K_{p-AB} (dado não apresentado).

Portanto, a utilização de p-aminobenzamidina como ligante de afinidade livre em sistema $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas para partição de UK não é adequada, uma vez que o ligante se distribui

uniformemente entre as duas fases formadas. A síntese de *tensoativos de afinidade*, pela ligação covalente da p-aminobenzamidina à cabeça de um tensoativo não-iônico, apresenta-se como uma alternativa a ser estudada. Desta forma, seriam criados *sistemas micelares mistos (tensoativo não-iônico/tensoativo-ligante) de duas fases aquosas*.

Os balanços de atividade de UK (Figura 4.9) indicam que não houve recuperação total da enzima no sistema C₁₀E₄/tampão. A princípio, se poderia supor que a presença da p-aminobenzamidina, inibidor da UK, causou diminuição nos valores de atividade, resultando em balanço de atividade inferior a 100%. Porém, balanços de atividade semelhantes foram obtidos na presença ou não do inibidor. Esta observação nos leva a concluir que foi utilizada uma concentração de substrato nas determinações de atividade suficientemente alta para anular o efeito do inibidor competitivo p-aminobenzamidina.

Os valores de balanço de atividade obtidos podem ser resultado de imprecisão nas determinações de atividade de UK, uma vez que foram utilizadas concentrações muito baixas da enzima (devido ao custo elevado) aumentando o erro experimental (refletido nas barras de erro obtidas). Outra possibilidade é a de que, apesar de o tensoativo C₁₀E₄ ser considerado ameno, um certo grau de desnaturação tenha ocorrido no sistema. Sabe-se que tensoativos, de uma forma geral, são capazes de se ligarem a proteínas. Em uma solução contendo uma proteína e um tensoativo iônico, os monômeros se ligam primariamente por interações eletrostáticas aos resíduos de aminoácidos de carga oposta na superfície da proteína (*ligação sítio-específica*), induzindo uma expansão da estrutura terciária da proteína, que por sua vez permite uma maior interação das caudas apolares das moléculas de tensoativo com o interior apolar da proteína (*ligação cooperativa, não-específica*). No caso de tensoativos não-iônicos como o C₁₀E₄, apesar de não existirem ligações *sítio-específicas*, podem ocorrer em determinados casos interações hidrofóbicas não-específicas entre os monômeros e as moléculas de proteína. A proteína BSA, por exemplo, possui um *bolso apolar* na sua superfície capaz de acomodar 2 ou 3

moléculas de tensoativos não-iônicos da série dos Tritons (GODDARD, ANANTHAPADMANABHAN, 1993).

No caso da UK, sabe-se que esta enzima apresenta em sua estrutura um módulo hidrofóbico conhecido como *Kringe domain* (TAKAHASHI *et al.*, 2000). Portanto, um certo grau de adsorção (resultante de interações hidrofóbicas) de moléculas de C₁₀E₄ na superfície da UK pode ter ocorrido, alterando a estrutura secundária desta enzima o suficiente para diminuir a sua atividade e resultar em balanços de atividade inferiores a 100%.

4.4.3. Estudo da Partição de G6PD no Sistema C₁₀E₄/Tampão Contendo Corantes Tipo Triazina como Ligantes de Afinidade Livres em Solução

4.4.3.1. Partição dos Ligantes *Cibacron Blue* e *Procion Red* no Sistema C₁₀E₄/Tampão

Primeiramente foi estudada a partição dos ligantes *cibacron blue* e *procion red*, separadamente, em sistema C₁₀E₄/tampão. A concentração de ligante utilizada foi de 0,005 mg/g, de forma a não causar alterações na curva binodal e ainda resultar em bons valores de absorbância nas determinações da concentração de ligante nas fases formadas. Foi utilizada uma concentração de C₁₀E₄ de 3,60% (p/p) e temperatura de 20°C para separação de fases, resultando em fases superior e inferior de volumes iguais ($R = V_s/V_b = 1$). A Figura 4.10 apresenta os resultados de coeficiente de partição (K_{ligante}) dos ligantes *cibacron blue* e *procion red* no sistema C₁₀E₄/tampão. O balanço de massa fechou em 100%, considerando-se o erro experimental, nos dois casos.

De acordo com a Figura 4.10, pode-se observar que ambos os corantes do tipo triazina migraram preferencialmente para a fase superior, rica em micelas, resultando em coeficientes de partição consideravelmente superiores a 1 ($K_{\text{cibacron}} = 34$ e $K_{\text{procion}} = 28$). Na Figura 4.11, é possível visualizar a partição preferencial do corante *cibacron blue* para a fase superior do sistema C₁₀E₄/tampão.

FIGURA 4.10 – Coeficientes de partição dos ligantes *cibacron blue* (barra azul) e *procion red* (barra vermelha) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20^\circ\text{C}$ e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60% (p/p). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 4.11 – Ilustração da partição preferencial do corante *cibacron blue* para a fase superior, rica em micelas, do sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas.

O comportamento observado deve-se às estruturas químicas destas substâncias (Figura 4.2) que, apesar de serem hidrossolúveis, apresentam diversos anéis aromáticos de caráter hidrofóbico. Além disso, a combinação de grupamentos hidrofóbicos com terminações carregadas nestas moléculas confere propriedades tensoativas às mesmas. Para comprovar esta afirmação, a influência destes componentes na tensão superficial da água foi verificada. Os resultados obtidos indicaram uma redução na tensão superficial da água deionizada de 72 mN/m para 45 mN/m no caso de adição de 0,2 mg/g de *cibacron blue*, e 56 mN/m no caso de adição de 0,2 mg/g de *procion red*. Portanto, os ligantes estudados devem interagir com as moléculas de tensoativo $C_{10}E_4$ e se associar às micelas formadas.

4.4.3.2. Partição da Enzima G6PD no Sistema $C_{10}E_4$ /Tampão, na Presença ou Não dos Ligantes de Afinidade *Cibacron Blue* e *Procion Red*

A partição da enzima G6PD foi estudada em sistema $C_{10}E_4$ /tampão, na presença dos ligantes de afinidade *cibacron blue* e *procion red*, separadamente. Foram utilizadas as mesmas condições do experimento de partição dos ligantes (0,005 mg/g de ligante, 3,60% (p/p) de $C_{10}E_4$ e temperatura de 20 °C). É importante ressaltar que, segundo a estequiometria da reação enzima-ligante, considerando-se o número de sítios de ligação $n = 2$, tanto o *cibacron blue* quanto o *procion red* foram adicionados em excesso. Um experimento de partição da G6PD em sistema $C_{10}E_4$ /tampão em ausência de ligantes de afinidade também foi realizado, para que se pudesse avaliar o efeito da interação enzima-ligante no coeficiente de partição. Como a G6PD na concentração utilizada não interfere na curva binodal, o efeito de volume de exclusão foi mantido constante utilizando-se as mesmas condições do experimento contendo ligante de afinidade (3,60% (p/p) de $C_{10}E_4$ e temperatura de 20 °C), correspondendo a um valor de $(\phi_t - \phi_b)$ de 0,069. As Figuras 4.12 e 4.13 apresentam os resultados de balanço de atividade e coeficiente de partição (K_{G6PD}) da G6PD, respectivamente, no sistema $C_{10}E_4$ /tampão contendo ou não os ligantes de afinidade estudados.

FIGURA 4.12 – Balanços de atividade da G6PD (BA_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($(\phi_t - \phi_b) = 0,069$) e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60%, na ausência de ligantes de afinidade (barra branca), na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como pode ser observado na Figura 4.12, foram obtidos balanços de atividade de aproximadamente 100% para todos os experimentos realizados, portanto confirmando resultados prévios (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003) de que a G6PD apresenta-se estável nos sistemas de duas fases aquosas contendo o tensoativo $C_{10}E_4$, sem perda significativa de atividade. Como balanços de atividade de 100% foram obtidos na presença dos inibidores, pode-se afirmar que foi utilizada uma concentração de substrato nas determinações de atividade enzimática suficientemente alta para anular as inibições exercidas pelo *cibacron blue* e pelo *procion red*. Uma outra possibilidade consiste na não existência de inibição, devido à interação dos ligantes com o tensoativo.

De acordo com a Figura 4.13, um pequeno incremento no coeficiente de partição da G6PD (K_{G6PD}) foi observado na presença dos ligantes de afinidade *cibacron blue* e *procion red*, sendo obtidos valores de K_{G6PD} de

0,39 e 0,40, respectivamente, em contraste com um $K_{G6PD} = 0,36$ sem ligantes de afinidade.

FIGURA 4.13 – Coeficientes de partição da G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($(\phi_t - \phi_b) = 0,069$) e concentração de $C_{10}E_4$ de 3,60% (p/p), na ausência de ligantes de afinidade (barra branca), na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Apesar de a diferença em valor de K_{G6PD} observada ser pequena, o erro experimental obtido demonstra o significado estatístico da tendência. De acordo com a teoria apresentada no Item 4.3, a partição de enzimas em sistemas micelares não-iônicos de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade livres em solução é governada por interações do tipo volume de exclusão e interações de afinidade. As interações estéricas do tipo volume de exclusão apresentam um efeito significativo na partição de proteínas em sistemas micelares de duas fases aquosas (LIU *et al.*, 1996; KAMEI *et al.*, 2002; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003). Estas interações direcionam a proteína preferencialmente para a fase inferior, pobre em micelas, na qual a mesma encontra um maior volume livre.

Com o intuito de minimizar a contribuição do efeito de volume de exclusão no coeficiente de partição e possivelmente aumentar o seu valor, novos experimentos foram realizados, em condições que forneceram um volume de exclusão menor. Neste novo grupo de experimentos, a temperatura de partição foi de 19,3°C, fornecendo um $(\phi_t - \phi_b) = 0,026$, e portanto um efeito de volume de exclusão consideravelmente menor do que o observado nos experimentos iniciais. A concentração de C₁₀E₄ utilizada foi de 2,5% (p/p), resultando novamente em fases superior e inferior de volumes iguais ($R = V_t/V_b = 1$). A concentração dos ligantes *cibacron blue* e *procion red* foi mantida a mesma (0,005 mg/g). Na Figura 4.14 estão apresentados os resultados de K_{G6PD} obtidos em sistema C₁₀E₄/tampão com $(\phi_t - \phi_b) = 0,026$.

FIGURA 4.14 – Coeficientes de partição da G6PD (K_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema micelar C₁₀E₄/tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 19,3$ °C ($(\phi_t - \phi_b) = 0,026$) e concentração de C₁₀E₄ de 2,50% (p/p), na ausência de ligantes de afinidade (barra branca), na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os resultados apresentados na Figura 4.14 mostram, novamente, um pequeno incremento, porém estatisticamente significativo, no coeficiente de partição da G6PD na presença dos ligantes de afinidade *cibacron blue* e *procion red*, sendo obtidos valores de K_{G6PD} de 0,73 na presença de ambos os ligantes, em contraste com um $K_{G6PD} = 0,68$ sem ligantes de afinidade. Portanto, pode-se afirmar que a contribuição das interações de afinidade no valor de K_{G6PD} é pequena, sendo que mesmo em sistemas apresentando baixos valores de $(\phi_t - \phi_b)$ (menor efeito volume de exclusão), o aumento no coeficiente de partição devido à presença do ligante de afinidade é muito pequeno. Os balanços de atividade obtidos para estes experimentos, apresentados na Figura 4.15, foram todos de aproximadamente 100%, considerando-se o erro experimental.

FIGURA 4.15 – Balanços de atividade da G6PD (BA_{G6PD}) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 19,3^\circ\text{C}$ ($(\phi_t - \phi_b) = 0,026$) e concentração de $C_{10}E_4$ de 2,50% (p/p), na ausência de ligantes de afinidade (barra branca), na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

É importante observar que o coeficiente de partição dos ligantes também variou com a diminuição da diferença de concentração de tensoativo entre as fases superior e inferior ($\phi_t - \phi_b$). Como previsto, os coeficientes de partição de *cibacron blue* e *procion red* obtidos no sistema $C_{10}E_4$ /tampão com $(\phi_t - \phi_b) = 0,026$ (Figura 4.16) foram inferiores àqueles obtidos com $(\phi_t - \phi_b) = 0,069$, porém superiores a 1 ($K_{\text{ligante}} = 3,9$ para o *procion red* e $K_{\text{ligante}} = 4,0$ para o *cibacron blue*).

FIGURA 4.16 – Coeficientes de partição dos ligantes *cibacron blue* (barra azul) e *procion red* (barra vermelha) obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 19,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e concentração de $C_{10}E_4$ de 2,50% (p/p). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Uma provável explicação para a fraca influência dos ligantes de afinidade *cibacron blue* e *procion red* livres em solução na partição da G6PD em sistema $C_{10}E_4$ /tampão, é que estes compostos estejam pouco acessíveis para a ligação com a enzima. Devido à estrutura química destes corantes e às propriedades tensoativas já mencionadas, os mesmos devem interagir com as moléculas de tensoativo $C_{10}E_4$ podendo se posicionar na “interface” entre as cabeças polares de óxido de etileno e as caudas apolares da micela

de $C_{10}E_4$. Desta forma, a probabilidade de formação de complexo enzima-ligante estaria reduzida. Uma forma de confirmar esta hipótese e, mais ainda, reverter este quadro, seria a síntese de *tensoativos de afinidade*, pela ligação covalente dos ligantes à cabeça de um tensoativo não-iônico. Desta forma, seriam criados *sistemas micelares mistos (tensoativo não-iônico/tensoativo-ligante) de duas fases aquosas*.

Deve-se considerar ainda que não somente o perfil de partição da G6PD pode ser alterado pela presença do ligante, mas o perfil de partição do ligante também pode ser alterado pela presença da enzima. Neste sentido, além do aumento no coeficiente de partição da G6PD observado na presença dos corantes *cibacron blue* e *procion red*, uma diminuição no coeficiente de partição destes últimos ocorreria devido à ligação na G6PD, a qual apresenta partição preferencial para a fase inferior do sistema. Se o ligante interagir com a enzima em um sítio específico de difícil acesso (não localizado na superfície), a possibilidade de que a partição do ligante seja mais influenciada pela presença da enzima é maior do que a possibilidade de que o inverso ocorra.

4.4.3.3. Parâmetros Cinéticos da G6PD em presença ou não dos Inibidores *Procion Red* e *Cibacron Blue*

Os parâmetros cinéticos da G6PD K_M , V_{max} e K_i (para *procion red* e *cibacron blue*) foram determinados em função da concentração da coenzima $NADP^+$, em solução tampão e soluções de $C_{10}E_4$ nas mesmas concentrações de tensoativo que as fases superior e inferior do sistema $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas com $(\phi_t - \phi_b) = 0,069$. As Figuras 4.17, 4.18 e 4.19 apresentam as curvas de V (U/mL) em função da concentração de $NADP^+$, na presença ou não dos inibidores, em solução tampão, solução de $C_{10}E_4$ a 6,4% (fase superior) e solução de $C_{10}E_4$ a 0,35% (fase inferior), respectivamente.

FIGURA 4.17 – Curva da velocidade inicial (V) da reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ([NADP⁺]) em solução tampão sem inibidor (♦), com inibidor *procion red* 0,01 mg/g (■) e com inibidor *cibacron blue* 0,05 mg/g (▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 4.18 – Curva da velocidade inicial (V) da reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ([NADP⁺]) em solução de C₁₀E₄ a 6,4% (fase superior) sem inibidor (♦), com inibidor *procion red* 0,05 mg/g (■) e com inibidor *cibacron blue* 0,05 mg/g (▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 4.19 – Curva da velocidade inicial (V) da reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ($[NADP^+]$) em solução de $C_{10}E_4$ a 0,35% (fase inferior) sem inibidor (♦), com inibidor *procion red* 0,05 mg/g (■) e com inibidor *cibacron blue* 0,05 mg/g (▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como pode ser observado nas Figuras 4.17, 4.18 e 4.19, tanto o corante *procion red* quanto o *cibacron blue* inibem a reação enzimática catalisada pela G6PD, uma vez que as curvas de cinética obtidas na presença destas substâncias diferem da curva de cinética obtida na ausência das mesmas. Pode-se observar ainda que o perfil cinético da G6PD na ausência dos inibidores é o mesmo nas três soluções estudadas (tampão, fase superior e fase inferior). Portanto, a presença de tensoativo $C_{10}E_4$ não altera a cinética da reação enzimática catalisada pela G6PD. Para caracterizar o tipo de inibição exercida por cada substância, gráficos de Lineweaver-Burk foram construídos e estão apresentados nas Figuras 4.20 e 4.21.

FIGURA 4.20 – Gráficos de Lineweaver-Burk para a reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ($[NADP^+]$) sem inibidor ($\blacklozenge$) e com inibidor *procion red* ($\blacksquare$) em solução tampão (I), solução de $C_{10}E_4$ a 6,4% - fase superior (II) e solução de $C_{10}E_4$ a 0,35% - fase inferior (III).

FIGURA 4.21 – Gráficos de Lineweaver-Burk para a reação enzimática catalisada pela G6PD em função da concentração de coenzima ($[NADP^+]$) sem inibidor ($\blacklozenge$) e com inibidor *cibacron blue* ($\blacktriangle$) em solução tampão (I), solução de $C_{10}E_4$ a 6,4% - fase superior (II) e solução de $C_{10}E_4$ a 0,35% - fase inferior (III).

Os resultados apresentados nas Figuras 4.20 e 4.21 novamente indicam inibição da G6PD tanto pelo corante *procion red* quanto pelo *cibacron blue*. O perfil dos gráficos apresentados na Figura 4.20 sugere uma inibição competitiva da G6PD pelo *procion red*, enquanto que o perfil dos gráficos apresentados na Figura 4.21, sugere inibição não-competitiva da G6PD pelo *cibacron blue*. Os valores de K_M e V_{max} , bem como as constantes de inibição K_i , obtidos com base nos gráficos presentes nas Figuras 4.20 e 4.21 estão resumidos na Tabela 4.4. É importante ressaltar que na presença do inibidor *procion red* K_M na tabela refere-se ao K_M^{app} e na presença do inibidor *cibacron blue* V_{max} na tabela refere-se ao V_{max}^{app} .

TABELA 4.4 – Valores de velocidade inicial máxima (V_{max}), constante de Michaelis (K_M) e constante de inibição (K_i) de G6PD obtidos experimentalmente. Os valores apresentam um erro padrão de aproximadamente 5%.

		K_M (μM)	V_{max} (U/mLs)	K_i (mg/g)
Solução Tampão	sem ligante	161	4,3	-
	<i>procion red</i>	318	5,0	0,01
	<i>cibacron blue</i>	154	3,4	0,19
Fase Superior (6,4% C₁₀E₄)	sem ligante	177	4,3	-
	<i>procion red</i>	346	5,2	0,05
	<i>cibacron blue</i>	164	3,8	0,38
Fase Inferior (0,35% C₁₀E₄)	sem ligante	159	4,2	-
	<i>procion red</i>	197	4,3	0,22
	<i>cibacron blue</i>	173	4,0	0,67

De acordo com a Tabela 4.4, os valores de K_M obtidos na presença de *procion red*, tanto em solução tampão quanto em solução contendo C₁₀E₄ (fase superior e inferior), diferem daqueles obtidos na ausência de inibidores, enquanto que os valores de V_{max} , são aproximadamente iguais na presença ou não do inibidor *procion red*. Em contrapartida, os valores de K_M obtidos na presença de *cibacron blue*, tanto em solução tampão quanto em solução

contendo $C_{10}E_4$ (fase superior e inferior), são aproximadamente iguais àqueles obtidos na ausência de inibidores, enquanto que os valores de V_{max} são diferentes na presença deste inibidor. Portanto, os resultados presentes na Tabela 4.4 confirmam a tendência de inibição competitiva da G6PD pelo *procion-red* e inibição não-competitiva da G6PD pelo *cibacron blue*.

Segundo LIN *et al.* (1996), o mecanismo de ligação de corantes de triazina a proteínas não está totalmente esclarecido. De fato, muitas proteínas capazes de ligar-se a estas substâncias não apresentam um sítio de ligação a nucleotídeos ($NAD(P)^+$, ATP), como por exemplo a albumina (ANGAL, DEAN, 1977) e a troponina (REISLER *et al.* 1980). LIN *et al.* (1996) afirmam ainda que o *cibacron blue* liga-se mais facilmente a enzimas NAD^+ dependentes, enquanto que o *procion red* liga-se mais facilmente a enzimas $NADP^+$ dependentes. No presente estudo, o *procion red* competiu pelo mesmo sítio de ligação que o $NADP^+$, enquanto que o *cibacron blue* ligou-se em um sítio distinto da G6PD.

Pode-se observar ainda na Tabela 4.4 que o valor de K_i é inferior no caso do inibidor *procion red*, na presença ou não de tensoativo, o que indica uma ligação mais forte deste corante na G6PD do que no caso do *cibacron blue*. Porém esta diferença não foi suficiente para resultar em coeficientes de partição significativamente superiores na presença do ligante *procion red* em comparação com os coeficientes de partição obtidos na presença de *cibacron blue*. Para os dois ligantes estudados, o valor da constante de inibição aumenta na presença do tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$, o que está refletido nos valores superiores de K_i nas soluções de tensoativo (fase superior e inferior), quando comparados àqueles obtidos em solução tampão. Esta observação reforça a consideração de que, em sistema $C_{10}E_4$ /tampão, os corantes de triazina estejam pouco acessíveis para a ligação com a enzima, devido a interações com as moléculas de tensoativo $C_{10}E_4$.

4.4.3.4. Utilização da Teoria de Partição de Enzimas Hidrofílicas em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Contendo Inibidores Enzimáticos Como Ligantes de Afinidade para Estimar Coeficientes de Partição de G6PD

Os valores de K_i obtidos foram utilizados para o cálculo teórico dos coeficientes de partição da G6PD em sistema micelar C₁₀E₄/tampão de duas fases aquosas contendo *procion red* e *cibacron blue* como ligantes de afinidade. Considerando-se que a G6PD de *L. mesenteroides* é um dímero e que o inibidor *procion red* liga-se no sítio de ligação da coenzima NADP⁺ na G6PD, assumiu-se o valor $n = 2$ na equação (4.13). Apesar de o inibidor *cibacron blue* ligar-se em um sítio distinto da G6PD, optou-se por, numa primeira aproximação, assumir que apenas uma molécula de inibidor liga-se em cada subunidade, utilizando-se também $n = 2$. Porém, estudos de ligação do inibidor à G6PD, utilizando-se técnica de diálise por exemplo, devem ser realizados para determinação do número real de moléculas de *cibacron blue* que se ligam à molécula de G6PD. A Figura 4.22 apresenta a comparação entre os coeficientes de partição experimentais e os coeficientes de partição estimados pela teoria apresentada no Item 4.3.

A Figura 4.22 mostra uma correlação quantitativa considerável entre os coeficientes de partição estimados pela teoria e os obtidos experimentalmente. Com base nestes resultados, uma análise teórica da variação do coeficiente de partição de G6PD em sistema C₁₀E₄/tampão de duas fases aquosas contendo *procion red* foi realizada.

FIGURA 4.22 – Comparação entre os valores de K_{G6PD} obtidos experimentalmente no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 20^\circ\text{C}$ ($(\phi_t - \phi_b) = 0,069$) na presença do ligante *cibacron blue* (barra azul) e na presença do ligante *procion red* (barra vermelha) e os estimados pela teoria (barras brancas). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Para a análise teórica, considerou-se a partição da G6PD em sistema $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas com $(\phi_t - \phi_b) = 0,069$ a 20°C , contendo *procion red*. Para os cálculos, assumiu-se que o coeficiente de partição do ligante e as constantes de inibição nas fase superior e inferior do sistema permanecem constantes para um dado valor de $(\phi_t - \phi_b)$, e estudou-se a variação de K_{G6PD} em função da concentração de ligante na fase superior do sistema (ver equação 4.13). A Figura 4.23 apresenta a curva de obtida em função da concentração de *procion red* na fase superior do sistema, $[I]_t$.

FIGURA 4.23 – Variação de K_{G6PD} em função da concentração do inibidor *procion red*, $[I]_t$, em sistema $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas com $(\phi_t - \phi_b) = 0,069$ a 20°C , calculada de acordo com o modelo teórico.

De acordo com a Figura 4.23, o coeficiente de partição da G6PD aumenta conforme o aumento da concentração de *procion red* na fase superior do sistema micelar de duas fases aquosas, sendo que um valor de $[I]_t = 0,1$ mg/g resultaria em um valor de $K_{G6PD} = 2,4$. Sabe-se ainda que $K_{procion} = 28$ no sistema analisado, e que $K_{procion} = [I]_t/[I]_b$. Como a razão volumétrica entre as fases superior e inferior (R) é 1 para a concentração inicial de $C_{10}E_4$ utilizada, pode-se considerar que a concentração inicial de *procion red* de 0,05 mg/g forneceria uma concentração aproximada de 0,1 mg/g deste ligante na fase superior do sistema, após a separação de fases. Com base nesta análise teórica, um ensaio de partição da G6PD em sistema $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas com $(\phi_t - \phi_b) = 0,069$ a 20°C contendo 0,05 mg/g de *procion red* foi realizado, sendo esperado para este ensaio um valor de K_{G6PD} próximo de 2,4. Entretanto, um valor de $K_{G6PD} = 0,36 \pm 0,02$ foi obtido. Os balanços de massa de *procion red* e de atividade de G6PD foram de 100%, considerando-se o erro experimental. Apesar de ter sido observado um aumento de K_{G6PD} de 28% para este ensaio (K_{G6PD} sem ligante = $0,28 \pm 0,02$, obtido experimentalmente), em comparação com um

aumento de K_{G6PD} de 7-8% nos ensaios anteriores (Figuras 4.13 e 4.14), a teoria não foi capaz de estimar quantitativamente o coeficiente de partição da G6PD em sistema micelar de duas fases aquosas contendo *procion red* como ligante de afinidade.

A falha do modelo teórico em estimar o coeficiente de partição de G6PD na presença de *procion red* reforça a idéia de que este composto esteja pouco acessível para a ligação com a enzima, encontrando-se associado às micelas formadas devido à interação com as moléculas de tensoativo $C_{10}E_4$. De acordo com o modelo, a contribuição de afinidade para o coeficiente de partição é função da concentração de inibidor *livre* na fase superior ($[I]_t$). Porém, a metodologia analítica para determinação da concentração dos inibidores não leva em conta o fato de os mesmos estarem ou não associados a moléculas de tensoativo. Uma possibilidade de aprimoramento do modelo proposto seria então a incorporação da interação tensoativo-inibidor. Neste sentido, a constante de inibição da G6PD seria considerada pura, independente da concentração de tensoativo ($K_i = K_{i,t} = K_{i,b}$), sendo que se quantificando a interação tensoativo-inibidor seria possível determinar a concentração real de inibidor livre em cada fase ($[I]_t$ e $[I]_b$) e, conseqüentemente, a contribuição de afinidade para o coeficiente de partição, de acordo com a equação seguinte, derivada da equação (4.10):

$$K_p^{aff} = \frac{K_i + [I]_t}{K_i + [I]_b} \quad (4.19)$$

No presente trabalho, a interação tensoativo-inibidor não foi quantificada durante a realização dos ensaios analíticos. Portanto, a aplicabilidade da equação (4.19) para estimar a contribuição de afinidade ao valor de coeficiente de partição obtido na presença de inibidores enzimáticos não pôde ser verificada. Ensaios adicionais de medida de constante de ligação tensoativo-inibidor devem ser realizados para que se possa validar a equação (4.19).

4.5. Conclusões

A partição das enzimas UK e G6PD em sistema micelar de duas fases aquosas contendo inibidores como ligantes de afinidade livres em solução foi estudada.

Para a enzima UK, foi utilizado o inibidor competitivo p-aminobenzamidina como ligante de afinidade. Os estudos de partição da p-aminobenzamidina em sistema $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas mostraram que este componente se distribuiu uniformemente entre as fases superior e inferior formadas, não interagindo com as micelas. Como consequência, a utilização do ligante de afinidade na partição da UK em sistema $C_{10}E_4$ /tampão não alterou o perfil de partição da enzima, sendo obtidos valores de coeficiente de partição iguais (considerando-se o erro experimental) na presença ou não da p-aminobenzamidina.

Para a enzima G6PD, foram utilizados os inibidores *cibacron blue* e *procion red* como ligantes de afinidade. Os estudos de partição dos ligantes em sistema $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas mostraram que estas substâncias apresentam partição preferencial para a fase superior, rica em micelas, devido a interações com as micelas. A utilização dos ligantes de afinidade na partição da G6PD em sistema $C_{10}E_4$ /tampão proporcionou um pequeno aumento nos valores de coeficiente de partição obtidos. Apesar de terem sido obtidos valores de K_{G6PD} inferiores a 1, os resultados apresentados neste trabalho utilizando-se sistema micelar de duas fases aquosas comparam-se favoravelmente aos resultados encontrados na literatura para sistemas poliméricos de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade. Aumentos no coeficiente de partição de 0,005 para somente 0,03 com a utilização de corantes do tipo triazina como ligantes de afinidade em sistemas PEG/fosfato são encontrados na literatura (BHIDE *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1992).

O fato de os ligantes de afinidade *cibacron blue* e *procion red* livres em solução influenciarem pouco a partição da G6PD em sistema $C_{10}E_4$ /tampão indica a possibilidade de que estes compostos estejam pouco acessíveis para a ligação com a enzima. A estrutura química destes

corantes lhes confere propriedades tensoativas, portanto os mesmos devem interagir com as moléculas de tensoativo $C_{10}E_4$ podendo se posicionar na "interface" entre as cabeças polares de óxido de etileno e as caudas apolares da micela de $C_{10}E_4$, dificultando a formação de complexo enzima-ligante. Além disso, o modelo teórico utilizado para estimar o coeficiente de partição da G6PD em sistemas micelares de duas fases aquosas contendo inibidores enzimáticos como ligantes de afinidade não foi capaz de prever quantitativamente K_{G6PD} na presença de *procion red*, devido às interações deste ligante com as micelas presentes no sistema.

A possibilidade de síntese de *tensoativos de afinidade*, pela ligação covalente dos ligantes à cabeça de um tensoativo não-iônico, de forma a favorecer a interação enzima-inibidor, apresenta-se como uma alternativa interessante a ser estudada para aumentar o coeficiente de partição das enzimas.

CAPÍTULO V

PURIFICAÇÃO DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE PRESENTE EM HOMOGENEIZADO DE *S. cerevisiae* UTILIZANDO-SE SISTEMAS MICELARES DE DUAS FASES AQUOSAS

Carlota O. Rangel-Yagui¹, Daniel Blankschtein² e
Adalberto Pessoa-Jr¹

¹ Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica /FCF, Universidade
de São Paulo, São Paulo, Brasil

²Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of
Technology, Cambridge, MA, USA

Palavras Chaves: glicose-6-fosfato desidrogenase, sistema micelar misto de
duas fases aquosas, purificação de proteínas, interações eletrostáticas,
Saccharomyces cerevisiae.

Endereço do autor para correspondência:
Adalberto Pessoa Junior
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 16
CEP: 05508-950 – São Paulo, SP.
Tel: (11) 3091-3710
Fax: (11) 3094-3694
e-mail: pessoajr@usp.br

* Artigo submetido para publicação no periódico Revista Brasileira de
Ciências Farmacêuticas – *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Este capítulo apresenta estudos iniciais de purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) presente em homogeneizado celular de *S. cerevisiae* em sistema micelar *misto* (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas. Foi estudada a purificação da G6PD presente em homogeneizado de *S. cerevisiae* em sistema micelar formado pelo tensoativo não-iônico óxido de n-deciltetraetileno ($C_{10}E_4$) adicionado do tensoativo catiônico brometo de deciltrimetilamônio ($C_{10}TAB$). Um sistema de purificação em dois estágios, sendo o primeiro constituído de sistema micelar não-iônico ($C_{10}E_4$) de duas fases aquosas e o segundo de sistema micelar *misto* ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$) de duas fases aquosas foi aplicado para a purificação de G6PD de *S. cerevisiae*.

5.1. Introdução

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (EC 1.1.1.49), primeira enzima da via das pentoses, catalisa a oxidação de glicose-6-fosfato utilizando NADP^+ ou NAD^+ gerando pentoses para a síntese de nucleotídeos, assim como NADPH/NADH para utilização em biossínteses redutivas e proteção contra stress oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998; ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994). Esta enzima apresenta grande interesse como reagente analítico, sendo utilizada em vários ensaios quantitativos incluindo a determinação de atividade de creatina-quinase para diagnóstico de doenças cardíacas e de músculo esquelético, medidas de concentração de hexoses, e marcador de enzima imunoensaios (LOJUDICE *et al.*, 2001). Como biossensor, a G6PD pode monitorar rapidamente a concentração de glicose-6-fosfato no sangue com menor custo e consumo de tempo do que os métodos tradicionais como cromatografia e espectroscopia (BASSI *et al.*, 1999).

A G6PD é particularmente abundante em *Saccharomyces cerevisiae*, um microorganismo bastante utilizado para obtenção de produtos de interesse nas indústrias farmacêutica e de alimentos (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1997). A levedura *S. cerevisiae* tem representado o ponto central na evolução da microbiologia, bioquímica e genética, inclusive no desenvolvimento de novos processos microbianos, e tornou-se um microorganismo modelo em genética e biologia molecular, culminando com seu completo sequenciamento (ENTIAN, 1997).

A purificação industrial da enzima G6PD tem sido feita através de processos de múltiplas etapas, os quais envolvem técnicas de custo elevado como cromatografia de afinidade e cromatografia de troca-iônica (CHAMPLUVIER, KULA, 1992; CHANG, CHASE, 1996; CHANG *et al.*, 1995; MCCREATH *et al.*, 1995). A extração líquido-líquido, por sua vez, tem sido considerada uma técnica promissora no campo de purificação de proteínas, sendo que bioseparações têm sido conduzidas em diferentes tipos de sistemas de duas fases aquosas compostos por fluidos complexos (ALBERTSSON, 1956; BORDIER, 1982; JOHANSSON *et al.*, 1996, 1999;

KAMEI *et al.*, 2002a; SIVARS, TJERNELD, 2000; SIVARS *et al.*, 2000). Particularmente, os sistemas micelares de duas fases aquosas apresentam uma série de características únicas e desejáveis, incluindo a natureza auto-associativa das micelas, que permite o controle e a otimização da partição através do ajuste das características micelares, e a capacidade das micelas de oferecerem simultaneamente ambientes hidrofílico e hidrofóbico aos solutos, permitindo maior seletividade na partição de acordo com a hidrofobicidade da biomolécula (LIU *et al.*, 1996). Neste sentido, RANGEL-YAGUI *et al.* (2003) recentemente demonstraram que atrações eletrostáticas entre a G6PD pura, negativamente carregada em pH 7.2, e micelas mistas de $C_{10}E_4$ (óxido de *n*-deciltetraetileno) e $C_{10}TAB$ (brometo de deciltrimetilamônio), positivamente carregadas, podem ser exploradas para aumentar a seletividade na partição de G6PD em sistema micelares de duas fases aquosas.

O sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão) apresenta uma única fase micelar, homogênea, que pode se separar em uma fase superior, rica em micelas, e uma fase inferior, pobre em micelas, com o aumento da temperatura. Todas as micelas presentes no sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão são micelas mistas, compostas tanto pelo tensoativo $C_{10}E_4$ quanto pelo tensoativo $C_{10}TAB$. Essas micelas mistas ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$) positivamente carregadas devem influenciar o perfil de partição da qualquer proteína carregada. Especificamente, a enzima G6PD que possui uma carga global negativa em pH neutro deve ser atraída eletrostaticamente para a fase superior, rica em micelas mistas positivamente carregadas.

Neste trabalho, a partição da enzima G6PD presente em homogeneizado celular de *S. cerevisiae* utilizando-se sistemas micelares mistos de duas fases aquosas compostos pelo tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ e pelo tensoativo catiônico $C_{10}TAB$ foi estudada. A purificação de G6PD obtida de *S. cerevisiae* utilizando-se sistema micelar de duas fases aquosas apresenta uma possibilidade real de redução significativa dos custos de produção desta enzima. Como este trabalho constitui o primeiro esforço no sentido de purificação da enzima G6PD proveniente de homogeneizado

celular utilizando-se sistema micelar misto de duas fases aquosas, optou-se por, inicialmente, utilizar como fonte de enzima um homogeneizado celular de *S. cerevisiae* adicionado de uma quantidade conhecida de enzima na forma pura. Deste modo, a relação entre o número de moléculas de enzima e o número de moléculas de tensoativo catiônico previamente estudada (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003) foi mantida.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Materiais

O tensoativo não-iônico óxido de *n*-deciltetraetileno ($C_{10}E_4$, lote no. 6011) foi adquirido da Nikko Chemicals (Tóquio, Japão). O tensoativo catiônico brometo de *n*-deciltrimetilamônio ($C_{10}TAB$, lote no. OGI01) foi obtido da TCI-America (Portland, OR). A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase pura de *Leuconostoc mesenteroides* (lote no. 50K8612), a glicose-6-fosfato (lote no. 40K7014), e o fosfato de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NADP⁺, lote no. 80K7046) foram todos obtidos da Sigma (St. Louis, MO). As células de *S. cerevisiae* foram obtidas a partir de fermento prensado comercial (Fleischmann®). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em tampão de McIlvaine pH 7,2, consistindo de 16,4 mM de fosfato de sódio dibásico e 1,82 mM de ácido cítrico. Faz-se exceção ao homogeneizado celular de *S. cerevisiae*, o qual foi preparado utilizando-se tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Foi utilizada água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Toda a vidraria utilizada nos experimentos foi lavada em um banho de hidróxido de sódio 1 M em solução alcoólica a 50%, seguido de um banho de ácido nítrico 1 M, enxaguada abundantemente com água Milli-Q, e finalmente seca em estufa a 90 °C.

5.2.2. Determinação da Concentração de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A determinação da concentração de G6PD no sistema, antes e após a separação de fases, foi baseada no ensaio enzimático (BERGMEYER, 1983), com algumas modificações devido às condições dos experimentos de partição. Desta forma, o Tampão Mcllvaine foi utilizado ao invés de tampão Tris-HCl e a temperatura foi diminuída de 37 °C para 15 °C para prevenir a ocorrência de turbidez/separação durante a medida de atividade. A concentração de G6PD foi considerada proporcional à atividade enzimática, medida determinando-se a velocidade de formação de NADPH, o qual absorve em comprimento de onda U.V. a 340 nm (coeficiente de extinção molar $E = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma unidade de G6PD (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de NADP^+ por minuto, nas condições de ensaio. As concentrações de cada reagente na cubeta espectrofotométrica foram: 900 μL de tampão Mcllvaine pH 7,2, 20 μL de solução de glicose-6-fosfato 250 mM, 5 μL de solução de NADP^+ 131 mM e 20 μL de amostra contendo G6PD a ser determinada. O aumento de absorbância foi acompanhado por 50 segundos, logo após adição da amostra, em aparelho espectrofotômetro Beckmann DU-640.

5.2.3. Determinação da Concentração Total de Proteínas

A concentração total de proteínas no sistema, antes e após a separação de fases, foi determinada pelo método de BCA (SMITH *et al.*, 1985). Este método baseia-se na reação das ligações peptídicas e cadeias laterais dos aminoácidos cistina, cisteína, triptofano e tirosina com o Cu^{2+} em solução alcalina, reduzindo-o a Cu^+ . O Cu^+ , por sua vez, forma um complexo solúvel em água com duas moléculas de BCA (ácido bicinconínico), de cor púrpura e que absorve fortemente a 562 nm. Portanto, em um tubo de ensaio foram adicionados 50 μL da amostra contendo proteínas e 1 mL do reagente de BCA, preparado a fresco pela mistura, na proporção de 1:50, de solução de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 4% com solução constituída de 1% de BCA sódico, 0,16% de tartarato de sódio, 0,4% de hidróxido de sódio

(NaOH) e 0,95% de bicarbonato de sódio (pH 11,25, ajustado com NaOH). O tubo foi então incubado a 37 °C por 30 minutos. Após este período, o tubo foi resfriado à temperatura ambiente e a absorbância da solução lida a 562 nm, em espectrofotômetro Beckmann DU-640, utilizando-se água deionizada como branco. A concentração total de proteínas na amostra foi então obtida a partir de curva de calibração construída com base em soluções de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações variando de 20 a 2000 mg/L.

5.2.4. Preparação do Homogeneizado Celular de *S. cerevisiae* adicionado de G6PD pura

Inicialmente, realizou-se o rompimento das células de *S. cerevisiae*. Para isto, 4 g de fermento comercial prensado foram lavados com 50mL de tampão Tris-HCl e centrifugados por 25 minutos a 6 °C e 3328 g, em centrífuga refrigerada (JOUAN – BR 4i). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de tampão Tris-HCl adicionado de cloreto de magnésio (MgCl₂) 5 mM, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,2 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, ácido aminocapróico 2 mM e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) 1 mM. As células em suspensão foram então rompidas por tratamento em vórtice (Phoenix AP56, Araraquara) na presença de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro), mantendo-se a proporção de 5 mL de suspensão celular para 7,45 g de pérolas de vidro. O rompimento foi realizado durante um tempo total de 12 minutos, intercalando-se entre agitação e imersão em banho de gelo a cada 30 segundos. As pérolas de vidro e parte dos fragmentos celulares foram removidos por centrifugação a 3328 g e 6 °C durante 25 minutos. Para maior remoção de fragmentos celulares, o sobrenadante obtido foi novamente centrifugado a 17000 g e 6 °C durante 25 minutos, sendo que o sobrenadante resultante desta centrifugação final consistiu no homogeneizado celular de *S. cerevisiae*.

O homogeneizado celular de *S. cerevisiae* obtido foi então adicionado de uma solução estoque de G6PD pura a 0,0488% (p/p), na proporção de 55

partes de solução de enzima pura para 45 partes de homogeneizado celular. Portanto, um homogeneizado celular de *S. cerevisiae* contendo 0,0271% (p/p) de G6PD pura foi obtido.

5.2.5. Preparação do Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

Os sistemas micelares de duas fases aquosas foram preparados em tubos de ensaio graduados de 10 mL, pela adição de C₁₀E₄, C₁₀TAB e homogeneizado celular de *S. cerevisiae* contendo G6PD nas quantidades desejadas em tampão McIlvaine, resultando em um sistema de volume total de 3 mL. O homogeneizado celular de *S. cerevisiae* contendo G6PD foi adicionado ao sistema em uma quantidade tal que fornecesse uma concentração aproximada de 0,0068% (p/p) de G6PD pura. A concentração de enzima utilizada foi baseada nos resultados prévios obtidos para a partição de G6PD pura em sistema C₁₀E₄/C₁₀TAB/tampão (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003), dado que a desnaturação da enzima pela presença do tensoativo catiônico depende da proporção enzima – tensoativo. Todos os componentes do sistema foram adicionados por pesagem, homogeneizados manualmente e equilibrados a 4 °C de modo a exibir uma única fase límpida e homogênea. Em seguida, as soluções foram transferidas para um banho de temperatura controlada, previamente ajustado para o valor desejado, e mantidas em repouso por 3 horas para obtenção da separação de fases e equilíbrio das mesmas. Experimentos preliminares mostraram que o perfil de partição da G6PD após 3 horas de repouso é o mesmo que o observado após 21 horas de repouso, justificando o tempo escolhido (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003). Após o repouso, o volume das fases superior e inferior foi medido e amostras das duas fases foram cuidadosamente retiradas, com auxílio de seringa e agulha, para análise de atividade enzimática conforme descrito no Item 5.2.2 e concentração total de proteínas conforme descrito no Item 5.2.3. Cada experimento de partição de homogeneizado celular de *S. cerevisiae* contendo G6PD foi realizado em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança foram calculados.

5.2.5.1. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas em Dois Estágios

Um processo de purificação da G6PD em dois estágios foi realizado. Neste processo, primeiramente a G6PD foi purificada através da partição em um sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas. Neste sistema a G6PD, migra preferencialmente para a fase inferior, pobre em micelas, na qual existe um maior volume livre disponível. Em sequência, a fase inferior deste sistema foi coletada, com auxílio de seringa e agulha, e a partir da mesma um novo sistema micelar foi preparado, sendo este um sistema micelar misto de duas fases aquosas ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão). Neste segundo estágio, a enzima G6PD migra preferencialmente para a fase superior, rica em micelas mistas positivamente carregadas, devido às interações eletrostáticas. Os sistemas micelares correspondentes a ambos os estágios foram preparados conforme descrito acima. A Figura 5.1 apresenta um esquema do processo de purificação em dois estágios.

FIGURA 5.1 – Representação esquemática do processo de purificação em dois estágios, sendo o primeiro constituído de sistema micelar não-iônico ($C_{10}E_4$) de duas fases aquosas e o segundo de sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$) de duas fases aquosas, aplicado para a purificação de G6PD presente em homogeneizado de *S. cerevisiae*.

5.2.6. Parâmetros de Extração Analisados

Os resultados obtidos foram analisados a princípio em termos de coeficiente de partição, K_p , o qual pode ser expresso por:

$$K_p \equiv \frac{C_{p,t}}{C_{p,b}} \quad (5.1)$$

em que $C_{p,t}$ e $C_{p,b}$ correspondem às concentrações de proteínas nas fases superior (*top* - *t*) e inferior (*bottom* - *b*), respectivamente. Foram calculados tanto o coeficiente de partição da enzima G6PD, K_{G6PD} , quanto o coeficiente de partição das proteínas totais, K_p . Com os coeficientes de partição, um novo parâmetro, a seletividade (*S*) foi calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$S = \frac{K_{G6PD}}{K_p} \quad (5.2)$$

Os balanços de massa para proteínas totais e G6PD foram calculados de acordo com a expressão:

$$BM = \frac{C_t V_t + C_b V_b}{C_i V_i} \times 100\% \quad (5.3)$$

em que C_t , C_b e C_i referem-se às concentrações do componente (proteínas totais ou G6PD) nas fases superior, inferior e na solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. V_t , V_b e V_i são os volumes da fases superior, inferior e da solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. No caso da G6PD, como a determinação de concentração é feita por medida de atividade enzimática, adotou-se o termo balanço de atividade (*BA*).

Além do coeficiente de partição, a eficiência do sistema em partição da G6PD também foi avaliada com base no valor de rendimento de G6PD na fase do sistema na qual a enzima foi recuperada (Y_{G6PD}), sendo Y_{G6PD} definido a seguir:

$$Y_{G6PD} = \frac{C_{G6PD,x} V_t}{C_{G6PD,i} V_i} \times 100\% \quad (5.4)$$

em que $C_{G6PD,x}$ e $C_{G6PD,i}$ correspondem às concentrações de G6PD na fase de interesse do sistema (superior, t , ou inferior, b) e na solução de enzima inicialmente adicionada ao sistema. Por fim, o fator de purificação (f_p) resultante da extração por sistema micelar de duas fases aquosas foi calculado, de acordo com a seguinte equação:

$$f_p = \frac{A_{e,x}}{A_{e,i}} \quad (5.5)$$

em que $A_{e,x}$ e $A_{e,i}$ correspondem aos valores de atividade específica na fase x (superior, t , ou inferior, b) do sistema e na solução de enzima inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente, sendo a atividade específica definida por:

$$A_e = \frac{C_{G6PD}}{C_p} \quad (5.6)$$

em que C_{G6PD} corresponde à concentração de G6PD e C_p corresponde à concentração de proteínas totais.

5.3. Resultados e Discussão

Inicialmente, a purificação de G6PD presente em homogeneizado de *S. cerevisiae* foi estudada utilizando-se um sistema micelar misto $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão de duas fases aquosas a 30 °C, com uma concentração total de tensoativos de 128 mM e composição da solução de $\alpha_{sol} = 0,06$, de acordo com RANGEL-YAGUI *et al.* (2003). A composição da solução representa a fração molar de tensoativo catiônico na solução, ou seja, $\alpha_{sol} = [C_nTAB]/([C_nTAB]+[C_{10}E_4])$. Os resultados obtidos para este ensaio estão expressos na Tabela 5.1.

TABELA 5.1 – Resultados de coeficientes de partição de G6PD (K_{G6PD}) e de proteínas totais (K_P), balanço de atividade de G6PD (BA_{G6PD}), balanço de massa de proteínas totais (BM_P), rendimento de G6PD na fase superior (Y_{G6PD}), seletividade (S) e fator de purificação (f_p), para o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão de duas fases aquosas utilizando-se $T = 30,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, concentração total de tensoativos de 128 mM e $\alpha_{sol} = 0,06$.

K_{G6PD}	K_P	BA_{G6PD}	BM_P	Y_{G6PD}	S	f_p
$1,91 \pm 0,05$	$1,25 \pm 0,1$	$86\% \pm 1$	$101\% \pm 7$	48%	1,55	1,05

De acordo com os resultados na Tabela 5.1, a G6PD presente em homogeneizado celular de *S. cerevisiae* apresentou partição preferencial para a fase superior do sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão, rica em micelas mistas positivamente carregadas, resultando em um coeficiente de partição de 1,91. Porém, como o balanço de atividade de G6PD foi de 86%, um rendimento da enzima na fase superior, Y_{G6PD} , de somente 48% foi observado. Apesar de ter sido obtido um valor de K_{G6PD} superior a 1, as proteínas totais presentes no sistema também apresentaram partição preferencial para a fase superior, com um coeficiente de partição $K_P = 1,25$. Conseqüentemente, a seletividade do sistema foi baixa e um fator de purificação de apenas 1,05 (correspondendo a 5% de aumento de pureza) foi observado. É importante destacar que, de acordo com as determinações de concentração de proteínas totais e G6PD, esta última correspondeu a aproximadamente 3% das proteínas totais, contribuindo para o valor de K_P .

A presença de diversas proteínas e outros componentes celulares no homogeneizado de *S. cerevisiae* causou uma diminuição no valor de K_{G6PD} obtido, em comparação com o obtido previamente com a partição da enzima pura ($K_{G6PD} = 7,7$) (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003). Esta diminuição pode ser explicada pela presença de proteínas e outras moléculas no sistema, que não a G6PD, apresentando carga efetiva negativa. Desta forma, o coeficiente de partição da G6PD passa a depender também da intensidade das forças atrativas entre estas moléculas e as micelas positivamente carregadas. Além disso, no homogeneizado celular a carga efetiva da G6PD pode diferir da carga efetiva da enzima isolada, devido a interações com

outras moléculas. A presença do homogeneizado celular também causou alterações na curva binodal referente a esse sistema, apresentada por RANGEL-YAGUI *et al.* (2003), o que pode ser comprovado pelo valor de $R = V_t/V_b$ obtido, sendo V_t e V_b os volumes das fases superior e inferior do sistema, respectivamente. No presente ensaio, um valor de R de 0,67 foi obtido, sendo que, segundo a curva binodal que caracteriza o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão na temperatura utilizada, um valor de $R = 1,0$ deveria ocorrer.

O valor de K_P obtido (1,25) indica que diversas proteínas foram atraídas para a fase superior, rica em micelas positivamente carregadas. No sistema estudado, tanto proteínas com características mais hidrofóbicas quanto proteínas hidrofílicas negativamente carregadas apresentam partição preferencial para a fase superior, rica em micelas. No caso das proteínas hidrofóbicas, as mesmas podem se posicionar no interior das micelas em contato com as caudas apolares dos tensoativos. As proteínas hidrofílicas de carga efetiva negativa, por sua vez, são atraídas eletrostaticamente para a fase superior devido à carga global positiva das micelas. Com base no comportamento observado para as proteínas em sistema micelar $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão, um novo ensaio de partição foi realizado, porém em dois estágios.

Inicialmente, foi realizada a partição do homogeneizado celular de *S. cerevisiae* contendo G6PD em um sistema micelar não-iônico de duas fases aquosas ($C_{10}E_4$ /tampão), de forma a favorecer a partição das proteínas mais hidrofóbicas para a fase superior, rica em micelas não-carregadas. Neste sistema, as proteínas hidrofílicas, incluindo a G6PD, migram preferencialmente para a fase inferior, pobre em micelas, na qual existe um maior volume livre disponível. Em outras palavras, as proteínas hidrofílicas migram para a fase inferior do sistema por efeito de volume de exclusão (NIKAS *et al.*, 1992; LUE, BLANKSCHTEIN, 1996). Em seqüência, a fase inferior deste sistema foi coletada e a partir da mesma um novo sistema micelar foi preparado, porém um sistema micelar misto de duas fases aquosas ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão). A enzima G6PD foi então recuperada na

recuperada na fase superior do sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão, bem como outras proteínas de carga efetiva negativa, devido às interações eletrostáticas com as micelas positivamente carregadas. A Tabela 5.2 apresenta os resultados obtidos para a extração de G6PD presente em homogeneizado celular de *S. cerevisiae* por sistemas micelares de duas fases aquosas em dois estágios.

TABELA 5.2 – Resultados de coeficientes de partição de G6PD (K_{G6PD}) e de proteínas totais (K_P), balanço de atividade de G6PD (BA_{G6PD}), balanço de massa de proteínas totais (BM_P), rendimento de G6PD na fase inferior do sistema micelar não-iônico ou superior do sistema micelar misto (Y_{G6PD}), seletividade (S) e fator de purificação (f_p), para o processo de purificação de G6PD presente em homogeneizado celular de *S. cerevisiae* realizado em dois estágios.

	ESTÁGIO I	ESTÁGIO II	
	$C_{10}E_4$/tampão	$C_{10}E_4/C_{10}TAB$/tampão	Resultado Global
	3 % $C_{10}E_4$, T = 21,0°C	$X_T = 128$ mM, T = 30°C	
R	0,31	0,76	-
K_{G6PD}	0,35 ± 0,07	3,82 ± 0,04	-
K_P	0,48 ± 0,08	1,38 ± 0,06	-
BA_{G6PD}	100%	87% ± 3	87% ± 3
BM_P	93% ± 5	106% ± 7	99% ± 9
Y_{G6PD}	90% ± 3	65% ± 5	59 % ± 6
S	0,73	2,77	3.78 ^a
f_p	1,1	1,2	1,3

^a valor calculado pela multiplicação do inverso de S no estágio I por S no estágio II, dado que a G6PD é recuperada na fase inferior do estágio I

De acordo com a Tabela 5.2, no primeiro estágio do processo de purificação (Sistema I), a enzima G6PD migrou preferencialmente para a fase inferior do sistema, sendo observado um coeficiente de partição de 0,35. No entanto, a maior parte das proteínas também migrou preferencialmente para a fase inferior do sistema, sendo obtido um coeficiente de partição de proteínas totais $K_P = 0,48$. Apesar de ter sido obtido um valor de K_P baixo, o mesmo foi superior ao K_{G6PD} , mostrando que

houve partição preferencial de determinadas proteínas, de caráter mais hidrofóbico, para a fase superior do sistema. Neste primeiro estágio, um fator de purificação de 1,1 foi obtido, sendo a seletividade $S = 0,73$. O valor de seletividade inferior a 1, ocorre pois nesse sistema, a G6PD migra preferencialmente para a fase inferior de forma mais acentuada que o total de proteínas. Nesse sentido, para o sistema $C_{10}E_4$ /tampão quanto menor o valor de S , mais seletivo é o processo. Balanços de atividade de G6PD e de massa de proteínas totais de 100%, considerando-se o erro experimental, foram obtidos neste primeiro estágio do processo de purificação. Para este primeiro estágio, um rendimento em G6PD na fase inferior do sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão $Y_{G6PD} = 90\%$ foi obtido.

No segundo estágio do processo de purificação (Tabela 5.2), um coeficiente de partição da enzima G6PD de 3,82 foi obtido, mostrando que a mesma foi atraída para a fase superior, rica em micelas $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ positivamente carregadas. O coeficiente de partição de proteínas totais, por sua vez, foi de 1,38. Portanto, neste sistema a G6PD migrou preferencialmente para a fase superior de forma mais acentuada do que o total de proteínas. Conseqüentemente, um fator de purificação de 1,2 foi obtido, sendo o segundo estágio do processo de purificação mais seletivo, com um valor de $S = 2,77$. Neste segundo estágio, as proteínas de carga efetiva positiva foram separadas da G6PD, por apresentarem partição preferencial para a fase inferior do sistema devido à repulsão eletrostática existente entre estas proteínas e as micelas positivamente carregadas, predominantes na fase superior do sistema. O balanço de massa de proteínas totais neste segundo estágio do processo de purificação foi de 100%, considerando-se o erro experimental. O balanço de atividade de G6PD, por sua vez, foi de 87%, devido a um certo grau de desnaturação da enzima pela presença do tensoativo catiônico $C_{10}TAB$ no sistema. Neste segundo estágio do processo de purificação, um rendimento em G6PD na fase superior do sistema micelar $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão $Y_{G6PD} = 65\%$ foi obtido. Um valor de R de 0,76 foi observado para o segundo estágio sendo que, como mencionado anteriormente, segundo a curva binodal que

caracteriza o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão na temperatura utilizada, um valor de $R = 1,0$ deveria ocorrer. Novamente, a presença do homogeneizado celular causou alterações na curva binodal. No entanto, o valor de R observado encontra-se mais próximo do valor esperado com base na curva binodal do que o observado no processo de purificação direta por sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão) de duas fases aquosas ($R = 0,67$), o que sugere a presença de menos contaminantes neste segundo estágio do processo de purificação em dois estágios.

De acordo com os resultados globais do processo em dois estágios apresentados na Tabela 5.2, um fator de purificação de 1,3 foi obtido ao fim do processo de purificação, correspondendo a um valor de seletividade de 3,78. O processo de purificação em dois estágios resultou em um valor de recuperação de G6PD global, Y_{G6PD} , de 59%. Estes resultados mostram-se superiores aos resultados obtidos na purificação de G6PD presente em homogeneizado de *S. cerevisiae* em sistema micelar misto $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão, apresentados na Tabela 5.1. A Tabela 5.3 apresenta uma comparação entre os valores de coeficiente de partição e rendimento em G6PD obtidos para a enzima pura e a partir de homogeneizado de *S. cerevisiae* contendo a enzima, utilizando-se sistema micelar misto $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão e o processo de purificação em dois estágios apresentado.

TABELA 5.3 – Comparação entre os valores de coeficiente de partição (K_{G6PD}) e rendimento em G6PD (Y_{G6PD}) obtidos para a G6PD pura e a partir de homogeneizado de *S. cerevisiae* contendo G6PD, utilizando-se sistema micelar misto $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão e o processo de purificação em dois estágios.

FONTE DE G6PD	PROCESSO UTILIZADO	K_{G6PD}	Y_{G6PD} (%)
Enzima pura	sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão	7,7	71
Homogeneizado de <i>S. cerevisiae</i>	sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão	1,91	48
	purificação em dois estágios:		
Homogeneizado de <i>S. cerevisiae</i>	I - $C_{10}E_4$ /tampão	I - 0,35	59
	II - $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão	II - 3,82	

Portanto, com base na Tabela 5.3, pode-se afirmar que o processo de purificação em dois estágios apresenta-se como alternativa mais adequada e promissora para a purificação de G6PD proveniente de homogeneizado celular de *S. cerevisiae*. Neste processo, primeiro a G6PD é purificada da presença de proteínas e outros componentes de caráter mais hidrofóbico, através da partição em um sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas. Em um segundo estágio, a G6PD é purificada da presença de proteínas e outros componentes de carga efetiva positiva, através da partição em um sistema micelar misto $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão de duas fases aquosas. Estudos posteriores utilizando homogeneizado celular de *S. cerevisiae* sem adição de enzima pura, ou seja, somente com a enzima proveniente do rompimento do microrganismo, devem ser realizados. Estes estudos são importantes não só para obtenção de valores reais de S e f_p no caso de purificação da enzima proveniente do microrganismo, mas também para determinação da concentração adequada de homogeneizado a ser adicionada no sistema de modo a permitir separação de fases e ao mesmo tempo minimizar a desnaturação da enzima G6PD.

Futuramente, a variação da temperatura de extração utilizada no primeiro estágio do processo de purificação (sistema $C_{10}E_4$ /tampão) deve ser estudada. O aumento da temperatura de extração é proporcional ao aumento da diferença de concentração de tensoativo não iônico entre as fases superior e inferior, ou seja, quanto maior a temperatura empregada, maior a concentração de tensoativo na fase superior em comparação com a fase inferior (LIU *et al.*, 1995, 1996). Desta forma, a utilização de temperaturas mais altas levaria a uma partição mais extrema da G6PD para a fase inferior do sistema, devido a interações do tipo volume de exclusão mais acentuadas. A variação do valor de R ($R=V_t/V_b$) também deve ser explorada no sentido de se otimizar o processo de purificação da enzima G6PD em sistema micelar de duas fases aquosas em dois estágios. Neste sentido, um sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão (primeiro estágio) com um valor de R mais baixo fornecerá uma recuperação do total de G6PD na fase inferior do sistema maior, sendo que no segundo estágio, um valor de R

mais baixo fornecerá uma possibilidade de concentração da enzima, devido ao volume reduzido da fase superior do sistema na qual a G6PD é recuperada.

5.4. Conclusão

A purificação da G6PD presente em homogeneizado de *S. cerevisiae* em sistema micelar formado pelo tensoativo não-iônico óxido de n-deciltetraetileno ($C_{10}E_4$) adicionado do tensoativo catiônico brometo de deciltrimetilamônio ($C_{10}TAB$) foi estudada. A G6PD presente no homogeneizado celular de *S. cerevisiae* apresentou partição preferencial para a fase superior do sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão, rica em micelas mistas positivamente carregadas, resultando em um coeficiente de partição de 1,91 e uma recuperação da enzima na fase superior de 48%. Apesar de ter sido obtido um valor de K_{G6PD} superior a 1, as proteínas totais presentes no sistema também apresentaram partição preferencial para a fase superior, com um coeficiente de partição $K_P = 1,25$. Conseqüentemente, um fator de purificação de apenas 1,05 (correspondendo a 5% de aumento de pureza) foi observado.

Um sistema de purificação em dois estágios, sendo o primeiro constituído de sistema micelar não-iônico ($C_{10}E_4$) de duas fases aquosas e o segundo de sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$) de duas fases aquosas foi aplicado para a purificação de G6PD presente em homogenizado de *S. cerevisiae*. Inicialmente, a G6PD foi purificada da presença de proteínas e outros componentes de caráter mais hidrofóbico, através da partição no sistema micelar $C_{10}E_4$ /tampão de duas fases aquosas e em seqüência, a G6PD foi purificada da presença de proteínas e outros componentes de carga efetiva positiva, através da partição no sistema micelar misto $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão de duas fases aquosas. Ao fim do processo de purificação, um rendimento em G6PD de 59% foi obtido, correspondendo a um fator de purificação de 1,3.

Portanto, o processo de purificação em dois estágios apresenta-se como alternativa mais adequada e promissora, dentre os sistemas

estudados, para a purificação de G6PD proveniente de homogeneizado celular de *S. cerevisiae*. Estudos posteriores utilizando homogeneizado celular de *S. cerevisiae* sem adição de enzima pura, ou seja, somente com a enzima proveniente do rompimento do microrganismo, devem ser realizados, com o intuito de otimizar a purificação da G6PD presente no homogeneizado celular e determinar a concentração adequada de homogeneizado a ser adicionada ao sistema de modo a permitir separação de fases e ao mesmo tempo minimizar a desnaturação da enzima G6PD.

CONCLUSÕES

Dada a estrutura desta tese, a maioria das conclusões a que se pôde chegar já se encontram enunciadas nos capítulos aos quais se referem. O texto apresentado a seguir consiste em um resumo delas.

A partição da enzima G6PD em sistema micelar de duas fases aquosas foi estudada. Nos experimentos realizados em sistema micelar formado pelo tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$, observou-se a expulsão da G6PD da fase superior (rica em micelas), para a fase inferior (pobre em micelas) refletida nos baixos valores de K_{G6PD} obtidos. Este fato deve-se às interações repulsivas estéricas, do tipo volume de exclusão, as quais direcionam proteínas hidrofílicas para a fase inferior do sistema, na qual o volume livre é maior.

A partição da enzima G6PD em sistemas micelares mistos (não-iônico/catiônico) de duas fases aquosas também foi estudada. Os coeficientes de partição de G6PD obtidos nos sistemas $C_{10}E_4/C_nTAB$ /tampão ($n = 8, 10$ e 12) foram no mínimo 2,5 vezes maiores que aqueles obtidos no sistema $C_{10}E_4$ /tampão correspondente, demonstrando que a enzima de carga efetiva negativa é eletrostaticamente atraída para a fase superior que contém um número maior de micelas mistas de $C_{10}E_4/C_nTAB$ positivamente carregadas. O sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão forneceu o melhor coeficiente de partição ($K_{G6PD} = 7,7$) dentre os sistemas estudados, acarretando em um aumento de 22 vezes na partição da G6PD para a fase superior quando comparado ao sistema $C_{10}E_4$ /tampão com o mesmo volume de exclusão, e em um rendimento de G6PD na fase superior de 71%.

A partição das enzimas UK e G6PD em sistema micelar de duas fases aquosas contendo inibidores enzimáticos como ligantes de afinidade livres em solução foi estudada. Apesar de não ter sido observado aumento no coeficiente de partição da enzima UK com o ligante de afinidade (partição uniforme do ligante entre as duas fases), e de o aumento do coeficiente de partição obtido para a G6PD ser pequeno, estudos posteriores devem ser realizados. A possibilidade de síntese de *tensoativos de afinidade*, pela

ligação covalente dos ligantes à cabeça de um tensoativo não-iônico apresenta-se como uma alternativa interessante a ser estudada, com o intuito de se aumentar o coeficiente de partição das enzimas. Os *tensoativos de afinidade* não somente causariam a concentração dos ligantes na fase superior, rica em micelas, mas também proporcionariam maior exposição dos ligantes covalentemente ligados às cabeças das moléculas de tensoativos (presentes na superfície das micelas) e, conseqüentemente, maior probabilidade de formação de complexo enzima-ligante.

Modelos teóricos foram desenvolvidos e utilizados para estimar o coeficiente de partição de G6PD nos diversos sistemas micelares de duas fases aquosas estudados. Os valores de K_{G6PD} estimados pelas teorias baseadas em interações por volume de exclusão e interações eletrostáticas apresentaram uma correlação quantitativa considerável com os valores obtidos experimentalmente, demonstrando a aplicabilidade dos modelos no direcionamento de estratégias de purificação de proteínas.

Com base nos estudos realizados com a enzima G6PD na forma pura, um sistema de purificação em dois estágios, sendo o primeiro constituído de sistema micelar não-iônico ($C_{10}E_4$) de duas fases aquosas e o segundo de sistema micelar misto ($C_{10}E_4/C_{10}TAB$) de duas fases aquosas foi aplicado para a purificação de G6PD presente em homogeneizado celular de *S. cerevisiae*. Um rendimento final de G6PD de 59% foi obtido, com um fator de purificação de 1,3. Concluindo, dentre as possibilidades estudadas, o processo de purificação em dois estágios proposto apresenta-se como alternativa mais adequada e promissora para a purificação de G6PD proveniente de homogeneizado celular de *S. cerevisiae*, bem como de outras fontes microbianas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAZA, M.S.; SHABAN, F.A.; NARAYAN, R.K.; ATASSI, M.Z. *In vitro* inhibition of human malignant brain tumour cell line proliferation by anti-urokinase-type plasminogen activator monoclonal antibodies. **Br. J. Cancer**, Sidcup, v.78, n.12, p.1578–1585, 1998.
- ABBOTT, N.L., BLANKSCHTEIN, D., HATTON, T.A. On protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. **Bioseparation**, Dordrecht, Neth. v.1, p.191-225, 1990.
- ABBOTT, N.L., BLANKSCHTEIN, D., HATTON, T.A. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. 1. Novel physical pictures and a scaling-thermodynamic formulation. **Macromolecules**, Washington, D.C., v.24, p.4334-4348, 1991.
- ABBOTT, N.L., BLANKSCHTEIN, D., HATTON, T.A. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. 2. On the free energy of mixing globular colloids and flexible polymers. **Macromolecules**, Washington, D.C., v.25, p.3917-3931, 1992.
- ABRAHÃO-NETO, J., INFANTI, P., VITOLO, M. Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose 6-phosphate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo, v.14, n.1, p.89-94, 1997.
- ALBERTSSON PÅ. Chromatography and partition of cells and cell fragments. **Nature**, v.177, p.771-774, 1956.
- ALBERTSSON PÅ. **Partition of cell particles and macromolecules**. 3ed. New York: Willey-Interscience, 1986. 346p.
- ALONSO, D., TEJERA, A., FARIAS, E., JOFFE, E., GOMEZ, D. Inhibition of mammary tumor cell adhesion, migration, and invasion by the selective synthetic urokinase inhibitor B428. **Anticancer Res.**, Athens, v.18, p.4499-4504, 1998.

- ALRED, P.A., KOZOLOWSKI, A., HARRIS, M., TJERNELD, F. Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.659, p.289-298, 1994.
- ALTIKAT, S., CIFTCI, M., BUYUKOKUROGLU, M.E. In vitro effects of some anesthetic drugs on enzymatic activity of human red blood cell glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Polish. J. Pharmacol.**, Krakow, v.54, n.1, p.67-71, 2001.
- ANGAL, S., DEAN, P.D.G. Effect of matrix on binding of albumin to immobilized cibacron blue. **Biochem. J.**, London, v.167, n.1, p.301-303, 1977.
- AU, S.W.N., GOVER, S., LAM, V.M.S., ADAMS, M.J. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. **Structure Fold Des.**, s.l., v.8, n.3, p.293-303, 2000.
- BALAGUER, P., TÉROUANNE, B., ELIAOU, J.F., HUMBERT, M., BOUSSIOUX, A.M., NICOLAS, J.C. Use of glucose-6-phosphate dehydrogenase as a new label for nucleic acid hybridization reactions. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.180, p.50-54, 1989.
- BASSI, A.S., TANG, D.Q., BERGOUGNOU, M.A. Mediated, amperometric biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6-phosphate dehydrogenase, Mg^{+2} ions, tetracyanoquinodimethane, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.268, n.2, p.223-228, 1999.-
- BERGMEYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. 3ed., v.2.. Wheinheim: Velag Chemie, 1983. p.190-197.
- BHIDE, A.A., PATEL, R.M., JOSHI, J.B., PANGARKAR, V.G. Affinity partitioning of enzymes using unbound triazine dyes in PEG/Phosphate system. **Separ. Sci. Technol.**, New York, v.30, n.15, p.2989-3000, 1995.
- BLANKSCHTEIN, D., THURSTON, G.M., BENEDEK, G.B. Theory of phase separation. **Phys. Rev. Lett.**, Ridge, v.54, n.9, p.955-958, 1985.
- BLANKSCHTEIN, D., THURSTON, G.M., BENEDEK, G.B. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. **J. Chem. Phys.**, Melville, v.85, p.7268-7288, 1986.
- BOCKRIS, J.O.M., REDDY, A.K.N. **Modern Electrochemistry**. New York: Plenum Press, v.1. 1970. 2V.

- BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.256, p.1604-1607, 1981.
- CAO, X.J., ZHU, J.W., WANG, D.W., WU, X.Y., DAI, G.C. Purification of urokinase by affinity cross-flow filtration using a water-soluble macroligand. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, New York, v.799, p.454-459, 1996.
- CARALE, T.R., BLANKSCHTEIN, D. Theoretical and experimental determinations of the crossover from dilute to semidilute regimes of micellar solutions. **J. Phys. Chem.**, Washington, D.C., v.96, p.459, 1992.
- CARDAMONE, M., PURI, N.K., SAWYER, W.H., CAPON, R.J., BRANDON, M.R. A spectroscopic and equilibrium binding analysis of cationic detergent-protein interactions using soluble and insoluble recombinant porcine growth hormone. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1206, p.71-82, 1994.
- CASTELLAN, G. **Fundamentos de Físico-Química**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1986, 527p.
- CHAMPLUVIER, B., KULA, M.R. Dye-ligand membranes as selective adsorbents for rapid purification of enzymes: a case study. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.40, p.33-40, 1992.
- CHANG, Y.K., CHASE, H.A. Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.49, n.2, p. 204-216, 1996.
- CHANG, Y.K., MCCREATH, G.E., CHASE, H.A. Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.48, p.355-366, 1995.
- CHATEL, S., VOIRIN, A., LUCIANI, A., ARTAUD, J. Starch identification and determination in sweetened fruit preparations. **J. Agric. Food. Chem.**, s.l., v.44, n.2, p.502-506, 1996.
- CHENG-KANG, L., WEN-DA, S.U. Separation of phenylacetic acid from 6-aminopenicillanic acid via cloud-point extraction with N-decyltetra(ethylene oxide) nonionic surfactant. **Sep. Sci. Technol.**, New York, v.33, n.7, p.1001-1012, 1998.
- CHEVALIER, Y., ZEMB, T. The structure of micelles and microemulsions. **Rep. Prog. Phys.**, Bristol, v.53, p.279-371, 1990.
- CHIANG, C.L. Separation of cholesterol esterase in cloud point extraction system. Separation of cholesterol esterase in cloud point extraction system. **J. Chin. Inst. Chem. Eng.**, s.l., v.30, n.2, p.171-176, 1999.

- CHIM, C.S., LAM, C., CHAN, T.K. Hemighost cell in acute hepatitis A: glucose-6-phosphate deficiency revisited. **Am. J. Med.**, New York, v.111, p.81, 2001.
- CLEMETSON, K.J., BIENZ, D., ZAHNO, M.L., LÜSCHER, E.F. Distribution of platelet glycoproteins and phosphoproteins in hydrophobic and hydrophilic phases in triton x-114 phase partition. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.778, p.463-469, 1984.
- COBAN, T.A.K., CIFTCI, M., KUFREVIOGLU, O.I. Purification and investigation of some kinetic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from parsley (*Petroselinum hortense*) leaves. **Prep. Biochem. Biotechnol.**, New York, v.32, n.2, p.173-187, 2002.
- COHEN, P., ROSEMEYER, M.A. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.8, p.8-15, 1969.
- CORDES, A., FLOSSDORF, J., KULA, M.R. Affinity partitioning: development of mathematical model describing behavior of biomolecules in aqueous two-phase systems. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.30, p.514-520, 1987.
- COSGROVE, M.S., TAYLOR, C., PALUDAN, S., ADAMS, M.J., LEVY, H.R. On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry**, Washington, D.C., v.37, p.2759-2767, 1998.
- ENTIAN, K. D. Sugar Phosphorylation in yeast. In: ZIMMERMANN, F. K. ENTIAN, K. D., eds. **Yeast sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications**. Lancaster: Technomic, 1997. P.67-79.
- FAHEY, E.M., CHAUDHURI, J.B., BINDING, P. Refolding of low molecular weight urokinase plasminogen activator by dilution and size exclusion chromatography - A comparative study. **Sep. Sci. Technol.**, New York, v.35, n.11, p.1743-1760, 2000.
- FRANKS, F. **Water**. London: The Royal Society of Chemistry, 1983. 96p.
- FREY, S.D., ELLIOTT, E.T., PAUSTIAN, K. Application of the hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymatic assay for measurement of glucose in amended soil. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v.31, n.6, p.933-935, 1999.
- GELAMO, E.L., TABAK, M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and serum (HSA) albumins with ionic surfactants. **Spectrochim. Acta A**, Amsterdam, v.56, p.2255-2271, 2000.

- GODDARD, E.D., ANANTHAPADMANABHAN, K.P. **Interactions of surfactants with polymers and proteins**. Boca Raton: CRC Press. 1993. 427p.
- GUZMAN, R., TORRES, J.L., CARBONELL, R.G., KILPATRICK, P.K.. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.33, n.10, p.1267-1276, 1989.
- HALL, G.M., ed. **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Blackie Academic and Professional, 1996. 265p.
- HAUPTMANN, J., STÜRZEBECKER, J. Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: From bench to bedside. **Thromb. Res.**, New York, v.93, p.203–241, 1999.
- HELENIUS, A., SIMONS, K. The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.247, p.3656-3661, 1972.
- HIEMENZ PC, RAJAGOPALAN R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. 3ed. New York: Marcel Dekker, 1997. 650p.
- HOLM, C., FREDRIKSON, G., BELFRAGE, P. Demonstration of the amphiphilic character of hormone-sensitive lipase by temperature-induced phase separation in Triton X-114 and charge-shift electrophoresis. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.261, p.15659-15661, 1986.
- HOLMES, W.E., PENICA, D., BLABER, M., REY, M.W., GUENZLER, W.A., STEFFENS, G.J., HEYNEKER, H.L. Cloning and expression of the gene for pro-urokinase in *Escherichia coli*. **Biotechnology**, s.l., v.3, n.10, p.923-929, 1985.
- IMAE, T. Nonionic rodlike micelles in dilute and semidilute solutions – intermicellar interaction and the scaling law. **J. Phys. Chem.**, Washington, D.C., v.92, p.572, 1988.
- ISHAQUE, A., MILLHAUSEN, M., LEVY, H. On the absence of cysteine in glucose-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, London, v.59, p.894, 1974.
- ISHIBASHI, T., TAKIZAWA, T., IWASAKI, H., SAITO, T., MATSUBARA, S., NAKAZAWA, E., KANAZAWA, K. Glucose-6-phosphate dehydrogenase cytochemistry using a copper ferrocyanide method and its application to rapidly frozen cells. **Histochemistry Cell. Biol.**, Berlin, v.112, n.3, p.221-232, 1999.
- ISRAELACHVILI, J.N., ed. **Intermolecular and surface forces**. 2ed. London: Academic, 1991. 450p.

- JOHANSSON, H.O., LUNDH, G., KARLSTROM, G., TJERNELD, F. Effect of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide copolymers. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1290, p.289-298, 1996.
- JOHANSSON, H.O., PERSSON, J., TJERNELD, F. Thermoseparating water/polymer system: A novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.66, p.247-257, 1999.
- JOST, P.C., GRIFFITH, O.H., eds. **Lipid-protein interactions**, v1., New York: Wiley, 1982. 2V.
- KAMEI, D.T., WANG, D.I.C., BLANKSCHTEIN, D. (a) Fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems. **Langmuir**, Washington, D.C., v.18, p.3047-3057, 2002.
- KAMEI, D.T., KING, J.A., WANG, D.I.C., BLANKSCHTEIN, D. (b) Separating lysozyme from bacteriophage P22 in two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.80, n.2, p.233-236, 2002.
- KAMEI, D.T. Protein and viral partitioning in two-phase aqueous micellar systems. Cambridge, 2001. 316p. (Tese de Doutorado, Massachusetts Institute of Technology).
- KATO, T., ANZAI, S., SEIMIYA, T. Light scattering from semidilute solutions of nonionic surfactants ($C_{12}E_5$ and $C_{12}E_8$) and the scaling law. **J. Phys. Chem.**, Washington, D.C., v.94, p.7255, 1990.
- KATZ, B.A., MACKMAN, R., LUONG, C., RADIKA, K., MARTELLI, A., SPRENGELER, P.A., WANG, J., CHAN, H., WONG, L. Structural Basis for Selectivity of a Small Molecule, S1-Binding, Submicromolar Inhibitor of Urokinase-Type Plasminogen Activator. **Chem. Biol.**, London, v.7, n.4, p.299-312, 2000.
- KIM, J., YU, W., KOVALSKI, K., OSSOWSKI, L. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. **Cell**, New York, v.94, p.353-362, 1998.
- KOPPERSCHLÄGER, G. Affinity extraction with dye ligands. **Methods Enzymol.**, London, v.228, p.121-136, 1994.

- KRONER, K.H., CORDES, A., SCHELPER, A., MORR, M., BÜCKMANN, A.F., KULA, M.R. Affinity partition studied with glucose-6-phosphate dehydrogenase in aqueous two-phase systems in response to triazine dyes. In: **Affinity Chromatography and Related Techniques**, GRIBNAU, T.C.J., VISSER, J., NIVARD, R.J.F. - Editors. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1982. p.491-501.
- KRZELJ, V., ZLONDRE, S., TERZIC, J., MESTROVIC, M., JAKSIC, J., PAVLOV, N. Prevalence of G6PD deficiency in the Croatian Adriatic coast population. **Arch. Med. Res.**, Mexico, v.32, p.454-457, 2001.
- LEE, C.K., SU, W.D. Nonionic surfactant-mediated affinity cloud point extraction of vancomycin. **Sep. Sci. Technol.**, New York, v. 3, n.16, p.3267-3277, 1999.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ed. Trad: SIMÕES, A.A., LODI, W.R.N. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- LIN, D.Q., ZHU, Z.Q. Affinity extraction of lactate dehydrogenase by aqueous two-phase systems using free triazine dyes. **Biotechnol. Tech.**, London, v.10, n.1, p.41-46, 1996.
- LIU, C.L., KAMEI, D.T., KING, J.A. WANG, D.I.C., BLANKSCHTEIN, D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.711, p.127-138, 1998.
- LIU, C.L., NIKAS, Y.J., BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.52, p.185-192. 1996
- LIU, C.L., NIKAS, Y.J., BLANKSCHTEIN, D. Partitioning of proteins using two-phase aqueous surfactant systems. **AIChE J.**, New York, v.41, p.991-995, 1995.
- LOJUDICE, F.H., SILVA, D.P., ZANCHIN, N.I.T., OLIVEIRA, C.C., PESSOA-JR, A. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotech.**, Totowa, v.91-93, p.161-169, 2001.
- LORCH, J. Two-Phase Aqueous Extraction as a Process Development Tool. In: **11th INTERNATIONAL CONFERENCE ON PARTITIONING IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS**, Gulf Shores, 1999. **Abstracts**. Alabama: University of Alabama, 1999. s.p.
- LUE, L., BLANKSCHTEIN, D. A liquid-state theory approach to modeling solute partitioning in phase-separated solutions. **Ind. Eng. Chem. Res.**, s.l., v.35, p.3032-3043, 1996.

- MARZZOCO, A., TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360p.
- MAKINO, S. Interaction of protein with amphiphilic substances. **Adv. Biophys.**, Tokyo, v.12, p.131-184, 1979.
- MAKINO, S., REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.248, p.4926-4932, 1973.
- MALE, K.B., NGUYEN, A.L., LUONG, J.H.T. Isolation of urokinase by affinity ultrafiltration. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.35, p.87-93, 1990.
- MANGEL, W.F., LIN, B., RAMAKRISHNAN, V. Conformation of one-chain and high-molecular-weight urokinase analyzed by small-angle neutron-scattering and vacuum ultraviolet circular-dichroism. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.266, n.15, p.9408-9412, 1991.
- MCCREATH, G.E., CHASE, H.A., OWEN, R.O., LOWE, C.R. Expanded bed affinity-chromatography of dehydrogenases from bakers-yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.48, n.4, p.341-354, 1995.
- MEGURO, K., UENO, M., ESUMI, K. Micelle formation in aqueous media. In: M.J. Schick, editor, **Nonionic surfactants: Physical chemistry**, New York: Marcel Dekker, 1987. p.109-183.
- MINUTH, T., GIEREN, H., PAPE, U. Pilot scale processing of detergent based aqueous two-phase systems **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.55, p.339, 1997.
- MINUTH, T., THOMMES, J., KULA, M.R. A closed concept for purification of the membrane-bound cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* by surfactant-based cloud-point extraction, organic-solvent extraction and anion-exchange chromatography. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, Orlando, v.23, p.107, 1996.
- MITCHELL, D.J. Phase behavior of polyoxyethylene surfactants with water. **J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1**, Cambridge, U.K., v.79, p.975-1000, 1983.
- MIURA, J., ISHII, H., WATANABE, H. Extraction and separation of nickel chelates of 1-(2-thiazolylazo)-2-naphtol in nonionic surfactant solution. **Bunseki Kagaku**, Tokyo, v.25, p.808, 1976.
- MOORE, W. J. **Físico-Química**. v.2, 4ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1976, 866p.

- MORI, H., ISHIDA, M., OKAMOTO, S. Glucose determination using a flow system with enzyme reactor and application to analysis of glucose content in beverages. **J. Health Sci.**, Tokyo, v.45, n.3, p.126-129, 1999.
- NIKAS, Y.J., LIU, C.L., SRIVASTAVA, T., ABBOTT, N.L., BLANKSCHTEIN, D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. **Macromolecules**, Washington D.C., v.25, p.4794-4806, 1992.
- NUNEZ-DELICADO, E., BRU, R., SANCHEZ-FERRER, A., GARCIA-CARMONA, F. Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdam, v.680, n.1-2, p.105-112, 1996.
- OLIVE, C., LEVY, H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Methods Enzymol.**, New York, v.41, pt.B, p.196, 1975.
- ÖZER, N., AKSOY, Y., ÖGÜS, H. Kinetic properties of human placental glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, Oxford, v.33, p.221-226, 2001.
- PAOLETTI, R., SHERRY, S. eds. **Thrombosis and urokinase**. London: Academic Press, 1977. 257p. (Proceedings of the Sero Symposium, v.9) (International Symposium on Urokinase, 1, Rome, 1975).
- PRYDE, J. G. Triton X-114: A detergent that has come in from the cold. **Trends Biochem. Sci.**, v.11, p.160-163, 1986.
- PRYDE, J.G., PHILIPS, J.H. Fractionation of membrane proteins by temperature-induced phase separation in Triton X-114. **Biochem. J.**, London, v.233, p.525-533, 1986.
- PUVVADA, S., BLANKSCHTEIN, D. Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior, and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants. **J. Chem. Phys.**, Melville, v.92, n.6, p.3710-3724, 1990.
- QUINA, F.H., HINZE, W.L. Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach. **Ind. Eng. Chem. Res.**, s.l., v.38, n.11, p. 4150-4168, 1999.
- RAMELMEIER, R.A., TERSTAPPEN, G.C., KULA, M.R. The partitioning of cholesterol oxidase in Triton X-114 based aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, Dordrecht, Neth., v..2, p..315-324, 1991.
- RANGEL-YAGUI, C.O., LAM, H., KAMEI, D.T., WANG, D.I.C., PESSOA-JR, A., BLANKSCHTEIN, D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.82, p.445-456, 2003.

- REISLER, E., LIU, J., MERCOLA, M., HORWITZ, J. The interactions of cibacron blue F3GA with troponin and its subunits. **Biochim Biophys. Acta**, Amsterdam, v.623, n.2, p.243-256, 1980.
- REUNING, U., MAGDOLEN, V., WILHELM, O., FISCHER, K., LUTZ, V., GRAEFF, H., SCHMITT, M. Multifunctional potential of the plasminogen activator system in tumor invasion and metastasis. **Int. J. Oncol.**, Athens, v.13, p.893-906, 1998.
- ROSEN, M.J. **Surfactants and interfacial phenomena**, 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 431 p.
- ROWLAND, P., BASAK, A.K., GOVER, S., LEVY, H.R., ADAMS, M.J. The three-dimensional structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. **Structure**, London, v.2, n.11, p.1073-1087, 1994.
- SAITOH, T., HINZE, W.L. Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins. **Talanta**, Amsterdam, v.42, n.1, p.119-127, 1995.
- SAMAMA, M., CASTEL, M., MATSUO, O., HOYLAERTS, M., LIJNEN, H.R. comparative-study of the activity of high and low-molecular weight urokinase in the presence of fibrin. **Thromb. Haemost.**, Stutgard, v.47, p.36-40, 1982.
- SANCHEZ-FERRER, A., BRU, R., GARCIA-CARMONA, F. Phase separation of biomolecules in polyoxyethylene glycol nonionic detergents. **Critical. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, Boca Raton, v.29, n.4, p.275-313, 1994.
- SEGEL, I.H. **Bioquímica: Teoria e Problemas**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1979. 525p.
- SEN, M., MITRA, S.P., CHATTORAJ, D.K. Thermodynamics of binding cationic detergents to bovine serum albumin. **Colloid Surf.**, Amsterdam, v.2, p.259-275, 1981.
- SHAH, D.O. **Micelles, microemulsions and monolayers. Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1998. 610p.
- SHILOACH, A., BLANKSCHTEIN, D. Measurement and prediction of ionic/nonionic mixed micelle formation and growth. **Langmuir**, Washington, D.C., v.14, p.7166-7182, 1998.

- SIRIMANNE, S.R., PATTERSON, D.G., MA, L., JUSTICE, J.B. Application of cloud-point extraction-reversed-phase high performance liquid chromatography - A preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.716, n.1-2, p.129-137, 1998.
- SIVARS, U., ABRAMSON, J., IWATA, S., TJERNELD, F. Affinity partitioning of a poly(histidine)-tagged integral membrane protein, cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase, in a detergent-polymer aqueous two-phase system containing metal-chelating polymer. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.743, p.307-316, 2000.
- SIVARS, U., TJERNELD, F. Mechanisms of phase behavior and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membranes proteins. **B.B.A. - Gen. Subjects.**, Amsterdam, v.1474, n.2, p.133-146, 2000.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T. MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid **Anal. Biochem.**, San Diego, v.150, n.1, p.76-85, 1985.
- SPRAGGON, G., PHILLIPS, C., NOWAK, U., PONTING, C.P., SAUNDERS, D., DOBSON, C.M., STUART, D.I., JONES, E.Y. The crystal structure of the catalytic domain of human urokinase-type plasminogen activator. **Structure**, London, v.3, n.7, p.681-691, 1995.
- STRYER, L. **Biochemistry**, New York: WH Freeman, 3ed. 1988.
- TAKAHASHI, R., AKIBA, K., KOIKE, M., NOGUCHI, T., EZURE, Y. Affinity chromatography for purification of two urokinases from human urine. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.742, p.71-78, 2000.
- TANFORD, C. **The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes**. 2ed. Wiley, New York, 1980. 233p.
- TANI, H., KAMIDATE, T., WATANABE, H. Aqueous micellar two-phase systems for protein separation. **Anal. Sci.**, Tokyo, v.14, n.5, p.875-888, 1998.
- TEROUANNE, B., BENCHEICK, M., BALAGUER, P., BOUSSIOUX, A.M., NICOLAS, I.C. Bioluminescent assays using glucose-6-phosphate dehydrogenase - Application to biotin and streptavidin detection. **Anal. Biochem**, Baltimore, v.180, n.1, p.43-49, 1989.
- TERSTAPPEN, G.C., RAMELMEIER, R.A., KULA, M.R. Protein partitioning in detergent-based aqueous 2-phase systems. **J. Biotechnol.**, Oxford, v.28, n.2-3, p.263-275, 1993.

- TSUBOUCHI, M., MITSUSHIO, H., YAMASAKI, N. Determination of cationic surfactants by two-phase titration. **Anal. Chem.**, Washington, D.C., v.53, p.1957-1959, 1981.
- VITOLO, M., ROCHA-FL., J.A. **Enzimas no contexto da síntese orgânica**. São Paulo: Fundação Biblioteca Nacional, 1998. 84p.
- VOUGHT, V., CICCONE, T., DAVINO, M.H., FAIRBAIRN, L., LIN, Y., COSGROVE, M.S., ADAMS, M.J. Delineation of the roles of amino acids involved in the catalytic functions of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphase dehydrogenase. **Biochemistry**, Washington, D.C., v.12, n.49, p.15012-15021, 2000.
- WANG, W.H., KUBOI, R., KOMASAWA, I. Aqueous two-phase extraction of dehydrogenases using triazine dyes in PEG/phosphate systems. **Chem. Eng. Sci.**, Oxford, v.47, n.1, p.113-121, 1992.
- WOHL, R.C., SUMMARIA, L., ROBBINS, K.C. Kinetics of activation of human plasminogen by different activator species at pH 7.4 and 37 °C. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.255, n.5, p.2005-2013, 1980.
- ZAITZEVA, E.A., CHUKRAI, E.S., POLTORAK, O.M. Thermostability of yeast hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.61, p.67-74, 1997.
- ZHANG, T.F., HAGER, L.P. A single-step large-scale purification of pyruvate oxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.257, n.2, p.485-487, 1987.
- ZHAO, G.-X.; ZHU, B.Y. Surface-adsorption and micellization of the mixed-solution of fluorocarbon and hydrocarbon surfactants. In: SCAMEHORN, J.F., ed. **Phenomena in mixed surfactant systems**. Washington: American Chemical Society, 1986. p.184-198. (ACS Symposium Series, 311) (Developed from a symposium sponsored by the ACS Division of Colloid and Surface Chemistry at the Colloid and Surface Science Symposium, 59, and the International Conference on Surface and Colloid Science, 5, Potsdam, New York, 1985).
- ZOELLER, N., BLANKSCHTEIN, D. Development of user-friendly computer programs to predict solution properties of single and mixed surfactant systems. **Ind. Eng. Chem. Res.**, s.l., v.34, p.4150-4160, 1995.
- ZOELLER, N., LUE, L., BLANKSCHTEIN, D. Statistical-thermodynamic framework to model nonionic micellar solutions. **Langmuir**, Washington, D.C., v.13, n.20, p.5258-5275, 1997.
- ZOELLER, N., SHILOACH, A., BLANKSCHTEIN, D. Predicting surfactant solution behavior. **Chemtech**, Washington, D.C., v.26, n.3, p.24-31, 1996.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

FIGURA A1 – Curva de calibração de absorbância em função da concentração de *cibacron blue* obtida experimentalmente.

FIGURA A2 – Curva de calibração de absorbância em função da concentração de *procion red* obtida experimentalmente.

FIGURA A3 – Curva de calibração da concentração total de proteínas obtida pelo método de BCA. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

APÊNDICE 2 – TABELAS REFERENTES ÀS CURVAS BINODAIS OBTIDAS

TABELA A1 – Valores de ponto de névoa (temperatura na qual o sistema separa de fases) obtidos experimentalmente para soluções de $C_{10}E_4$ a diferentes concentrações. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4$ /tampão (Figura 2.2).

Concentração de $C_{10}E_4$ (% p/p)	Ponto de Névoa (°C)
0,175	20,65
0,350	19,94
0,452	19,69
0,750	19,32
1,002	19,14
2,005	19,04
3,251	19,06
4,496	19,29
6,508	19,87
7,999	20,40

TABELA A2 – Valores de concentração de $C_{10}E_4$ e de C_8TAB correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a 26,7 °C. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB/tampão$ na respectiva temperatura (Figura 3.8).

Concentração de $C_{10}E_4$ (% p/p)	Concentração de C_8TAB (% p/p)
0,30	0,332
0,37	0,363
0,56	0,367
0,77	0,385
1,00	0,399
1,22	0,405
1,58	0,417
1,83	0,422
2,00	0,431
2,35	0,435
2,98	0,444
3,72	0,456
4,22	0,466
5,30	0,470
6,81	0,472
7,17	0,470
7,93	0,460
8,46	0,454
9,11	0,445
9,83	0,434
10,34	0,420
11,70	0,388
13,95	0,327
14,10	0,309
14,92	0,303
15,02	0,300
16,14	0,259
16,44	0,250
16,88	0,230

TABELA A3 – Valores de concentração de $C_{10}E_4$ e de C_8TAB correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a 30,5 °C. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4/C_8TAB$ /tampão na respectiva temperatura (Figura 3.9).

Concentração de $C_{10}E_4$ (% p/p)	Concentração de C_8TAB (% p/p)
0,27	0,506
0,37	0,491
0,45	0,531
0,52	0,547
0,63	0,564
0,75	0,567
0,82	0,556
1,19	0,584
1,59	0,605
2,01	0,621
2,30	0,633
2,63	0,647
2,91	0,657
2,94	0,657
3,20	0,664
3,46	0,672
3,69	0,679
4,09	0,686
4,12	0,685
4,46	0,690
4,53	0,695
5,00	0,700
5,07	0,698
5,35	0,701

TABELA A4 – Valores de concentração de C₁₀E₄ e de C₁₀TAB correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a 26,7 °C. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema C₁₀E₄/C₁₀TAB/tampão na respectiva temperatura (Figura 3.10).

Concentração de C ₁₀ E ₄ (% p/p)	Concentração de C ₁₀ TAB (% p/p)
0,98	0,079
3,23	0,145
0,81	0,071
1,59	0,092
2,46	0,122
3,24	0,149
3,98	0,169
4,76	0,182
5,49	0,197
6,10	0,214
6,75	0,222
7,81	0,241
8,43	0,246
8,97	0,249
9,40	0,253
9,98	0,262
0,40	0,053
0,87	0,070
1,28	0,089
1,73	0,099
2,04	0,116
0,32	0,051
1,04	0,084
2,60	0,124
3,45	0,153
4,20	0,179
4,90	0,189
5,58	0,206
6,78	0,224
7,26	0,230
8,41	0,250
8,96	0,260
10,20	0,267

TABELA A5 – Valores de concentração de $C_{10}E_4$ e de $C_{10}TAB$ correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a 30,0 °C. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /tampão na respectiva temperatura (Figura 3.11).

Concentração de $C_{10}E_4$ (% p/p)	Concentração de $C_{10}TAB$ (% p/p)
0,40	0,078
0,46	0,086
0,55	0,091
0,93	0,100
1,38	0,125
1,41	0,135
1,64	0,151
1,78	0,145
2,54	0,175
2,74	0,187
2,93	0,191
3,23	0,206
3,46	0,209
3,65	0,230
3,77	0,224
4,07	0,238
4,38	0,251
4,58	0,252
4,86	0,269
5,04	0,271
5,44	0,291
5,47	0,287
5,85	0,291
6,16	0,296
6,74	0,321
6,77	0,329
7,41	0,343
7,65	0,347
8,52	0,360
9,27	0,375
9,93	0,390
10,58	0,401
10,93	0,405
11,44	0,408

TABELA A6 – Valores de concentração de $C_{10}E_4$ e de $C_{12}TAB$ correspondentes aos pontos de névoa (separação de fases) obtidos experimentalmente a 26,7 °C. A partir dos dados apresentados, obteve-se a curva binodal para o sistema $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /tampão na respectiva temperatura (Figura 3.12).

Concentração de $C_{10}E_4$ (% p/p)	Concentração de $C_{12}TAB$ (% p/p)
0,25	0,014
0,38	0,022
0,59	0,026
1,10	0,052
1,24	0,055
2,14	0,094
2,33	0,107
3,12	0,143
3,35	0,148
3,75	0,159
4,17	0,182
4,82	0,192
4,96	0,209
5,74	0,223
6,26	0,234
6,35	0,247
7,04	0,267
7,56	0,270
7,61	0,277
8,23	0,288
8,40	0,280
9,45	0,303
9,47	0,302
9,70	0,303
10,05	0,304

APÊNDICE 3 – CÁLCULO DO INVERSO DO COMPRIMENTO DE DEBYE

No modelo teórico de partição de proteínas hidrofílicas baseado em interações por volume de exclusão e interações eletrostáticas, apresentado no Capítulo 3, assume-se que a força iônica do sistema, I , afete apenas o inverso do comprimento de Debye (κ). A teoria de Debye-Hückel fornece uma representação precisa do comportamento limite dos coeficientes de atividade em soluções iônicas diluídas. Esta teoria baseia-se na hipótese de os eletrólitos fortes se encontrarem completamente dissociados em íons. Os desvios do comportamento ideal observados são então atribuídos a interações elétricas entre os íons. Para obter teoricamente as propriedades de equilíbrio das soluções iônicas, é necessário calcular a energia livre excedente proveniente dessas interações eletrostáticas (MOORE, 1976). Na teoria, considera-se que cada íon é rodeado por uma atmosfera iônica, sendo a carga total dessa atmosfera igual à carga do íon, porém de sinal oposto. O raio médio da atmosfera iônica é $1/\kappa$, conhecido por comprimento de Debye. O comprimento de Debye, portanto, é uma medida aproximada da distância dentro da qual o campo eletrostático se estende com intensidade apreciável. Como κ é proporcional à raiz quadrada da força iônica, quando a mesma é elevada a atmosfera se encontra mais próxima ao íon do que quando a força iônica é pequena (CASTELLAN, 1986).

Para o cálculo do excesso de energia livre proveniente das interações eletrostáticas entre os íons em solução, calcula-se o potencial elétrico médio, ψ , de um dado íon na solução devido a todos os outros íons. Conhecendo-se ψ , é possível calcular o trabalho que deve ser desprendido para carregar reversivelmente os íons até esse potencial, e este trabalho corresponde à energia livre excedente atribuída às interações eletrostáticas. A energia livre excedente está diretamente relacionada com o coeficiente de atividade iônico, uma vez que ambos constituem uma medida dos desvios da idealidade (MOORE, 1976). Com base nesta abordagem da teoria de

Debye-Hückel, a seguinte equação para o inverso do comprimento de Debye (κ) pode ser obtida (KAMEI, 2001):

$$\kappa = \left[\frac{(8\pi e^2)(FI)(N_{av})}{1000 \epsilon_w k_B T} \right]^{1/2} \quad (A3.1)$$

em que e corresponde à carga eletrônica, N_{av} é o número de Avogadro, ϵ_w é a constante dielétrica da água, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta utilizada na separação de fases e $FI = 0,049 \text{ M}$ é a força iônica calculada com base nos íons do tampão, dada por:

$$FI = \frac{1}{2} \sum_i M_i z_i^2 \quad (A3.2)$$

em que z_i é a carga do íon e M_i é a concentração molar do íon, para todos os íons i do tampão.

Para o cálculo de contribuição das interações eletrostáticas ao coeficiente de partição, o potencial de interação entre as micelas e a proteína em cada fase foi obtido considerando-se a proteína uma esfera com distribuição de cargas uniforme e aplicando as integrais duplas representando a dupla camada elétrica entre uma esfera e um cilindro (micela), modelado como um disco chato infinitamente largo. O inverso do comprimento de Debye influencia os potenciais eletrostáticos na superfície da proteína e na superfície das micelas, sendo que quanto maior a nuvem iônica (maior FI) maior o efeito de blindagem das interações eletrostáticas entre a proteína e as micelas, fazendo com que as interações eletrostáticas sejam de curta distância (menor $1/\kappa$).

APÊNDICE 4 – CÁLCULO DA CARGA EFETIVA DE PROTEÍNAS

Neste apêndice, a teoria utilizada para o cálculo da carga efetiva aproximada de proteínas é apresentada (KAMEI, 2001). Para a terminação carboxílica da proteína e os aminoácidos com cadeias laterais negativamente carregadas (ácido aspártico, ácido glutâmico, cisteína e tirosina), o equilíbrio de ionização é dado por:

Desta forma, a constante aparente de equilíbrio, K , para essa ionização é:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (A4.1)$$

em que $[HA]$ é a concentração molar de aminoácido, $[A^-]$ é a concentração molar de aminoácido na forma não-protonada e $[H^+]$ é a concentração molar hidrogeniônica. Dentro desse contexto, o pK_a do aminoácido pode ser definido como:

$$pK_a = -\log K = -\log \left(\frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \right) \quad (A4.2)$$

Sabendo-se que o pH equivale ao $\log 1/[H^+]$, a equação (A4.2) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad (A4.3)$$

A equação (A4. 3), por sua vez, pode ser reescrita como:

$$[HA] = [A^-] \frac{1}{10^{(pH-pK_a)}} \quad (A4. 4)$$

Considerando-se um balanço de massa do aminoácido nas formas protonada e não-protonada, a seguinte relação é obtida:

$$[A^-] + [HA] = N_a[P] \quad (A4.5)$$

em que N_A corresponde ao número de aminoácidos ou terminações carboxílicas (se a proteína for composta por mais de uma subunidade) por proteína e $[P]$ é a concentração molar de proteína. Substituindo a equação (A4.4) na equação (A4.5), a seguinte equação é obtida:

$$[A^-] = \frac{N_A [P]}{1 + 1/10^{(pH - pK_a)}} \quad (A4.6)$$

A equação (A4.6) pode ser simplificada da seguinte forma:

$$[A^-] = \frac{N_A [P]}{1 + 1/10^{(pH - pK_a)}} \frac{10^{(pH - pK_a)}}{10^{(pH - pK_a)}}$$

resultando na equação:

$$[A^-] = \frac{N_A 10^{(pH - pK_a)}}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} [P] \quad (A4.7)$$

O valor de N_A pode ser obtido com base na sequência de aminoácidos da proteína. O pH da solução, no presente trabalho, é de 7,2. O pK_a característico de cada aminoácido ou da terminação carboxílica pode ser obtido na literatura (ver Tabela A1) (STRYER, 1992). Aplicando-se a equação (A4.7) para a terminação carboxílica, ácido aspártico, ácido glutâmico, cisteína e tirosina, a somatória dos valores de $[A^-]$ obtidos fornece uma relação de concentração molar de cargas negativas, $[carga^-]$, em função da concentração de proteína, $[P]$. É importante ressaltar que, medidas de pH após a separação de fases foram realizadas e o pH obtido em ambas as fases dos sistemas foi de 7,2.

Entretanto, para determinados aminoácidos a forma protonada apresenta-se positivamente carregada, enquanto que a forma não-protonada é neutra. Portanto, para estes aminoácidos que podem apresentar cadeias laterais positivamente carregadas (histidina, lisina e arginina) e também para a terminação amínica, a equação (A4.3) pode ser escrita da seguinte forma:

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{[A]}{[HA^+] } \right) \quad (A4.8)$$

em que $[A]$ é a concentração molar de aminoácido na forma não-protonada, $[HA^+]$ é a concentração molar de aminoácido na forma protonada e o pK_a pode ser escrito da seguinte forma:

$$pK_a = -\log K = -\log \left(\frac{[H^+][A]}{[HA^+]} \right) \quad (A4.9)$$

Seguindo o mesmo raciocínio adotado para os aminoácidos com cadeias laterais negativamente carregadas, a equação (A4.8) pode ser reescrita como:

$$[A] = [HA^+] 10^{(pH - pK_a)} \quad (A4.10)$$

O balanço de massa do aminoácido nas formas protonada e não-protonada fornece, neste caso, a seguinte relação:

$$[A] + [HA^+] = N_A [P] \quad (A4.11)$$

em que N_A corresponde ao número de aminoácidos ou terminações amínicas (se a proteína for composta por mais de uma subunidade) por proteína e $[P]$ é a concentração molar de proteína. Substituindo a equação (A4.10) na equação (A4.11), a seguinte equação é obtida:

$$[HA^+] = \frac{N_A}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} [P] \quad (A4.12)$$

Novamente, o valor de N_A pode ser obtido com base na seqüência de aminoácidos da proteína, o pH da solução é de 7,2 e o pK_a característico de cada aminoácido ou da terminação carboxílica pode ser obtido na literatura (ver Tabela A7) (STRYER, 1988). Aplicando-se a equação (A4.12) para a terminação amínica, histidina, lisina e arginina, a somatória dos valores de $[HA^+]$ obtidos fornece uma relação de concentração molar de cargas positivas, $[carga +]$, em função da concentração de proteína, $[P]$. Por fim, o valor de $[carga -]$ pode ser somado ao valor de $[carga +]$, obtendo-se a concentração molar de carga efetiva $[carga efetiva]$. Como a concentração molar de carga efetiva é expressa em termos da concentração molar de proteína, $[P]$, a $[carga efetiva]$ pode ser dividida por $[P]$, fornecendo a carga efetiva por molécula de proteína (*carga efetiva*):

$$carga\ efetiva = [carga+] + [carga-] \frac{1}{[P]} \quad (A4.13)$$

Para a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), considerando duas subunidades e baseando-se na sua seqüência de aminoácidos (ROWLAND *et al.*, 1994), a carga efetiva em pH 7,2 foi estimada em -42,2.

Para a enzima urokinase (UK), baseando-se na sua sequência de aminoácidos segundo HOLMES *et al.* (1985), a carga efetiva em pH 7,2 foi estimada em + 16,5.

TABELA A7 – Valores de pK_a para aminoácidos com cadeias laterais carregadas e grupos terminais de proteínas (STRYER, 1988).

AMINOÁCIDO OU GRUPO TERMINAL	pK_a
Terminal carboxílico	3,1
Ácido aspártico	4,4
Ácido glutâmico	4,4
Cisteína	8,5
Tirosina	10,0
Terminal amínico	8,0
Histidina	6,5
Lisina	10,0
Arginina	12,0

APÊNDICE 5 – ARTIGO COMPLETO PUBLICADO

GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE PARTITIONING IN TWO-PHASE AQUEOUS MIXED (NONIONIC/CATIONIC) MICELLAR SYSTEMS

Carlota O. Rangel-Yagui^{1,2}, Henry Lam¹, Daniel T. Kamei^{1,*}, Daniel I. C. Wang¹, Adalberto Pessoa-Jr², and Daniel Blankschtein^{1,†}

¹Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139

² Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology /FCF, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Key words: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, two-phase aqueous mixed micellar systems, protein purification, electrostatic interactions.

Running Title: G6PD partitioning in two-phase aqueous mixed micellar systems.

Mailing Address of Corresponding Author:
Daniel Blankschtein
Department of Chemical Engineering, Room 66-444
MIT
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02139
Tel: (617) 253-4594
Fax: (617) 252-1651
e-mail: dblank@mit.edu

* Present address: Biotechnology Process Engineering Center, MIT, Cambridge, MA 02139.

† To whom correspondence should be addressed.

Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Partitioning in Two-Phase Aqueous Mixed (Nonionic/Cationic) Micellar Systems

Carlota O. Rangel-Yagui,^{1,2} Henry Lam,¹ Daniel T. Kamei,^{1,*}
Daniel I. C. Wang,¹ Adalberto Pessoa, Jr.,² Daniel Blankschtein¹

¹Department of Chemical Engineering, Room 66-444, Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139; telephone: 617-253-4594; fax: 617-252-1651; e-mail: dblank@mit.edu

²Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology/FCF, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Received 21 August 2002; accepted 14 October 2002

DOI: 10.1002/bit.10586

Abstract: The enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) plays an important role in maintaining the level of NADPH and in producing pentose phosphates for nucleotide biosynthesis. It is also of great value as an analytical reagent, being used in various quantitative assays. In searching for new strategies to purify this enzyme, the partitioning of G6PD in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems was investigated both experimentally and theoretically. Our results indicate that the use of a two-phase aqueous mixed micellar system composed of the nonionic surfactant C₁₀E₄ (*n*-decyl tetra(ethylene oxide)) and the cationic surfactant C_nTAB (alkyltrimethylammonium bromide, *n* = 8, 10, or 12) can improve significantly the partitioning behavior of G6PD relative to that obtained in the two-phase aqueous C₁₀E₄ micellar system. This improvement can be attributed to electrostatic attractions between the positively charged mixed (nonionic/cationic) micelles and the net negatively charged enzyme G6PD, resulting in the preferential partitioning of G6PD to the top, mixed micelle-rich phase of the two-phase aqueous mixed micellar systems. The effect of varying the cationic surfactant tail length (*n* = 8, 10, and 12) on the denaturation and partitioning behavior of G6PD in the C₁₀E₄/C_nTAB/buffer system was investigated. It was found that C₈TAB is the least denaturing to G6PD, followed by C₁₀TAB and C₁₂TAB. However, the C₁₀E₄/C₁₂TAB/buffer system generated stronger electrostatic attractions with the net negatively charged enzyme G6PD than the C₁₀E₄/C₁₀TAB/buffer and the C₁₀E₄/C₈TAB/buffer systems, when using the same amount of cationic surfactant. Overall, the two-phase aqueous mixed (C₁₀E₄/C₁₀TAB) micellar system yielded the highest G6PD partition coef-

ficient of 7.7, with a G6PD yield in the top phase of 71%, providing the optimal balance between the denaturing effect and the electrostatic attractions for the three cationic surfactants examined. A recently developed theoretical framework to predict protein partition coefficients in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems was implemented, and the theoretically predicted G6PD partition coefficients were found to be in reasonable quantitative agreement with the experimentally measured ones. © 2003 Wiley Periodicals, Inc. *Biotechnol Bioeng* 82: 445–456, 2003.

Keywords: glucose-6-phosphate dehydrogenase; two-phase aqueous mixed micellar systems; protein purification; electrostatic interactions

INTRODUCTION

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (EC.1.1.1.49) is the first enzyme of the pentose phosphate pathway. It catalyzes the oxidation of glucose-6-phosphate using NADP⁺ and/or NAD⁺ yielding pentose phosphates for nucleotides synthesis, as well as NADPH/NADH for reductive biosynthesis and protection from oxidative stress (Cosgrove et al., 1998; Özer et al., 2001; Rowland et al., 1994). G6PD is ubiquitous in nature—found in almost all animal tissues, plants, and microorganisms. In most species, G6PD has a subunit with a molecular weight of 50–60 kDa, corresponding to approximately 500 amino acid residues. G6PD is normally dimeric or tetrameric (Rowland et al., 1994). The *Leuconostoc mesenteroides* G6PD, which is the one used in this work, is a dimer (Cohen and Rosemeyer, 1969).

The G6PD deficiency is one of the most common enzymopathies in humans, resulting from more than 90 different genetic mutations (Chim et al., 2001). Although it is usually asymptomatic, hemolytic anemia can be developed in the affected individual after exposure to oxidative stresses, or

*Present address: Biotechnology Process Engineering Center, MIT, Cambridge, MA 02139

Correspondence to: Daniel Blankschtein

Contract grant sponsors: NIH Interdepartmental Biotechnology Program; CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Industrial Technology Research Institute

Contract grant numbers: 5 T32 GM08334

with some infections such as hepatitis (Chim et al., 2001; Krzelj et al., 2001). As a result, several biochemical and medical studies involving G6PD have been carried out (Altukat et al., 2001; Au et al., 2000; Coban et al., 2002; Ishibashi et al., 1999). This enzyme is also of great interest as an analytical reagent, being used in various quantitative assays, including the measurement of creatin-kinase activity for diagnosis of heart and skeletal-muscle diseases, the measurement of hexose concentrations, and as a marker for enzyme immunoassays (Lojudice et al., 2001). The use of G6PD for measuring glucose in the presence of fructose constitutes an important tool for the detection of illegal sugar addition in the final products of the wine and fruit juice industries (Abrahão-Neto et al., 1997). This enzyme can also be used to identify and quantify glucose released by starch hydrolysis in fruit preparations, even in the presence of fruit pieces, colored compounds, high concentrations of sucrose, and other kinds of polysaccharides (Chatel et al., 1996). As a biosensor, the enzyme G6PD can rapidly monitor the concentration of glucose-6-phosphate in blood or human tissue at lower cost and in a less time consuming manner than the traditional methods like chromatography and spectroscopy. This monitoring is important because it can directly reflect the relative activity of G6PD in the metabolic pathways, and has been utilized to provide insight into the regulation of G6PD in human erythrocytes and rat liver cells (Bassi et al., 1999).

The industrial purification of the hydrophilic enzyme G6PD has been carried out through multiple-step processes that consist of such expensive techniques as affinity chromatography and ion-exchange chromatography (Champluvier and Kula, 1992; Chang and Chase, 1996; Chang et al., 1995; McCreath et al., 1995). As a result, the cost of this enzyme as an analytical grade reagent is very high. It is, therefore, desirable to develop a simpler and more economical technique for the purification of G6PD.

One of the techniques that is considered promising for protein purification is liquid-liquid extraction. Bioseparations have been conducted in different types of two-phase aqueous complex-fluid systems (Albertsson, 1956; Bordier, 1981; Johansson et al., 1996, 1999; Kamei et al., 2002a; Sivars and Tjerneld, 2000; Sivars et al., 2000). In particular, two-phase aqueous micellar systems exploit the fact that some aqueous micellar solutions, under appropriate conditions, can spontaneously separate into two water-based, yet immiscible, liquid phases between which proteins and other biomolecules can distribute unevenly (Liu et al., 1998).

For example, an aqueous solution of the nonionic surfactant *n*-decyl tetra(ethylene oxide) ($C_{10}E_4$) undergoes macroscopic phase separation, upon increasing the temperature, into a top, micelle-rich phase and a bottom, micelle-poor phase (Liu et al., 1996). Since the concentration of $C_{10}E_4$ in each phase exceeds its critical micelle concentration (CMC), a threshold concentration below which surfactant molecules are predominantly dispersed as monomers and above which they predominantly form micelles, micelles are present in both phases (Liu et al., 1996). Specifically,

both phases contain cylindrical micelles, which can be modeled as micelles having a cylindrical body capped by two hemispherical micelles at the ends (Puvvada and Blank-shtein, 1990; Zoeller et al., 1997). However, the $C_{10}E_4$ micelles in the top phase are larger and more abundant than those in the bottom phase. This difference in the physico-chemical environment of the two phases forms the basis of an effective extraction process (Liu et al., 1996).

When compared to the extensively studied two-phase aqueous polymer systems (Abbott et al., 1990, 1991, 1992; Albertsson, 1986), two-phase aqueous micellar systems offer a number of unique and desirable features, including the self-assembling nature of micelles that enables one to control and optimize the partitioning behavior by tuning micellar characteristics, and the ability of the micelles to simultaneously offer both hydrophobic and hydrophilic environments to solute species, allowing selectivity in partitioning according to the hydrophobicity of biomolecules (Liu et al., 1996). In addition, the partitioning can be made more selective by utilizing mixed micelles consisting of charged surfactants, or of surfactant-type affinity ligands, mixed with nonionic surfactants (Lee and Su, 1999; Saiob and Hinze, 1995; Sivars et al., 2000). In this respect, Kamei et al. (2002a; 2002b) demonstrated recently that electrostatic interactions between charged proteins and oppositely charged mixed micelles can be exploited to enhance the yield and selectivity of two-phase aqueous mixed (nonionic/anionic) micellar systems.

Although it is well known that ionic surfactants can bind to proteins and induce denaturation, this effect has been shown to depend on the type and concentration of the ionic surfactant (Gelamo and Tabak, 2000; Sen et al., 1981). Therefore, one may envision generating charged mixed micelles to enhance the partitioning behavior of hydrophilic proteins by the addition of a suitable amount of an ionic surfactant to the phase-forming nonionic surfactant. The amount of ionic surfactant added should be sufficiently high to induce a significant change in the protein partitioning behavior, but sufficiently low to prevent severe denaturation of the protein (Kamei et al., 2002a; 2002b).

In this article, we investigate the partitioning behavior of the enzyme G6PD, both experimentally and theoretically, in two-phase aqueous mixed micellar systems composed of the nonionic surfactant *n*-decyl tetra(ethylene oxide) ($C_{10}E_4$) and the cationic surfactant alkyltrimethylammonium bromide (C_n TAB, $n = 8, 10$, and 12). Similar to the $C_{10}E_4$ /buffer micellar system, the mixed $C_{10}E_4$ / C_n TAB/buffer micellar systems exhibit a single, homogeneous micellar phase at low temperatures that can spontaneously separate into a top, micelle-rich phase, and a bottom, micelle-poor phase as the temperature is increased. However, unlike the micelles present in the $C_{10}E_4$ /buffer system, every micelle in the two-phase aqueous $C_{10}E_4$ / C_n TAB/buffer micellar systems is a *mixed micelle* composed of both $C_{10}E_4$ and the cationic surfactant C_n TAB ($n = 8, 10$, or 12) (Kamei et al., 2002a). The positively charged mixed ($C_{10}E_4$ / C_n TAB) micelles are expected to influence the partitioning behavior of any pro-

tein having a net charge. Specifically, for the enzyme G6PD, since its isoelectric point is found to be around 4.6, the enzyme is net negatively charged at neutral pH and expected to be attracted electrostatically to the top, mixed micelle-rich phase.

Although G6PD has been partitioned in the past in two-phase aqueous *polymer* systems (Alred et al., 1994; Bhide et al., 1995; Wang et al., 1992), ours is the first attempt to purify this enzyme utilizing a two-phase aqueous *micellar* system. As will be shown, our results with two-phase aqueous mixed micellar systems compare favorably with previous results obtained utilizing two-phase aqueous *polymer* systems, suggesting that two-phase aqueous micellar systems provide a potentially effective purification method for this important enzyme.

In the Materials and Methods section we describe the materials and experimental methods utilized in this investigation. Next, we present a review of the protein partitioning theories based on excluded-volume interactions (Nikas et al., 1992) and electrostatic interactions (Kamei et al., 2002a) to predict protein partition coefficients in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. Subsequently, experimental and theoretical results are presented and discussed with concluding remarks.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The nonionic surfactant *n*-decyl tetra(ethylene oxide) ($C_{10}E_4$, lot no. 6011) was purchased from Nikko Chemicals (Tokyo, Japan). The cationic surfactants *n*-octyltrimethylammonium bromide (C_8TAB , lot no. OGK01) and *n*-decyltrimethylammonium bromide ($C_{10}TAB$, lot no. OG101) were purchased from TCI-America (Portland, OR). The cationic surfactant *n*-dodecyltrimethylammonium bromide ($C_{12}TAB$, lot no. 63H0519), glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* (lot no. 50K8612), glucose-6-phosphate (lot no. 40K7014), and β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADP⁺, lot no. 80K7046) were all purchased from Sigma (St. Louis, MO). The other reagents were all of analytical grade. All solutions were used as received. All solutions were prepared at pH 7.2 using 16.4 mM disodium phosphate and 1.82 mM citric acid (McIlvaine's buffer) in water purified through a Millipore Milli-Q ion-exchange system (Bedford, MA). The glassware used in all the experiments were washed in a 50:50 ethanol:1M sodium hydroxide bath, followed by a 1M nitric acid bath, rinsed copiously with Milli-Q water, and finally dried in an oven.

Determination of G6PD Concentrations by Enzymatic Assay

The determination of G6PD concentrations in aqueous surfactant solutions was based on a well-established enzymatic

assay (Bergmeyer, 1983), with some modifications to match the conditions of the G6PD partitioning experiments. In particular, McIlvaine's buffer was utilized instead of Tris buffer, and the temperature was lowered from 25°C to 15°C to prevent phase separation during the assay. The activity of G6PD was measured by determining the rate of NADPH formation, which absorbs ultraviolet light at 340 nm. One G6PD unit was defined as the amount of enzyme that catalyzes the reduction of 1 μ mol of NADP⁺ per minute under the assay conditions. The concentrations of each reagent mixed in the spectrophotometer cell were as follows: 900 μ L of pH 7.2 McIlvaine's buffer, 20 μ L of a 250 mM glucose-6-phosphate solution, 5 μ L of a 131 mM NADP⁺ solution, and 20 μ L of a sample containing G6PD. The spectrophotometric measurements were performed immediately after the sample addition, using a Shimadzu UV-160U spectrophotometer.

Determination of Cationic Surfactant Concentrations by Titration

The concentration of cationic surfactant present in each co-existing micellar phase was determined based on a two-phase titration method, described by Tsubouchi et al. (1981). Instead of a pH 6 phosphate buffer solution used in the original protocol, pH 6 McIlvaine's buffer was utilized, since this buffer was also utilized in the G6PD partitioning experiments. Briefly, the sample was added to a 200 mL Erlenmeyer flask containing 5 mL of buffer solution, two drops of tetrabromophenolphthalein ethyl ester indicator (0.2% solution in ethanol), and 1 mL of 1,2-dichloroethane. The mixture was titrated with a 10 mM sodium tetraphenylborate solution, with intermittent shaking by hand to ensure equilibrium between the organic (1,2-dichloroethane) and the aqueous phases. In the absence of tetraphenylborate titrant, the indicator tetrabromophenolphthalein ethyl ester forms an ion pair with the cationic surfactant ion, in which the indicator is in the dissociated form (blue, $\lambda_{max} = 610$ nm). Throughout the titration, a complex between the cationic surfactant ion and the tetraphenylborate added is formed, with the indicator returning to its nondissociated form. When one drop of excess titrant is added, the dichloroethane phase changes to a faint yellow color, due to the presence of the indicator only in the nondissociated form ($\lambda_{max} = 410$ nm). Therefore, the cationic surfactant concentration can be determined from the amount of sodium tetraphenylborate added, with a color change from sky blue to faint yellow in the organic phase signaling the endpoint of the titration.

G6PD Partitioning in Two-Phase Aqueous Micellar Systems

Buffered solutions, each with a total volume of 3 mL, were prepared in graduated 10-mL test tubes by the addition of the desired amounts of $C_{10}E_4$, C_nTAB ($n = 8, 10$, or 12), and G6PD. Since the enzymatic assay for the determination

of G6PD concentration is very sensitive, the final concentration of G6PD was 0.0068 wt%. The solutions were well mixed and equilibrated at 4°C in order for each solution to exhibit a clear and homogeneous single phase. Subsequently, the solutions were placed in a thermo-regulated device, previously set at the desired temperature. Solutions were maintained at that temperature for 3 h to attain partitioning equilibrium, since previous experiments had indicated that the partitioning behavior after 3 h is essentially the same as that observed after 21 h (see Results and Discussion section). After partitioning equilibrium was attained, the two coexisting micellar phases formed were withdrawn separately with great care, using syringe and needle sets, and the enzyme concentration in each phase was determined as described above. Each G6PD partitioning experiment was repeated at least 3 times to verify reproducibility.

Mapping the Coexistence Curves of the $C_{10}E_4/C_nTAB$ /Buffer Systems

To better understand the G6PD partitioning behavior in the two-phase aqueous mixed ($C_{10}E_4/C_n$) micellar systems, and to be able to implement the recently developed theoretical framework of protein partitioning (Kamei et al., 2002a), knowledge of the concentrations of both the nonionic and the cationic surfactants in each coexisting micellar phase was required. Since we have already described the method to quantify the concentrations of cationic surfactants (as above), coexistence curves for the various $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer systems were mapped out, at the same temperatures utilized in the G6PD partitioning experiments, to obtain the concentrations of the nonionic surfactant in each coexisting micellar phase from the intersections of the tie-line with the coexistence curve. The coexistence curve represents the boundary separating the one-phase region from the two-phase region. As one traverses this boundary from the one-phase region to the two-phase region, the solution becomes turbid, signaling the onset of phase separation. For a $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer micellar system at a given temperature and fixed pressure, the coexistence curve can be represented as a $C_{10}E_4$ concentration vs. C_nTAB concentration phase diagram, shown schematically in Figure 1. In Figure 1, a surfactant composition represented by point A, which is within the two-phase region, will exhibit phase separation, and the compositions of the resulting top and bottom micellar phases correspond to points B and C, respectively. The dashed line connecting points B and C is referred to as a tie-line, and any surfactant composition represented by points on the same tie-line will exhibit phase separation having the same top and bottom phase surfactant compositions (that is, the same B and C points), but having different volumes of the top and bottom phases (Albertsson, 1986). Therefore, if one knows the equilibrium concentrations of cationic surfactant in the top and bottom phases of a two-phase system at that particular temperature and pressure (that is, the x-coordinates of points B and C in Fig. 1), one can read off the concentrations of the nonionic surfactant in

Figure 1. Schematic representation of a phase diagram for a two-phase aqueous mixed ($C_{10}E_4/C_nTAB$) micellar system at fixed temperature and pressure. The solid line represents the coexistence curve, separating the one-phase region from the two-phase region. The dashed line represents a tie-line, where any solution composition located on this segment, such as point A, will undergo phase separation, resulting in a top phase corresponding to the point B composition and a bottom phase corresponding to the point C composition.

the top and bottom phases (that is, the y-coordinates of points B and C in Fig. 1) from the experimentally determined coexistence curve.

To map a coexistence curve, the procedure described previously by Kamei et al. (2002a), which is similar to the one employed to measure coexistence curves for two-phase aqueous polymer systems (Albertsson, 1986), was utilized. This procedure makes use of the fact that the coexistence curve marks the transition between a clear (one-phase) and a turbid (two-phase) solution, observable by the naked eye. A few grams of a concentrated buffered $C_{10}E_4$ solution were first equilibrated at the desired temperature in a thermo-regulated device where it was turbid. A solution of known concentration of C_nTAB ($n = 8, 10$, or 12) in buffer was added, dropwise, until the solution cleared. The concentrations of C_nTAB and $C_{10}E_4$ were then calculated based on the initial concentration of $C_{10}E_4$ and the amount of C_nTAB solution added. The resulting concentrations of $C_{10}E_4$ and C_nTAB correspond to the coordinates of one point on the coexistence curve at that particular temperature, characterizing the transition from a two-phase region to a one-phase region. A known mass of the buffer was then added until the solution again became turbid, indicating a surfactant composition in the two-phase region. The C_nTAB solution was again added, dropwise, until the solution cleared, and the concentrations of C_nTAB and $C_{10}E_4$, corresponding to the coordinates of another point on the coexistence curve, were calculated. The above procedure was repeated until sufficient points on the coexistence curve, typically 25–35 points, were determined. By connecting the two points on the experimentally mapped coexistence curve, corresponding to the cationic surfactant concentrations in each coexisting phase of the system, measured using the titration method discussed above, a tie-line is obtained which should

pass through the point corresponding to the experimental G6PD partitioning condition for the respective system at the respective temperature.

REVIEW OF PROTEIN PARTITIONING THEORIES BASED ON EXCLUDED-VOLUME AND ELECTROSTATIC INTERACTIONS

The partitioning behavior of a protein in an aqueous two-phase system can be quantified in terms of the protein partition coefficient, K_p , defined as follows:

$$K_p = \frac{C_{p,t}}{C_{p,b}} \quad (1)$$

where $C_{p,t}$ and $C_{p,b}$ are the protein concentrations in the top and bottom phases, respectively.

For a hydrophilic protein, the partitioning behavior in two-phase aqueous *nonionic* micellar systems composed of cylindrical micelles was recently modeled by our group. The following theoretical expression, based on excluded-volume (EV) considerations, was shown to provide a good quantitative prediction of the protein partition coefficient (Kamei et al., 2002b; Lue and Blankschtein, 1996; Nikas et al., 1992):

$$K_p^{EV} = \exp \left[-(\phi_t - \phi_b) \left(1 + \frac{R_p}{R_n} \right)^2 \right] \quad (2)$$

where ϕ_t and ϕ_b are the surfactant volume fractions in the top and bottom phases, respectively, R_p is the hydrodynamic radius of the protein, and R_n is the cross-sectional radius of each cylindrical micelle. According to Eq. (2), the partitioning behavior of hydrophilic proteins in two-phase aqueous *nonionic* micellar systems is assumed to be governed primarily by repulsive, steric, excluded-volume (EV) interactions, which drive the protein preferentially to the bottom, micelle-poor phase where it can experience a larger free volume (Lue and Blankschtein, 1996). The hydrodynamic radius of G6PD was calculated according to its isomorphous crystal dimensions (Rowland et al., 1994) to be 68 Å. The cross-sectional radius of the cylindrical C₁₂E₄ micelle was estimated to be 21 Å based on the molecular model of micellization developed by Puvvada and Blankschtein (1990). The $(\phi_t - \phi_b)$ value can be obtained from the co-existence curve, since both phases have densities of approximately 1 g/mL, and therefore, weight fractions can be approximated as volume fractions.

However, the partitioning behavior of hydrophilic proteins in two-phase aqueous *mixed (nonionic/ionic)* micellar systems cannot be quantified using only Eq. (2), because electrostatic interactions operating between the charged proteins and the charged mixed micelles were not accounted for in the derivation of Eq. (2). Therefore, a detailed protein partitioning theory that incorporates both excluded-volume and electrostatic interactions was developed recently (Kamei et al., 2002a), based on a molecular-thermodynamic theory of mixed surfactant micellization developed earlier

(Shiloach and Blankschtein, 1998; Zoeller and Blankschtein, 1995; Zoeller et al., 1996). In the context of the new theory, the partition coefficient of a hydrophilic protein in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems can be expressed as follows (Kamei et al., 2002a):

$$K_p = K_p^{EV} K_p^{elec} \quad (3)$$

where K_p^{EV} denotes the excluded-volume contribution to the protein partition coefficient, and is given by Eq. (2), and K_p^{elec} denotes the electrostatic contribution to the protein partition coefficient and is given by Kamei et al. (2002a):

$$K_p^{elec} = \exp \left[\frac{-\epsilon_w R_p}{2R_n^2 k_B T} [(\psi_{mic,t}^2 + \psi_p^2) I_t \phi_t - (\psi_{mic,b}^2 + \psi_p^2) I_b \phi_b] \right] \quad (4)$$

where ϵ_w is the dielectric constant of water, k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, $\psi_{mic,x}$ is the electrostatic potential at the surface of each micelle in phase x {top (t) or bottom (b)}, ψ_p is the electrostatic potential at the surface of the protein, and I_x is an integral over the entire volume of phase x reflecting electrostatic interactions between a charged mixed micelle and a charged protein in phase x , given by the following expression (Kamei et al., 2002a):

$$I_x = \int_{R_{min}}^{\infty} \left[\frac{2\psi_{mic,x}\psi_p}{\psi_{mic,x}^2 + \psi_p^2} \ln \left[\frac{1 + \exp(-\kappa(r - R_n - R_p))}{1 - \exp(-\kappa(r - R_n - R_p))} \right] + \ln[1 - \exp(-2\kappa(r - R_n - R_p))] \right] r dr \quad (5)$$

where κ is the inverse of the Debye-Hückel screening length based on the buffer salt ions in the hypersolvent, $(r - R_n - R_p)$ is the distance from the surface of the micelle to the surface of the protein, and r is the radial distance from the cylindrical micelle axis of symmetry. The lower limit of integration in Eq. (5), R_{min} , corresponds to the minimum radial distance between the micelle cylindrical axis and the center of the protein, and is given by the sum of the protein hydrodynamic radius, R_p , the micelle cross-sectional radius, R_n , and the distance of closest approach between the micelle and the protein, d_{min} , that is, by:

$$R_{min} = R_n + R_p + d_{min} \quad (6)$$

A distance of approximately two water molecules (≈ 6 Å) (Franks, 1983) was adopted for d_{min} , assuming that the micelle and the protein can approach very closely, but still have some water of hydration between them.

The expressions for $\psi_{mic,x}$ ($x = t$ or b) and ψ_p used (both in the cgs system of units) are given below (Bockris and Reddy, 1970; Hiemenz and Rajagopalan, 1997):

$$\psi_{mic,x} = \frac{4\pi\sigma_x}{\kappa\epsilon_w} \quad (7)$$

and

$$\psi_p = \frac{4\pi\sigma_p R_p}{\epsilon_w(1 + \kappa R_p)} \quad (8)$$

where σ_x is the surface charge density of each micelle in phase x , and σ_p is the surface charge density of the protein (G6PD in the present case). The surface charge density of G6PD was calculated by modeling the enzyme as a sphere, and then estimating its net charge using the Henderson-Hasselbalch equation to be -42.2 at pH 7.2 (Stryer, 1988). The surface charge density of each micelle in phase x was calculated according to the following equation (Kamei, 2001):

$$\sigma_x = \frac{\alpha_{mic} z_{cationic} e \ell_{c,x}^2}{2 \ell_{cationic,x} [(1 - \alpha_{mic}) V_{tail,C_{10}E_4} + \alpha_{mic} V_{tail,cationic}]} \quad (9)$$

where α_{mic} is the micelle composition of the cationic surfactant in terms of moles ($\alpha_{mic} = [C_nTAB]_{mic} / ([C_nTAB]_{mic} + [C_{10}E_4]_{mic})$) in phase x (t or b), $z_{cationic} = +1$ is the valence of a cationic surfactant molecule, e is the electronic charge, $\ell_{c,x}$ is the mixed micelle core radius in phase x , $\ell_{cationic,x}$ is the length of a cationic surfactant molecule in each micelle in phase x , and $V_{tail,C_{10}E_4}$ and $V_{tail,cationic}$ are the volumes of the hydrophobic tails of the nonionic and the cationic surfactants, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

G6PD Partitioning in the $C_{10}E_4$ / C_nTAB / Buffer Systems

The G6PD partitioning behavior was studied in the $C_{10}E_4$ / C_nTAB / buffer systems for the three cationic surfactants examined ($n = 8, 10$, and 12), at the same initial conditions, to determine which system is more effective for the purpose of purifying the enzyme. The partitioning experiments were conducted at a temperature of 26.7°C , a total surfactant concentration of 128 mM , and a solution composition of $\alpha_{sol} = 0.035$, which represents the actual solution molar fraction of the cationic surfactant ($\alpha_{sol} = [C_nTAB] / ([C_nTAB] + [C_{10}E_4])$). This set of experimental conditions was based on preliminary experiments with $C_{12}TAB$ in which an α_{sol} value higher than 0.035 led to a severe loss of the G6PD activity (data not shown). For this first set of experiments, the effect of the partitioning time on the equilibrium attained by the system was determined. Specifically, the partitioning of G6PD was carried out over 3 h and 21 h , for the three systems studied ($C_{10}E_4$ / C_nTAB / buffer; $n = 8, 10$, and 12) (Fig. 2).

According to the results presented in Figure 2, a partitioning time of 3 h was found to be sufficient for the three systems to reach equilibrium, since no significant difference was found between the values of the G6PD partition coefficients, K_{G6PD} , measured after 3 h (gray bars) and after 21 h

Figure 2. Experimentally measured G6PD partition coefficients (K_{G6PD}) in two-phase aqueous mixed ($C_{10}E_4$ / C_nTAB) micellar systems carried out at a temperature $T = 26.7^\circ\text{C}$ and at a solution composition $\alpha_{sol} = 0.035$ for C_8TAB , $C_{10}TAB$, and $C_{12}TAB$ surfactants. The solution composition represents the fraction of cationic surfactant in relation to the total surfactant molar concentration ($\alpha_{sol} = [C_nTAB] / ([C_nTAB] + [C_{10}E_4])$). The gray bars and open bars correspond to partitioning times of 3 h and 21 h , respectively. The error bars represent 95% confidence limits for the measurements.

(open bars). Based on this finding, a partitioning time of 3 h was adopted in all the subsequent experiments.

The highest G6PD partition coefficient, $K_{G6PD} = 4.4$, was attained in the $C_{10}E_4$ / $C_{12}TAB$ / buffer system, followed by $K_{G6PD} = 1.8$ in the $C_{10}E_4$ / $C_{10}TAB$ / buffer system, and the lowest one, $K_{G6PD} = 0.10$, in the $C_{10}E_4$ / C_8TAB / buffer system (see Fig. 2). Based on these findings, the $C_{10}E_4$ / $C_{12}TAB$ / buffer system generated stronger electrostatic attractions with the enzyme G6PD than the two other systems examined. To understand this behavior, knowledge of the compositions of the two coexisting micellar phases in each system is necessary, and therefore, the trend observed in Figure 2 in the K_{G6PD} values will be discussed later. On the other hand, the G6PD mass balances for partitioning times of 3 h (gray bars) and of 21 h (open bars), presented in Figure 3, reveal that G6PD is more stable in the $C_{10}E_4$ / C_8TAB / buffer system (103% for $t = 3 \text{ h}$, 96% for $t = 21 \text{ h}$), followed by the $C_{10}E_4$ / $C_{10}TAB$ / buffer system (85% for $t = 3 \text{ h}$, 81% for $t = 21 \text{ h}$), and finally by the $C_{10}E_4$ / $C_{12}TAB$ / buffer system (75% for $t = 3 \text{ h}$, 80% for $t = 21 \text{ h}$), where the G6PD mass balance is defined as follows:

$$\text{G6PD Mass Balance} = \frac{C_{G6PD,t} V_t + C_{G6PD,b} V_b}{C_{G6PD,i} V_i} \times 100\% \quad (10)$$

where $C_{G6PD,t}$, $C_{G6PD,b}$, and $C_{G6PD,i}$ are the G6PD concentrations in the top phase, in the bottom phase, and in the G6PD solution initially added to the system, respectively, and V_t , V_b , and V_i are the volumes of the top phase, the bottom phase, and the G6PD solution initially added to the system, respectively.

The trend in G6PD stability observed in Figure 3 can be understood based on the mechanism of protein denaturation

Figure 3. Mass balance results for the G6PD partitioning experiments in the two-phase aqueous mixed ($C_{10}E_4/C_n$ TAB) micellar systems carried out at a temperature $T = 26.7^\circ\text{C}$ and at a solution composition $\alpha_{\text{cat}} = 0.035$ for C_8 TAB, C_{10} TAB, and C_{12} TAB. The solution composition represents the fraction of cationic surfactant in relation to the total surfactant molar concentration ($\alpha_{\text{cat}} = [C_n\text{TAB}]/([C_n\text{TAB}] + [C_{10}E_4])$). The gray bars and the open bars correspond to partitioning times of 3 hours and 21 hours, respectively. The error bars represent 95% confidence limits for the measurements.

induced by ionic surfactants. It is generally accepted that the denaturation of proteins by ionic surfactants results from a combination of electrostatic and hydrophobic interactions (Cardamone et al., 1994). In an aqueous solution containing protein and ionic surfactant, the ionic surfactant monomers first bind electrostatically to oppositely charged residues at the protein surface (*site-specific binding*), and induce an expansion of the protein structure. This expansion, in turn, allows more interactions of the surfactant hydrophobic tails with the protein nonpolar interior (*nonspecific, cooperative binding*), and leads to protein unfolding and loss of its secondary structure. In this second stage, the surfactant molecules aggregate to form micellar structures that interact with proteins (Goddard and Ananthapadmanabhan, 1993). Some studies of the binding of small molecules, particularly of fatty acids and surfactants, to albumin indicate that the hydrophobic, nonspecific interactions may be stronger than the electrostatic ones, but that the electrostatic interactions are nevertheless significant, since uncharged hydrocarbon chains have a lower binding affinity to the protein (Brown and Shockley, 1982). Therefore, consistent with the trend observed in the data shown in Figure 3, cationic C_n TAB surfactants having a shorter hydrocarbon tail (smaller n value) are expected to be less denaturing to proteins (G6PD) due to weaker nonspecific cooperative (hydrophobic) interactions. It is important to point out that the noncharged surfactant $C_{10}E_4$ is not expected to interfere with the site-specific, electrostatic binding ability of the C_n TAB surfactants, thus not changing the trend in denaturation induced by the C_n TAB surfactants (Goddard and Ananthapadmanabhan, 1993).

Based on the G6PD mass balance results shown in Figure 3, additional partitioning experiments were carried out in the $C_{10}E_4/C_n$ TAB/buffer systems ($n = 8$ and 10) at higher concentrations of C_8 TAB and C_{10} TAB, in an attempt to

further increase the values of K_{G6PD} for these two systems while maintaining an acceptable level of G6PD activity. The best partitioning results in each case, corresponding to the highest solution compositions utilized ($\alpha_{\text{cat}} = 0.20$ for C_8 TAB and $\alpha_{\text{cat}} = 0.06$ for C_{10} TAB), are presented in Figure 4. For these experiments, the temperature had to be increased to attain phase separation. Specifically, a temperature of 30.0°C was used for the $C_{10}E_4/C_{10}$ TAB/buffer system, and a temperature of 30.5°C was used for the $C_{10}E_4/C_8$ TAB/buffer system. The G6PD mass balances for these two experiments were about 75%, similar to the result of the G6PD partitioning experiment with C_{12} TAB shown in Figure 3.

The G6PD partitioning results shown in Figures 2 and 4 indicate that, for both the $C_{10}E_4/C_8$ TAB/buffer system and the $C_{10}E_4/C_{10}$ TAB/buffer system, increasing the cationic surfactant concentration results in higher G6PD partition coefficients while still maintaining the same G6PD mass balance as in the $C_{10}E_4/C_{12}$ TAB/buffer system (Fig. 3). When compared to the other two systems ($n = 10$ and 12), the $C_{10}E_4/C_8$ TAB/buffer system, even with an α_{cat} value as high as 0.20, does not generate sufficiently strong electrostatic attractions between the positively charged $C_{10}E_4/C_8$ TAB mixed micelles and the net negatively charged enzyme G6PD to significantly improve the partitioning of the enzyme to the top, mixed micelle-rich phase, resulting in a K_{G6PD} value of 1.3 (Fig. 4). On the other hand, an α_{cat} value of 0.06 in the $C_{10}E_4/C_{10}$ TAB/buffer system results in the highest G6PD partition coefficient observed ($K_{\text{G6PD}} = 7.7$; Fig. 4).

One should note that it is always possible to maintain a higher G6PD mass balance in any of the three $C_{10}E_4/C_n$ TAB/buffer systems examined by adding less cationic surfactant, at the expense of attaining lower K_{G6PD} values. To better understand the practical advantage of adding more

Figure 4. Experimentally measured G6PD partition coefficients (K_{G6PD}) in the $C_{10}E_4/C_n$ TAB/buffer system carried out at a temperature $T = 30.5^\circ\text{C}$ and at a solution composition $\alpha_{\text{cat}} = 0.20$, and in the $C_{10}E_4/C_{10}$ TAB/buffer system carried out at a temperature $T = 30.0^\circ\text{C}$ and at a solution composition $\alpha_{\text{cat}} = 0.06$. The solution composition represents the fraction of cationic surfactant in relation to the total surfactant molar concentration ($\alpha_{\text{cat}} = [C_n\text{TAB}]/([C_n\text{TAB}] + [C_{10}E_4])$). The error bars represent 95% confidence limits for the measurements.

cationic surfactant. Table I lists the values of the G6PD yield in the top, mixed micelle-rich phase ($Y_{G6PD,t}$) for each condition examined, where $Y_{G6PD,t}$ is defined as follows:

$$Y_{G6PD,t} = \frac{C_{G6PD,t} V_t}{C_{G6PD,t} V_i} \times 100\% \quad (11)$$

As can be seen in Table I, the $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /buffer system at $\alpha_{tot} = 0.06$ provides a better balance between the denaturing effect of $C_{10}TAB$ on G6PD and the electrostatic attractions between the positively charged $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ mixed micelles and the net negatively charged enzyme G6PD, with a $Y_{G6PD,t}$ value of 71%. Table I also reveals that the higher stability of G6PD in the $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /buffer system at $\alpha_{tot} = 0.035$ does not compensate for the lower K_{G6PD} value of 1.8, resulting in a relatively low $Y_{G6PD,t}$ value of 48% at this condition.

Mapping the Coexistence Curves of the $C_{10}E_4/C_nTAB$ /Buffer Systems

To better understand the partitioning behavior of G6PD, it is necessary to know the compositions of the top and bottom phases of the three $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer systems examined. For this purpose, coexistence curves were mapped out for all the two-phase aqueous mixed micellar systems examined, at the same temperatures utilized in the G6PD partitioning experiments, and the experimental tie-lines were obtained based on the C_nTAB concentrations determined by titration (see Materials and Methods section). Figure 5 shows the experimentally measured coexistence curves and tie-lines for the $C_{10}E_4/C_8TAB$ /buffer system, at 26.7°C and 30.5°C. Figure 6 shows the experimentally measured coexistence curves and tie-lines for the $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /buffer system, at 26.7°C and 30.0°C. Figure 7 shows the experimentally measured coexistence curve and tie-line for the $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /buffer system, at 26.7°C. In each coexistence curve, the filled circles correspond to the compositions of the top and bottom phases of the partitioning experiment carried out in the same system and at the same temperature that the coexistence curve was mapped out. The dashed line connecting these points is a tie-line, and the open circle corresponds to the overall solution composition of the partitioning experiment. As can be seen, there is good agree-

Table I. Yield of G6PD in the top, mixed micelle-rich phase ($Y_{G6PD,t}$) for the various $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer systems ($n = 8, 10$, and 12) and conditions examined.

System	T (°C)	α_{tot}^a	$Y_{G6PD,t}$ (%)
$C_{10}E_4/C_8TAB$ /Buffer	26.7	0.035	25
$C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /Buffer	26.7	0.035	48
$C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /Buffer	26.7	0.035	60
$C_{10}E_4/C_8TAB$ /Buffer	30.5	0.200	49
$C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /Buffer	30.0	0.060	71

^a α_{tot} refers to the solution molar fraction of cationic surfactant prior to phase separation ($\alpha_{tot} = [C_nTAB]/([C_nTAB] + [C_{10}E_4])$).

Figure 5. Experimentally determined coexistence curves of the $C_{10}E_4/C_8TAB$ /buffer system at 26.7°C ($\diamond$) and at 30.5°C (Δ), with their respective tie-lines, represented by the dashed lines. The intersections of the tie-lines with the coexistence curves ($\bullet$) were obtained based on the C_8TAB concentrations determined for the top and bottom phases. The open circles (O) represent the actual conditions at which G6PD was partitioned for this system. The error bars represent 95% confidence limits for the C_8TAB concentration measurements.

ment between the compositions of the top and bottom phases and the solution composition for each partitioning experiment, since in each case, the tie-line obtained passes through the point corresponding to the experimental phase separation condition, within the experimental uncertainty.

Table II lists the experimentally determined partition coefficients (K_{G6PD}) and the differences in surfactant concentrations between the top and bottom phases of the three $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer systems examined, obtained based on the phase diagrams in Figures 5, 6, and 7. As shown in Table II, the partition coefficient of G6PD increases from 1.3 to 7.7 with an increase in the difference in the cationic

Figure 6. Experimentally determined coexistence curves of the $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /buffer system at 26.7°C ($\diamond$) and at 30.0°C (Δ), with their respective tie-lines, represented by the dashed lines. The intersections of the tie-lines with the coexistence curves ($\bullet$) were obtained based on the $C_{10}TAB$ concentrations determined for the top and bottom phases. The open circles (O) represent the actual conditions at which G6PD was partitioned for this system. The error bars represent 95% confidence limits for the $C_{10}TAB$ concentration measurements.

Figure 7. Experimentally determined coexistence curve of the $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /buffer system at 26.7°C (Δ), with the respective tie-line, represented by the dashed line. The intersections of the tie-line with the coexistence curve ($\bullet$) were obtained based on the $C_{12}TAB$ concentration determined for the top and bottom phases. The open circle (O) represents the actual condition at which G6PD was partitioned for this system. The error bars represent 95% confidence limits for the $C_{12}TAB$ concentration measurements.

surfactant concentrations between the top and bottom phases, $\Delta[C_nTAB]_{t,b}$ from 0.09 to 0.25, highlighting the important role of the electrostatic attractions on the G6PD partitioning behavior. Note, however, that for the $C_{10}E_4/C_8TAB$ /buffer system at $\alpha_{tot} = 0.035$, although $\Delta[C_nTAB]_{t,b} = 0.13$ is higher than the corresponding value of $\Delta[C_nTAB]_{t,b} = 0.09$ for $\alpha_{tot} = 0.20$, a smaller partition coefficient value of 0.10 is attained (see Table II). This extremely small K_{G6PD} value of 0.10 obtained for the $C_{10}E_4/C_8TAB$ /buffer system at $\alpha_{tot} = 0.035$ results from the large excluded-volume effect observed at this condition, which is clearly reflected in the difference in total surfactant concentrations between the top and bottom phases ($\Delta[C_{10}E_4 + C_nTAB]_{t,b} = 17.43\%$, see Table II). Therefore, to attain the optimal G6PD partition coefficient, it is necessary to consider both the electrostatic and the excluded-volume effects.

G6PD Partitioning in the $C_{10}E_4$ /Buffer System

To decouple the effects of the electrostatic attractions and the excluded-volume interactions on the G6PD partition co-

efficient and also to probe the strength of the electrostatic attractions between the net negatively charged enzyme G6PD and the positively charged mixed $C_{10}E_4/C_nTAB$ micelles, G6PD was partitioned in the $C_{10}E_4$ /buffer system at conditions where the excluded-volume interactions operating between the micelles and the enzyme G6PD were the same as those in the mixed micellar systems examined. Considering that the predicted cross-sectional radii (R_n) of the cylindrical mixed micelles were, for all the experiments, similar to that of the $C_{10}E_4$ cylindrical micelles, and that the G6PD hydrodynamic radius (R_p) is fixed, the excluded-volume interactions can be maintained constant if $(\phi_t - \phi_b)$ is kept at a fixed value [see Eq. (2)]. Accordingly, the excluded-volume interactions can be maintained constant by partitioning G6PD in the $C_{10}E_4$ /buffer system at a temperature that corresponds to a tie-line having the same $(\phi_t - \phi_b)$ value observed in the $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer system under consideration. With this in mind, we utilized the $C_{10}E_4$ /buffer system coexistence curve obtained by Kamei et al. (2002a), since we used $C_{10}E_4$ from the same lot. Figure 8 shows a comparison between the experimentally determined partition coefficients in the $C_{10}E_4$ /buffer system (open bars) and in the $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer systems (gray bars).

As can be seen in Figure 8, in all cases, the measured K_{G6PD} values in the $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer systems are significantly higher than those in the corresponding $C_{10}E_4$ /buffer system, thus demonstrating that the net negatively charged enzyme G6PD is indeed attracted electrostatically to the top, mixed micelle-rich phase, which contains a greater number of positively charged $C_{10}E_4/C_nTAB$ mixed micelles. Note that even in the case of $C_8TAB - 1$, corresponding to the $C_{10}E_4/C_8TAB$ /buffer system at $\alpha_{tot} = 0.035$, the K_{G6PD} value is 2.5 times higher in the presence of the cationic surfactant, increasing from 0.04 to 0.1. Note also, that a K_{G6PD} value of 7.7 (22 times larger) is obtained in the case of $C_{10}TAB - 2$, corresponding to the $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /buffer system at $\alpha_{tot} = 0.06$. The experimental G6PD partitioning results shown in Figure 8 clearly demonstrate that electrostatic attractions contribute significantly to the preferential partitioning of the enzyme G6PD to the top, mixed micelle-rich phase.

Table II. Experimentally determined partition coefficients (K_{G6PD}), and differences in total surfactant concentrations, $\Delta[C_{10}E_4 + C_nTAB]_{t,b}$, and in cationic surfactant concentrations, $\Delta[C_nTAB]_{t,b}$, between the top and bottom phases of the three $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer systems examined, obtained based on the intersections of the tie-lines with the coexistence curves in Figures 5, 6, and 7.

System	T (°C)	α_{tot}^a	K_{G6PD}	$\Delta[C_{10}E_4 + C_nTAB]_{t,b}$ (wt%)	$\Delta[C_nTAB]_{t,b}$ (wt%)
$C_{10}E_4/C_8TAB$ /Buffer	26.7	0.035	0.1	17.43	0.13
$C_{10}E_4/C_8TAB$ /Buffer	30.5	0.200	1.3	3.16	0.09
$C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /Buffer	26.7	0.035	1.8	7.86	0.20
$C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /Buffer	26.7	0.035	4.4	7.40	0.25
$C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /Buffer	30.0	0.060	7.7	7.22	0.25

^a α_{tot} refers to the solution molar fraction of cationic surfactant prior to phase separation ($\alpha_{tot} = [C_nTAB]/([C_nTAB] + [C_{10}E_4])$).

Prediction of G6PD Partition Coefficients Using the Partitioning Theory Accounting for Excluded-Volume and Electrostatic Interactions

In Figure 9, partition coefficients measured in the $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /buffer and the $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /buffer systems (gray bars) are compared with those predicted using the partitioning theory presented in the Review section (open bars). The theoretical K_{G6PD} values were calculated using a number of input parameters, including the micelle composition α_{mic} , ϕ_n , and ϕ_b . The values of ϕ_n and ϕ_b were obtained based on the sum of the measured values of $[C_{10}E_4]$ (wt%) and $[C_nTAB]$ (wt%) corresponding to the top and bottom phases, respectively, extracted from the coexistence curves as shown in Figures 5, 6, and 7. A molecular-thermodynamic theory of mixed surfactant micellization (Shiloach and Blankschtein, 1998; Zoeller and Blankschtein, 1995; Zoeller et al., 1996) was utilized to predict α_{mic} in each phase of the two-phase aqueous micellar systems, at the conditions studied. Note that the partitioning theory was not utilized for the $C_{10}E_4/C_8TAB$ /buffer system because, based on predictions for the compositions of the top and bottom phases (data not shown), the C_8TAB monomers are present at significant concentrations, while in the two other cationic systems, the C_nTAB ($n = 10$ and 12) monomer concentrations can be neglected relative to the C_nTAB ($n = 10$ and 12) concentrations in the $C_{10}E_4/C_nTAB$ mixed micelles. Furthermore, the difference in the C_8TAB monomer concentrations between the top and bottom phases in the $C_{10}E_4/C_8TAB$ /buffer system is also sig-

Figure 8. Experimentally measured G6PD partition coefficients (K_{G6PD}) in the $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer systems (gray bars) and the corresponding ones in the $C_{10}E_4$ /buffer system (open bars), keeping the excluded-volume effect constant, for the $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /buffer system, $\alpha_{ex} = 0.035$ (denoted as $C_{12}TAB$), for the $C_{10}E_4/C_{10}TAB$ /buffer system, $\alpha_{ex} = 0.035$ (denoted as $C_{10}TAB-1$) and $\alpha_{ex} = 0.06$ (denoted as $C_{10}TAB-2$), and for the $C_{10}E_4/C_8TAB$ /buffer system, $\alpha_{ex} = 0.035$ (denoted as C_8TAB-1), and $\alpha_{ex} = 0.20$ (denoted as C_8TAB-2). The net negatively charged enzyme G6PD is attracted to the top, mixed micelle-rich phase, relative to the case without C_nTAB , as reflected by the K_{G6PD} values in the presence of C_nTAB being higher than those attained without C_nTAB . The error bars represent 95% confidence limits for the measurements.

Figure 9. Comparison between the experimentally measured (gray bars) and the theoretically predicted (open bars) G6PD partition coefficients in the $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer system with an $\alpha_{ex} = 0.035$ (denoted as $C_{10}TAB-1$), and an $\alpha_{ex} = 0.06$ (denoted as $C_{10}TAB-2$), and in the $C_{10}E_4/C_{12}TAB$ /buffer system with an $\alpha_{ex} = 0.035$ (denoted as $C_{12}TAB$). The error bars represent 95% confidence limits for the measurements.

nificant. The theory presented in the Review section does not account for electrostatic effects associated with the cationic surfactant monomers, since it was developed for surfactant systems in which the ionic surfactant monomer concentrations are comparable in the top and bottom phases, or are negligible relative to the micellar concentrations of the ionic surfactant in each coexisting micellar phase (Kamei et al., 2002a). To utilize the theory in the $C_{10}E_4/C_nTAB$ /buffer system, a new term associated with the electrostatic attractions between the net negatively charged proteins and the positively charged C_nTAB monomers needs to be incorporated into the excess free energy model used to characterize each phase. However, this generalization of the original theory is beyond the scope of this article.

As can be seen in Figure 9, the theoretically predicted protein partition coefficients (open bars) are in reasonable quantitative agreement with the experimentally measured ones (gray bars). Considering the reasonable quantitative agreement between theory and experiment observed in Figure 9, and the previous similar quantitative agreement obtained by Kamei et al. (2002a), the protein partitioning theory discussed in the Review section can serve as a useful tool to establish practical guidelines to optimize protein separations in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems.

CONCLUSIONS

The partitioning behavior of the enzyme G6PD in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems was investigated, both experimentally and theoretically. The cationic surfactants C_nTAB ($n = 8, 10$, and 12) were mixed with the nonionic surfactant $C_{10}E_4$ to form mixed $C_{10}E_4/C_nTAB$ micelles which have sufficient positive charge to attract the net negatively charged enzyme G6PD to the top,

mixed micelle-rich phase, while not significantly denaturing the enzyme. The measured G6PD partition coefficients in the $C_{10}E_4/C_n$ TAB/buffer systems were at least 2.5 times larger than those in the corresponding $C_{10}E_4$ /buffer system, clearly demonstrating that the net negatively charged enzyme G6PD is indeed attracted electrostatically to the top, mixed micelle-rich phase, which contains a greater number of positively charged $C_{10}E_4/C_n$ TAB mixed micelles.

The $C_{10}E_4/C_{12}$ TAB/buffer system generated stronger electrostatic attractions, resulting in the highest K_{G6PD} value when using the same amount of cationic surfactant. However, for the $C_{10}E_4/C_8$ TAB/buffer system and the $C_{10}E_4/C_{10}$ TAB/buffer system, it was possible to increase the amount of cationic surfactant without inducing severe denaturation of G6PD, and as a result, the G6PD partition coefficients also increased. In particular, the $C_{10}E_4/C_{10}$ TAB/buffer system provided the highest G6PD partition coefficient ($K_{G6PD} = 7.7$), increasing the G6PD partitioning to the top phase about 22 times more than that obtained in the $C_{10}E_4$ /buffer system, and resulting in a G6PD yield in the top phase of 71%.

The results presented in this article using two-phase aqueous mixed micellar systems compare favorably with previous results obtained utilizing two-phase aqueous polymer systems. For example, Alred et al. (1994) reported a G6PD partition coefficient value of about 0.75 in the $EO_{20}PO_{80}$ /Dextran T500 two-phase aqueous polymer system. In addition, increases in the G6PD partition coefficient from about 0.005 to about 0.03, using unbound triazine dyes as affinity ligands in two-phase aqueous PEG/phosphate systems, were reported by Bhide et al. (1995) and by Wang et al. (1992).

A recently developed molecular-thermodynamic theory combining mixed micelle formation and protein-micelle interactions was utilized to predict G6PD partition coefficients in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. The theoretically predicted G6PD partition coefficients were found to be in reasonable quantitative agreement with the experimentally measured ones, thus demonstrating the practical utility of the theory in guiding the implementation of optimal protein separation strategies.

In conclusion, two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems can be considered as a new promising alternative for the purification of G6PD. Among the three two-phase aqueous mixed micellar systems studied, the $C_{10}E_4/C_{10}$ TAB/buffer system was found to be best suited for the purification of G6PD, providing an optimal balance between denaturation effects and electrostatic attractions. Studies of G6PD partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems in the presence of other proteins, as well as in real fermentation broths, should be performed in the future to study the effect of the other components present in the system on the G6PD partitioning behavior.

Carlota Rangel Yagui is grateful for the financial support from CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Henry Lam is grateful for the financial support from the Industrial Technology Research Institute, Taiwan.

References

- Abbott NL, Blankschtein D, Hutton TA. 1990. On protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. *Bioseparation* 1:191-225.
- Abbott NL, Blankschtein D, Hutton TA. 1991. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. 1. Novel physical pictures and a scaling-thermodynamic formulation. *Macromolecules* 24:4334-4348.
- Abbott NL, Blankschtein D, Hutton TA. 1992. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. 2. On the free energy of mixing globular colloids and flexible polymers. *Macromolecules* 25:3917-3931.
- Abrahão-Neon J, Infante P, Vitolin M. 1997. Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose-6-phosphate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Chem Eng* 14:89-94.
- Albertsson PÅ. 1956. Chromatography and partition of cells and cell fragments. *Nature* 177:771-774.
- Albertsson PÅ. 1986. Partition of cell particles and macromolecules. 3rd ed. New York: Wiley-Interscience.
- Alred PA, Kozolowski A, Harris M, Tjerneld F. 1994. Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. *J Chromatogr A* 659:289-298.
- Altıkar S, Ciftci M, Biryakokuroglu ME. 2001. In vitro effects of some anesthetic drugs on enzymatic activity of human red blood cell glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Polish J Pharmacol* 54:67-71.
- An SWN, Gover S, Lam VMS, Adams MJ. 2000. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: The crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure Fold Des* 8:293-303.
- Bassi AS, Tang DQ, Bergounou MA. 1999. Mediated, amperometric biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6-phosphate dehydrogenase, Mg^{+2} ions, tetracyanoquinodimethane, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste. *Anal Biochem* 268:223-228.
- Bergmeyer HU. 1983. Methods of enzymatic analysis. 3rd ed., vol.2. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, p. 190-197.
- Bhide AA, Patel RM, Joshi JB, Pangarkar VG. 1995. Affinity partitioning of enzymes using unbound triazine dyes in PEG/Phosphate system. *Separ Sci Technol* 30:2989-3000.
- Bockris JOM, Reddy AKN. 1970. Modern electrochemistry, vol.1 New York: Plenum Press.
- Bordier C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256:1604-1607.
- Brown JR, Shockley P. 1982. Lipid-protein interactions, vol.1. New York: Wiley.
- Cardamone ML, Puri NK, Sawyer WH, Capon RJ, Brandon MR. 1994. A spectroscopic and equilibrium binding analysis of cationic detergent-protein interactions using soluble and insoluble recombinant porcine growth hormone. *Biochim Biophys Acta* 1206:71-82.
- Champluvier B, Kula MR. 1992. Dye-ligand membranes as selective adsorbents for rapid purification of enzymes: A case study. *Biotechnol Bioeng* 40:33-40.
- Chang YK, Chase HA. 1996. Ion exchange purification of G6PDH from unclassified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. *Biotechnol Bioeng* 49:204-216.
- Chang YK, McCreath GE, Chase HA. 1995. Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclassified yeast cell homogenates. *Biotechnol Bioeng* 48:355-366.
- Chail S, Voirin A, Luciani A., Artaud J. 1996. Starch identification and determination in sweetened fruit preparations. *J Agric Food Chem* 44:502-506.
- Chim CS, Lam C, Chan TK. 2001. Hemighost cell in acute hepatitis A: glucose-6-phosphate deficiency revisited. *Am J Med* 111:81.
- Coban TAK, Ciftci M, Kufrevioglu OI. 2002. Purification and investigation of some kinetic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from parsley (*Petroselinum hortense*) leaves. *Prep Biochem Biotechnol* 32:173-187.
- Cohen P, Rosemeyer MA. 1969. Subunit interactions of glucose-6-

- phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Eur J Biochem* 8:8–15.
- Cosgrove MS, Taylor C, Paludan S, Adams MJ, Levy HR. 1998. On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 37:2759–2767.
- Franks F. Water. 1983. London: The Royal Society of Chemistry.
- Gelamo EL, Tabak M. 2000. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and serum (HSA) albumins with ionic surfactants. *Spectrochim Acta A* 56:2255–2271.
- Goddard ED, Ananthapadmanabhan KP. 1993. Interactions of surfactants with polymers and proteins. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Hiemenz PC, Rajagopalan R. 1997. Principles of colloid and surface chemistry, 3rd ed. New York: Marcel Dekker.
- Ishibashi T, Takizawa T, Iwasaki H, Saito T, Matsubara S, Nakazawa E, Kanazawa K. 1999. Glucose-6-phosphate dehydrogenase cytochemistry using a copper ferrocyanide method and its application to rapidly frozen cells. *Histochemistry Cell Biol* 112:221–232.
- Johansson HO, Lundh G, Karlstrom G, Tjerneld F. 1996. Effect of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide copolymers. *Biochim Biophys Acta* 1290:289–298.
- Johansson HO, Persson J, Tjerneld F. 1999. Thermoseparating water/polymer system: A novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. *Biotechnol Bioeng* 66:247–257.
- Kamei DT. 2001. Protein and viral partitioning in two-phase aqueous micellar systems. PhD. thesis, Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA.
- Kamei DT, Wang DIC, Blankschtein D. 2002a. Fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems. *Langmuir* 18:3047–3057.
- Kamei DT, King JA, Wang DIC, Blankschtein D. 2002b. Separating lysozyme from bacteriophage P22 in two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnol Bioeng*, 80:233–236.
- Krzelj V, Zlondre S, Terzic J, Mestrovic M, Jakšic J, Pavlov N. 2001. Prevalence of G6PD deficiency in the Croatian Adriatic coast population. *Arch Med Res* 32:454–457.
- Lee CK, Su WD. 1999. Nonionic surfactant-mediated affinity cloud point extraction of vancomycin. *Sep Sci Technol* 34:3267–3277.
- Liu CL, Nikas YJ, Blankschtein D. 1996. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnol Bioeng* 52:185–192.
- Liu CL, Kamei DT, King JA, Wang DIC, Blankschtein D. 1998. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. *J Chromatogr B* 711:127–138.
- Lojudice FH, Silva DP, Zanchin NIT, Oliveira CC, Pessoa-Jr A. 2001. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotech* 91:93–161–169.
- Lue L, Blankschtein D. 1996. A liquid-state theory approach to modeling solute partitioning in phase-separated solutions. *Ind Eng Chem Res* 35:3032–3043.
- McCreath GE, Chase HA, Owen RO, Lowe CR. 1995. Expanded bed affinity-chromatography of dehydrogenases from bakers-yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports. *Biotechnol Bioeng* 48:341–354.
- Nikas YJ, Liu CL, Srivastava T, Abbott NL, Blankschtein D. 1992. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. *Macromolecules* 25:4794–4806.
- Ozer N, Aksoy Y, Ögus H. 2001. Kinetic properties of human placental glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Int J Biochem Cell Biol* 33:221–226.
- Puvvada S, Blankschtein D. 1990. Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior, and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants. *J Chem Phys* 92:3710–3724.
- Rowland P, Basak AK, Gover S, Levy HR, Adams MJ. 1994. The three-dimensional structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure* 2:1073–1087.
- Saitoh T, Hinze WL. 1995. Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins. *Talanta* 42:119–127.
- Sen M, Mitra SP, Chatteraj DK. 1981. Thermodynamics of binding cationic detergents to bovine serum albumin. *Colloid Surface* 2:259–275.
- Shiloach A, Blankschtein D. 1998. Measurement and prediction of ionic/nonionic mixed micelle formation and growth. *Langmuir* 14:7166–7182.
- Sivars U, Tjerneld F. 2000. Mechanisms of phase behavior and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membrane proteins. *BBA-Gen Subjects* 1474:133–146.
- Sivars U, Abramson J, Iwata S, Tjerneld F. 2000. Affinity partitioning of a poly(histidine)-tagged integral membrane protein, cytochrome *b_o*, ubiquinol oxidase, in a detergent-polymer aqueous two-phase system containing metal-chelating polymer. *J Chromatogr B—Biomed Sci Appl* 743:307–316.
- Stryer L. 1988. Biochemistry, 3rd ed. New York: WH Freeman.
- Tsubouchi M, Mitsushio H, Yamasaki N. 1981. Determination of cationic surfactants by two-phase titration. *Anal Chem* 53:1957–1959.
- Wang WH, Kuboi R, Komazawa I. 1992. Aqueous two-phase extraction of dehydrogenases using triazine dyes in PEG/phosphate systems. *Chem Eng Sci* 47:113–121.
- Zoeller N, Blankschtein D. 1995. Development of user-friendly computer programs to predict solution properties of single and mixed surfactant systems. *Ind Eng Chem Res* 34:4150–4160.
- Zoeller N, Shiloach A, Blankschtein D. 1996. Predicting surfactant solution behavior. *Chemtech* 26:24–31.
- Zoeller N, Lue L, Blankschtein D. 1997. Statistical-thermodynamic framework to model nonionic micellar solutions. *Langmuir* 13:5258–5275.