

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

**DANIELA DE BORBA GURPILHARES**

**Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por processo de  
extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos integrado ao  
rompimento celular de *Candida guilliermondii***

**Lorena – SP**

**2007**

**DANIELA DE BORBA GURPILHARES**

**Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por processo de extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos integrado ao rompimento celular de *Candida guilliermondii***

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutora em Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Dra. Inês Conceição Roberto

Co-orientador: Dr. Adalberto Pessoa Júnior

**Lorena – SP**

**2007**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

### **Catlogação na Publicação**

Biblioteca Universitária

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Gurpilhares, Daniela de Borba

Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por processo de extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos integrado ao rompimento celular de *Candida guilliermondii* / Daniela de Borba Gurpilhares ; orientador Inês Conceição Roberto, co-orientador: Adalberto Pessoa Júnior. -- 2007

139 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de

***“Agradeço a Deus, ao incentivo e dedicação de meus pais, mestres e amigos que sempre estiveram ao meu lado, tornando a minha caminhada mais agradável, sabendo que este não é o seu final, mas uma etapa dela que foi vencida, antes de tomar novos rumos para novas conquistas”***

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Inês Conceição Roberto e ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior, pela orientação neste trabalho e também pela dedicação, apoio e confiança durante a realização do trabalho;

Às Professoras Doutoras Francislene Andréia Hasmann, Maria das Graças Felipe e Adriane Milagres, pelo conhecimento transmitido, pelos valiosos conselhos e pela amizade;

A todos os funcionários do DEBIQ que, de um modo ou de outro, foram responsáveis por parte deste trabalho, principalmente aos amigos Paulinho e Nicamor, pelos auxílios prestados dentro e fora do laboratório além das alegres e intermináveis conversas nos momentos de descontração;

Aos amigos conquistados neste importante período de minha vida profissional e pessoal, por compartilharem o conhecimento adquirido e os excelentes momentos;

À FAPESP e CAPES, pela bolsa concedida;

A todos aqueles que aqui não foram citados, mas de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização do meu trabalho.

## RESUMO

GURPILHARES, D. B. **Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por processo de extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos integrado ao rompimento celular de *Candida guilliermondii***. 2007. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, São Paulo.

A utilização de resíduos agrícolas visando à produção de insumos por via biotecnológica tem se mostrado importante uma vez que estes resíduos são fontes renováveis de carbono. A fração hemicelulósica destes resíduos apresenta como componente principal a xilose, que pode ser utilizada como substrato em processos de bioconversão para a obtenção de produtos com valor agregado. Um destes produtos é a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), primeira enzima da via das pentoses fosfato que pode ser utilizada como reagente analítico em análises quantitativas, sobretudo em estudos bioquímicos e médicos. O presente trabalho visou estudar o processo de purificação dessa enzima empregando a extração em sistemas de duas fases aquosas convencional (sem integração) e integrado ao rompimento celular, em duas escalas, reduzida e ampliada. A enzima foi produzida por *Candida guilliermondii* FTI 20037 cultivada em meio constituído de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, sob condições pré-determinadas. Inicialmente, foram realizados ensaios para avaliar o efeito das variáveis volume de suspensão celular, velocidade de agitação do moinho de esferas de vidro e tempo sobre o rompimento das células. Os valores destas variáveis foram, então, estabelecidos em: 100 mL, 400 rpm e 25 minutos, respectivamente. Posteriormente, a influência da massa molar de PEG e comprimento de linha de amarração sobre a extração da G6PD foram investigados no sistema convencional (homogeneizado obtido a partir do rompimento celular, em presença ou ausência de fragmentos) e integrado (rompimento na presença dos componentes da extração), empregando-se a metodologia do planejamento experimental. Nos ensaios realizados em escala reduzida, sob condições otimizadas, alcançou-se um fator de purificação na fase rica em sal ( $FP_f$ ), ou fase fundo, de 2,8 e em maior escala, ou seja, em moinho de rompimento, de 1,3. Com isso, realizou-se o estudo cinético e termodinâmico empregando a enzima presente no homogeneizado antes da purificação e após purificada no processo integrado em escala reduzida, nas seguintes condições: TLL 40% e PEG 1500 mol/L. Os valores determinados para os parâmetros cinéticos foram  $K_m$ , 0,07 e 0,05 mM,  $V_m$ , 34,8 e 19,1 U/L e dos parâmetros termodinâmicos  $G$ , -13,71 e -13,64 KJ/mol;  $H$ , -2,49 e -2,50 KJ/mol;  $S$ , 37,02 e 36,77 J/mol.K;  $E_a$ , 24,18 e 15,02 KJ/mol, da enzima presente no homogeneizado celular antes e após purificação, respectivamente.

Palavras-chave: Enzimas, Processo de purificação, Sistemas de duas fases aquosas, Glicose-6-fosfato desidrogenase, *Candida guilliermondii*, Hidrolisado de palha de arroz, Rompimento celular.

## ABSTRACT

GURPILHARES, D. B. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase purification by liquid-liquid extraction process using aqueous two-phase systems integrated to cell disruption of *Candida guilliermondii***. 2007. 139p. Thesis (Doctoral in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, São Paulo.

The employment of agricultural residues aiming the attainment of biotechnological products has been shown its importance since these residues are renewable and low cost sources of carbon. The hemicellulosic fraction of these residues presents xylose as main component, which can be utilized as substrate for different bioconversion processes for the acquisition of high value products. As an example, glucose-6-phosphate dehydrogenase, the first enzyme of pentose phosphate pathway which can be used as analytical reagent in several quantitative analysis, mainly in biochemical and medical studies.

The present work contemplated the study of glucose-6-phosphate (G6PD) purification process by a conventional aqueous two phase systems extraction and integrated with cell disruption, in two scales, reduced and increased. The enzyme was obtained from cells of *Candida guilliermondii* FTI 20037 grown in hemicellulosic rice straw hydrolysate, using conditions established in previous work. Initially, assays in bead mill were performed to determine the effect of cell suspension volume, agitation speed and time on cell disruption. The determined conditions were: 100 mL, 400 rpm and 25 minutes, respectively. After this, the influence of molar mass of PEG and tie line length (TLL) on the G6PD recovery were investigated in the conventional system (with previous disrupted cells, with or without cell fragments) and integrated (disruption in the presence of extraction components), using the experimental design methodology. In the reduced scale assays, in optimized conditions, a purification factor in salt rich phase ( $FP_f$ ), or bottom phase, of 2,8 was reached while in the increased scale, this means in bead mill, a  $FP_f$  of 1,3 was attained. In addition, kinetic and thermodynamic studies were performed, employing the enzyme present in the homogenate before and after purification in reduced scale, in the following conditions: TLL of 40% and PEG 1500 mol/L. The established values for the kinetics parameters were  $K_m$ , 0,07 and 0,05 mM,  $V_m$ , 34,8 and 19,1 U/L and of thermodynamics  $G$ , -13,71 and -13,64 KJ/mol;  $H$ , -2,49 and -2,50 KJ/mol;  $S$ , 37,02 and 36,77 J/mol.K;  $E_a$ , 24,18 and 15,02 KJ/mol, of the enzyme present in the homogenate before and after purification respectively.

Key-words: Enzymes, Purification process, Aqueous two-phase systems, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Candida guilliermondii*, Rice straw hydrolysate, Cell disruption.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.2.1	Representação esquemática do metabolismo de xilose em leveduras (adaptado de GÍRIO et al., 1994).....	23
Figura 2.3.1	Diagrama de fases genérico para um sistema composto por polímero/sal.....	31
Figura 4.5.1	Moinho de esferas de vidro, refrigerado, empregado no rompimento de células para liberação de G6PD.....	42
Figura 4.9.1	Filtração á vácuo do SDFA para a retenção de esferas de vidro.....	48
Figura 7.1	Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis volume de suspensão celular, velocidade de agitação e tempo de rompimento nas respostas atividade volumétrica de G6PD ( $A_v$ ), proteínas totais ( $P_t$ ), atividade específica de G6PD ( $A_e$ ) e eficiência de rompimento.....	60
Figura 7.2	Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis volume de suspensão celular e tempo de rompimento sobre a resposta atividade volumétrica de G6PD ( $A_v$ ).....	62
Figura 7.3	Atividade volumétrica de glicose-6-fosfato desidrogenase em função do volume de suspensão celular e do tempo de rompimento empregando uma velocidade de agitação de 400 rpm.....	65
Figura 7.1.1	Influência do tempo de rompimento empregando moinho de esferas de vidro sobre as atividades volumétrica (A) e específica (B) de G6PD, proteínas totais liberadas (C) e porcentagem de rompimento celular (D) de uma suspensão celular de 6,0 g/L na presença de inibidores de proteases.....	67
Figura 7.1.2	Influência do tempo de rompimento de células, empregando moinho de esferas de vidro, sobre a atividade volumétrica e específica de G6PD, proteínas totais liberadas e porcentagem de rompimento celular de uma suspensão celular de 6,0 g/L na presença (-●-) ou ausência (-○-) de inibidores de proteases.....	69
Figura 7.1.3	Influência do tempo de rompimento de células, empregando moinho de esferas de vidro, sobre a atividade volumétrica e específica de G6PD, proteínas totais liberadas e porcentagem de rompimento celular de uma suspensão celular de 11,0 g/L na presença (-●-) ou ausência (-○-) de inibidores de	



	proteases.....	71
Figura 7.2.1.1	Curvas binodais para os sistemas PEG 400 /fosfato; PEG 1000/fosfato e PEG 1500/fosfato em água, a 25°C e pH 7,5.....	73
Figura 7.2.2.1	Gráfico do comprimento de linha de amarração (TLL) em função da concentração de PEG 400 (% p/p).....	75
Figura 7.2.2.2	Gráfico do comprimento de linha de amarração (TLL) em função da concentração de PEG 1000 (% p/p).....	75
Figura 7.2.2.3	Gráfico do comprimento de linha de amarração (TLL) em função da concentração de PEG 1500 (% p/p).....	76
Figura 7.3.1	Valores de atividade volumétrica de G6PD (A), proteínas totais (B) e atividade específica de G6PD (C) nas fases topo e fundo dos ensaios realizados com homogeneizado clarificado.....	78
Figura 7.3.2	Valores de atividade volumétrica de G6PD (A), proteínas totais (B) e atividade específica de G6PD (C) nas fases topo e fundo dos ensaios realizados com homogeneizado não clarificado.....	80
Figura 7.3.3	Valores de atividade volumétrica de G6PD (A), proteínas totais (B) e atividade específica de G6PD (C) nas fases topo e fundo dos ensaios de integração do rompimento celular ao SDFA realizados em escala reduzida (tubo de centrífuga graduado)...	82
Figura 7.3.1.1	Coeficiente de partição de G6PD ( $K_e$ ) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida..	87
Figura 7.3.1.2	Coeficiente de partição de proteínas ( $K_p$ ) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida..	87
Figura 7.3.1.3	Fatores de purificação de G6PD na fase topo (FPt) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida..	89
Figura 7.3.1.4	Fatores de purificação de G6PD na fase fundo (FPf) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de	

	rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida..	89
Figura 7.3.1.5	Rendimentos de G6PD na fase topo (Yet) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida..	91
Figura 7.3.1.6	Rendimentos de G6PD na fase fundo (Yef) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida..	91
Figura 7.3.1.7	Balanço de atividade de G6PD (BA) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida.....	92
Figura 7.3.1.8	Balanço de proteínas (BP) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida.....	92
Figura 7.3.2.1	Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis comprimento de linha de amarração (1) e massa molar de PEG (2) sobre as resposta $FP_t$ , $FP_f$ , $Ye_t$ e $Ye_f$ dos ensaios em SDFA realizados com a integração do processo de rompimento celular.....	95
Figura 7.3.3.1	Superfície de Resposta descrita pelo modelo da equação 18, que representa o fator de purificação da enzima G6PD na fase fundo ( $FP_f$ ) em condições otimizadas das variáveis comprimento de linha de amarração (TLL%) e massa molar de PEG (MM).....	100
Figura 7.3.4.1	Sistema de Duas Fases Aquosas integrado ao rompimento das células de <i>Candida guilliermondii</i> para a extração da enzima G6PD (sistema 4).....	103
Figura 7.4.1.1	Valores da atividade catalítica da enzima G6PD presente no homogeneizado inicial e da enzima presente na fase fundo (rica em sal) após o processo de extração em função da concentração do substrato.....	104
Figura 7.4.1.2	Curva correspondente ao inverso dos valores das atividades de G6PD ( $1/V$ ) em função do inverso das concentrações do substrato ( $1/S$ ) antes da extração.....	105

Figura 7.4.1.3	Curva correspondente ao inverso dos valores das atividades de G6PD ( $1/V$ ) em função do inverso das concentrações do substrato ( $1/S$ ) após a extração.....	106
Figura 7.4.1.4	Curva correspondente ao inverso dos valores das atividades de G6PD ( $1/V$ ) em função do inverso das concentrações do cofator ( $1/S$ ) antes da extração.....	107
Figura 7.4.1.5	Curva correspondente ao inverso dos valores das atividades de G6PD ( $1/V$ ) em função do inverso das concentrações do cofator ( $1/S$ ) após a extração.....	107
Figura 7.4.2.1	Variação da atividade enzimática de G6PD em função da temperatura.....	110
Figura 7.4.2.2	Curvas correspondentes ao logaritmo neperiano das atividades de G6PD ( $1/V$ ) presente no homogeneizado inicial livre de células e após a extração em função do inverso das temperaturas absolutas ( $1/T$ ).....	112
Figura 7.5.1	Fluxograma das etapas necessárias para a purificação da enzima G6PD a partir de células de <i>Candida guilliermondii</i> : A) processo convencional rompimento-clarificação-extração em SDFA; B) processo convencional rompimento-extração em SDFA; C) processo de integração do rompimento celular a extração de G6PD por SDFA em escala reduzida; D) processo de integração do rompimento celular a extração de G6PD por SDFA em escala ampliada.....	117

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.5.1	Matriz do planejamento fatorial $2^3$ empregado no estudo de rompimento celular.....	43
Tabela 4.7.1	Composição dos sistemas utilizados para a determinação do comprimento de linha de amarração (TLL%).....	45
Tabela 4.8.1	Matriz do planejamento fatorial $2^2$ empregada no estudo da extração de G6PD em Sistemas de Duas Fases Aquosas.....	47
Tabela 7.1	Estudo do reator de rompimento empregando um planejamento experimental $2^3$ .....	58
Tabela 7.2	Atividades volumétricas de G6PD ( $A_v$ ) obtidas no planejamento experimental $2^2$ com composição em face centrada para avaliar a influência do volume de suspensão celular e tempo de rompimento na liberação da enzima de <i>S. cerevisiae</i> .....	61
Tabela 7.3	ANOVA para o modelo matemático do processo de rompimento celular em moinho de esferas de vidro para a obtenção da enzima G6PD.....	63
Tabela 7.1.1	Ensaio de rompimento realizados na presença ou não de inibidores de proteases nos tempos de 5, 10 e 15 minutos.....	68
Tabela 7.1.2	Análise de variância (ANOVA) dos efeitos sobre a resposta atividade volumétrica de G6PD.....	68
Tabela 7.3.1.1	Parâmetros de extração referentes aos ensaios do planejamento fatorial $2^2$ , empregando homogeneizado clarificado (na ausência de fragmentos celulares).....	83
Tabela 7.3.1.2	Parâmetros referentes aos ensaios do planejamento fatorial $2^2$ , empregando homogeneizado não clarificado (na presença de fragmentos celulares).....	84
Tabela 7.3.1.3	Parâmetros referentes aos ensaios do planejamento fatorial $2^2$ , empregando integração de processos em escala reduzida.	86
Tabela 7.3.2.1	Planejamento fatorial $2^2$ empregado para avaliar o efeito da TLL e da massa molar de PEG na extração de G6PD por SDFA integrada ao rompimento celular em escala reduzida....	94
Tabela 7.3.3.1	Planejamento fatorial $2^2$ com face centrada dos ensaios de extração de G6PD em SDFA em processos integrados (escala reduzida).....	97

Tabela 7.3.3.2	Efeito estimado, teste <i>t</i> (Student), valores de do planejamento completo 2 <sup>2</sup> com face centrada e 3 repetições no ponto central para avaliar a purificação de G6PD obtida com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA.....	98
Tabela 7.3.3.3	Análise de variância (ANOVA) dos fatores significativos ao processo de integração do rompimento celular a extração de G6PD em SDFA em escala reduzida.....	99
Tabela 7.3.4.1	Quantidade necessária de cada componente do sistema para a extração da enzima G6PD em SDFA integrado ao rompimento celular.....	101
Tabela 7.3.4.2	Resultados dos ensaios de integração de SDFA ao rompimento celular visando à purificação de G6PD em escala ampliada.....	102
Tabela 7.4.1.1	Parâmetros cinéticos para G6PD de <i>C. guilliermondii</i> utilizando o substrato G6PD e o cofator NADP <sup>+</sup> .....	108
Tabela 7.4.2.1	Valores dos parâmetros termodinâmicos encontrados para a enzima G6PD no homogeneizado inicial livre de células e após extração em SDFA integrado ao processo de rompimento celular.....	112
Tabela 7.5.1	Valores dos parâmetros dos ensaios de extração em SDFA visando à purificação de G6PD a partir de células de <i>Candida guilliermondii</i> .....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Atividade de G6PD (U/L)
$A_0$	Atividade inicial de G6PD (U/L)
$A_{0, \text{máx}}$	Atividade inicial de G6PD máxima (U/L)
BA	Balço de atividade de G6PD (%)
BP	Balço de proteínas totais (%)
DO	Densidade ótica
E	Eficiência de rompimento (%)
$E_a$	Energia de ativação (J/mol)
FP	Fator de purificação
G	Energia livre de ativação da atividade de G6PD (kJ/mol)
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
$H$	Constante de Planck (J/min)
H	Entalpia de ativação da atividade de G6PD (kJ/mol)
$k_B$	Constante de Boltzmann (J/K)
K	Coefficiente de partição
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten ( $\mu\text{M}$ )
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
P	Concentração de proteínas totais (mg/L)
PEG	Polietilenoglicol
R	Constante dos gases ideais (J/mol.K)
RA	Rendimento em atividade enzimática (%)
RP	Rendimento em proteína total (%)

S	Entropia de ativação de G6PD (J/mol.K)
S	Seletividade
SDFA	Sistemas de duas fases aquosas
T	Temperatura (°C ou K)
TLL	Comprimento de linha de amarração (%)
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima da enzima G6PD (U/L)
Yet, Yef	Rendimento de G6PD nas fases topo e fundo (%)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD).....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Importância metabólica .....	22
2.2.2 Principais aplicações.....	24
2.2.3 Métodos para liberação da enzima .....	25
2.2.4 Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase .....	26
<b>2.3 SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS.....</b>	<b>27</b>
2.3.1 Diagrama de fases.....	30
2.3.2 Polietilenoglicol (PEG) .....	33
2.3.3 Solutos de baixa massa molar.....	34
2.3.4 Fatores que influenciam a partição de biomoléculas em SDFA.....	34
2.3.5 Efeito da adição de suspensões biológicas em SDFA .....	36
2.3.6 Aplicação de planejamentos experimentais em SDFA.....	37
<b>2.4 PROCESSO DE INTEGRAÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 OBTENÇÃO, CONCENTRAÇÃO E TRATAMENTO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 MICRORGANISMOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO DO INÓCULO DE <i>Candida guilliermondii</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO E PREPARO DO HOMOGENEIZADO DE <i>Candida guilliermondii</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5 ROMPIMENTO CELULAR PARA OBTENÇÃO DE G6PD .....</b>	<b>41</b>
<b>4.6 CONSTRUÇÃO DA CURVA BINODAL .....</b>	<b>43</b>
<b>4.7 DETERMINAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES DO SISTEMA EM EQUILÍBRIO (TLL).....</b>	<b>44</b>
<b>4.8 EXTRAÇÃO DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS .....</b>	<b>45</b>
<b>4.9 INTEGRAÇÃO DAS ETAPAS DE ROMPIMENTO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO VISANDO À PURIFICAÇÃO DA ENZIMA G6PD.....</b>	<b>47</b>



4.9.1 Escala reduzida do processo de integração das etapas de rompimento a extração por SDFA visando à purificação da enzima G6PD .....	47
4.9.2 Escala ampliada do processo de integração das etapas de rompimento a extração por SDFA visando à purificação da enzima G6PD .....	48
<b>5 MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>49</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR .....	49
5.2 EFICIÊNCIA DE ROMPIMENTO .....	49
5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS .....	49
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE .....	50
5.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS .....	50
5.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS .....	51
<b>6 ANÁLISE DE RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
6.1 RENDIMENTO EM PROTEÍNA TOTAL .....	53
6.2 RENDIMENTO EM ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	53
6.3 FATOR DE PURIFICAÇÃO DA G6PD .....	54
6.4 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO .....	54
6.5 SELETIVIDADE .....	55
6.6 DETERMINAÇÃO DO DESVIO PADRÃO NOS ENSAIOS DE EXTRAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS REFERENTE À ATIVIDADE DA ENZIMA G6PD E A QUANTIDADE DE PROTEÍNAS TOTAIS .....	55
6.7 METODOLOGIA ESTATÍSTICA .....	56
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
7.1 ESTUDO DO ROMPIMENTO CELULAR EM MOINHO DE ESFERAS DE VIDRO .....	57
7.1.1 Influência dos inibidores de proteases durante o rompimento celular e liberação da enzima G6PD e das proteínas totais .....	66
7.2 ESTUDO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS .....	72
7.2.1 Obtenção dos diagramas de fases .....	72
7.2.2 Obtenção dos comprimentos de linha de amarração (TLL) .....	74
7.3 EXTRAÇÃO DE G6PD EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA) .....	76
7.3.1 Comparação entre os processos de extração por SDFA convencional ao processo de integrado em escala reduzida .....	83

7.3.2 Análise estatística dos ensaios de extração de G6PD em sistema de duas fases aquosas (SDFA) empregando integração de processos em escala reduzida .....	93
7.3.3 Otimização do processo de extração de G6PD por SDFA integrado ao rompimento celular em escala reduzida .....	96
7.3.4 Integração do rompimento das células de <i>Candida guilliermondii</i> a extração de G6PD em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) em escala ampliada empregando moinho de esferas de vidro .....	101
<b>7.4 ESTUDO CINÉTICO E TERMODINÂMICO DE G6PD.....</b>	<b>104</b>
7.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos .....	104
7.4.2 Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	110
<b>7.5 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO DE G6PD EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS A PARTIR DAS CÉLULAS DE CANDIDA GUILLIERMONDII .....</b>	<b>114</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>118</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>129</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>136</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>137</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os resíduos agrícolas e florestais têm sido utilizados como matéria-prima para a geração de energia, ração animal e principalmente como fonte de carboidratos em processos de bioconversão. A utilização destes resíduos se deve à necessidade da diminuição do impacto adverso na natureza e ao aumento do aproveitamento racional de fontes renováveis. O emprego de processos biotecnológicos para modificação destas matérias-primas (conversão microbiológica ou enzimática) constitui o objetivo de estudo de vários grupos de pesquisa no Brasil e em outros países.

A utilização de materiais lignocelulósicos somente terá interesse comercial se todas as suas frações forem devidamente aproveitadas, principalmente a fração hemicelulósica, haja vista que apenas o componente celulósico tem sido tradicionalmente utilizado em processos industriais. A fração hemicelulósica, ao contrário da fração celulósica, apresenta variações quanto a sua estrutura e composição sendo composta basicamente de hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), pentoses (D-xilose e L-arabinose), ácidos D-glicorônicos e grupos acetilas. A xilose, principal componente desta fração, tem sido amplamente utilizada em processos de bioconversão visando à obtenção de produtos como: combustíveis líquidos, aditivos alimentares, ácidos orgânicos, proteína microbiana, pigmentos e várias enzimas de interesse comercial.

Devido à expansão do uso industrial de enzimas, tem surgido grande interesse, nos últimos anos, na produção das mesmas. A maioria das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana, sendo que, cerca de 80% do mercado é dominado pelas proteases e amilases. Tais enzimas se caracterizam pelo elevado volume de produção e baixo custo. Recentemente, o mercado para enzimas microbianas intracelulares tem se mostrado lucrativo, principalmente na área da saúde como reativos em diagnóstico clínico e em biotransformação de produtos químicos e farmacêuticos.

A glicose-6-fosfato desidrogenase, G6PD (EC 1.1.1.49), é um importante exemplo de enzima microbiana utilizada em diagnóstico clínico. Essa enzima desempenha um papel fundamental na via das pentoses fosfato, a qual catalisa a

oxidação da glicose 6-fosfato (G6P) em 6-fosfoglicolactona, gerando cofatores reduzidos (NADPH). A G6PD é importante em estudos bioquímicos e médicos, apresentando grande interesse como reagente analítico, pois pode ser usada em diversas análises quantitativas. Embora possa ser encontrada em diversos tecidos animais e vegetais, o uso de microrganismos como fonte de enzimas é bastante atraente devido à possibilidade da utilização de matérias-primas renováveis para o cultivo desses.

A produção de enzimas intracelulares constitui um dos principais problemas práticos para os processos de separação de biomoléculas. Geralmente, esses produtos são liberados por rompimento químico ou mecânico, seguidos da remoção de fragmentos celulares e alguns contaminantes, seja por centrifugação em alta velocidade ou através de membrana de filtração, porém estas operações unitárias podem dificultar a aplicação do processo em larga escala. Desta forma, a redução do número de etapas utilizadas na purificação de produtos biotecnológicos é de fundamental importância na viabilidade do processo. Embora pouco estudada, a integração entre as etapas de obtenção e purificação de biomoléculas pode contribuir sobremaneira com a redução de custos e aumento na qualidade do produto. Os processos integrados são mais produtivos, de maior rendimento e geram produtos mais competitivos. Além disso, com a crescente expansão do mercado de enzimas, principalmente as enzimas de diagnóstico clínico, há um incentivo econômico em se considerar processos de separação que sejam vantajosos em relação aos custos operacionais e especialmente aos valores dos materiais. No entanto, é importante a obtenção de um ambiente biocompatível que permita a aplicação de critérios rigorosos de separação sem prejudicar o rendimento do produto final. Em casos como a purificação de enzimas por sistemas de duas fases aquosas (SDFAs), ambos os fatores são relevantes.

O presente trabalho está inserido em uma linha de pesquisas que visa ao aproveitamento da xilose presente na fração hemicelulósica de resíduos agrícolas por via biotecnológica. Nessa linha de pesquisa o Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena - USP vem desenvolvendo, em cooperação com o Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, estudos de obtenção e purificação de diferentes enzimas intracelulares, tais como: xilose redutase e xilitol desidrogenase. Em continuidade a estas pesquisas,

estudos referentes à produção de glicose-6-fosfato desidrogenase, por processo fermentativo, a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz utilizando a levedura *Candida guilliermondii*, foram conduzidos. Os bons resultados obtidos confirmam o potencial desta levedura na produção da enzima em substratos de baixo custo associada à produção de xilitol, um produto metabólico extracelular com aplicações em diferentes segmentos industriais.

Dentro do contexto da necessidade de redução de custos dos processos de purificação utilizando operações integradas, o presente trabalho objetivou o estudo do processo de extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos integrado ao rompimento celular de *Candida guilliermondii* cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, visando à obtenção e purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos são acumulados no mundo em grandes quantidades sob a forma de resíduos agrícolas e florestais. Devido a sua natureza renovável e ao seu baixo custo, estes materiais têm sido amplamente utilizados como matéria-prima para a geração de energia, ração animal e principalmente como fonte de carboidratos em processos de bioconversão (KUHAD; SINGH, 1993). As frações celulósicas e hemicelulósicas são consideradas como as mais abundantes fontes de carbono renováveis e para que a biomassa lignocelulósica seja utilizada de modo eficiente, é necessário o desenvolvimento de processos de bioconversão economicamente viáveis (BROWNELL; NAKAS, 1991). Dentre os materiais lignocelulósicos considerados como potenciais fontes alternativas para geração de diferentes produtos de interesse econômico e social, podem ser destacados o bagaço de cana-de-açúcar e a palha de diversos cereais (DU TOIT et al., 1984; WILKE et al., 1981).

A palha de arroz é um dos principais resíduos de cereais produzidos em grandes quantidades, anualmente, no mundo. Nos países em desenvolvimento estes resíduos são pouco utilizados, embora possam ser empregados na fabricação de papéis ou na suplementação de ração animal (SUN et al., 2000). Este resíduo é constituído por uma fração hemicelulósica que representa cerca de 30% do seu valor em massa seca (SUN et al., 2000). Tal fração é composta basicamente de hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), pentoses (D-xilose e L-arabinose), ácidos D-glicorônicos e grupos acetilas (KUHAD; SINGH, 1993). A fração hemicelulósica deste resíduo tem sido utilizada principalmente, em estudos visando à obtenção de xilitol e etanol (ROBERTO, 1997; SILVA, 2007), porém estudos recentes mostram o potencial deste resíduo para obtenção de enzimas intracelulares a partir de leveduras (MAYERHOFF, 2002; GURPILHARES et al., 2006).

## 2.2 GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD)

### 2.2.1 Importância metabólica

A glicose-6-fosfato desidrogenase, G6PD (E.C.1.1.1.49) é uma enzima chave da via das pentoses fosfato, via alternativa para o metabolismo de glicose. A primeira reação desta via é a desidrogenação enzimática da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfato desidrogenase, em presença de  $\text{NADP}^+$ , formando 6-fosfoglicono- $\delta$ -lactona, um éster intramolecular. O NADPH formado, produto importante da reação que esta enzima catalisa, é utilizado em síntese de ácidos graxos, colesterol, esteróides, alguns aminoácidos, além de proteger as células de agentes oxidantes com a produção de glutathiona reduzida. Este cofator é necessário na manutenção de uma atmosfera redutora em células expostas a elevadas concentrações de radicais de oxigênio, ou seja, ânions peróxido e superóxido (LEHNINGER et al., 1995; ÇİFTÇİ et al., 2003).

Em seres humanos, a deficiência da enzima G6PD configura uma patologia conhecida como anemia hemolítica. Esta deficiência promove a diminuição dos eritrócitos devido à incapacidade das células regenerarem o NADPH, cofator importante nos processos biológicos oxidativos (VIEIRA-NETO et al., 1999).

Na Figura 2.2.1 é mostrado um esquema proposto por Gírio et al. (1994) que representa o metabolismo de xilose em leveduras.

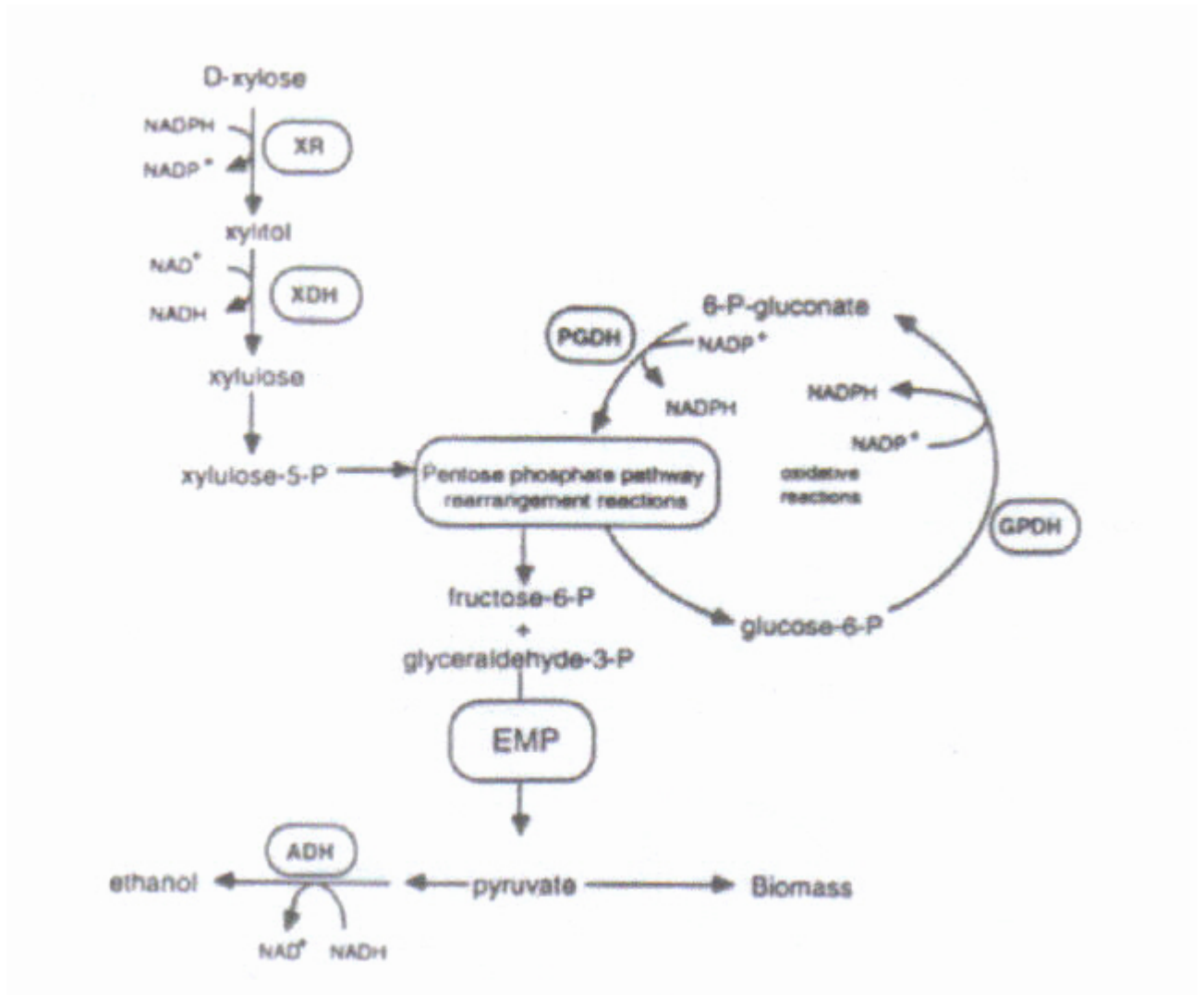


Figura 2.2.1. Representação esquemática do metabolismo de xilose em leveduras (adaptado de GÍRIO et al., 1994)



O metabolismo de xilose em leveduras também está relacionado à produção de cofatores NADPH pela via das pentoses fosfato (GRANSTRÖM et al., 2001). As duas primeiras enzimas da via de metabolização de xilose são: xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) (VERDUYN et al., 1985; RIZZI et al., 1988). O equilíbrio termodinâmico de ambas as reações favorece a formação de xilitol (RIZZI et al., 1988). Segundo Kotter et. al. (1993), a formação de xilitol pode ser resultado do desequilíbrio entre os cofatores NADPH, consumidos na reação de XR, e NADH, produzidos na reação XDH. Eliasson et al. (2000) relatou um favorecimento no rendimento em etanol a partir de xilulose em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com baixa atividade de fosfoglicose isomerase (PGI) ou com a remoção do gene GND1, o qual codifica 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH). Tal fato sugere que, o aumento observado no rendimento de etanol nestas cepas poderia estar relacionado à alteração no fluxo da via das pentoses fosfato. De acordo com estudos realizados por Jeppsson et al. (2002), o aumento no rendimento de etanol e decréscimo no rendimento de xilitol é devido à diminuição do fluxo de NADPH, produzido na via das pentoses. Tal via foi bloqueada pela quebra do gene GND1, um dos isógenos da 6-fosfogluconato desidrogenase, ou pela quebra do gene ZWF1, o qual codifica glicose-6-fosfato desidrogenase. A partir destes estudos, os autores concluíram que a baixa taxa de fermentação de xilose é, provavelmente, devido à limitada quantidade de NADPH disponível para a redução da xilose. Estes resultados indicam que a produção de xilitol está fortemente ligada à parte oxidativa da via das pentoses fosfato.

### **2.2.2 Principais aplicações**

Além da importância em estudos bioquímicos e médicos (SEVERO, 1979; LEITE, 1989), a enzima G6PD apresenta grande interesse como reagente analítico, pois pode ser usada em diversas análises quantitativas, incluindo medidas de atividade da hexoquinase e creatina-quinase, concentrações de ATP e hexoses (BERGMEYER, 1984). De acordo com Chatel et al. (1996), a G6PD pode identificar e quantificar, de forma eficiente e precisa, moléculas de glicose liberadas após

hidrólise do amido em sucos, mesmo em presença de pedaços de frutas, compostos coloridos e elevadas concentrações de sacarose.

A enzima G6PD tem sido também empregada na 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). Outra aplicação seria a confecção de biossensores visando ao rápido monitoramento da concentração de G6P 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).

### **2.2.3 Métodos para liberação da enzima**

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase pode ser encontrada em quase todos os tecidos de origem animal e vegetal e em células de microorganismos, sendo abundante em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (ROSSI et al., 2002). No entanto, a purificação dessa enzima requer como etapa inicial, o rompimento das células para a sua liberação. Dentre as diversas técnicas empregadas destacam-se: o rompimento mecânico com esferas de vidro (ABRAHÃO-NETO et al., 1997; RICCI-SILVA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; SOUZA et al., 2002) e o rompimento por ultrassom (GRANSTROM et al., 2001; OZBEK; ULGEN, 2000).

O rompimento mecânico envolve rápida agitação da suspensão celular com esferas de vidro. Este método é eficiente para aplicação em leveduras e fungos filamentosos, os quais possuem paredes celulares rígidas, formadas principalmente por polissacarídeos, 80 a 90% (RICCI-SILVA et al., 2000). Esse processo apresenta ainda um custo relativamente baixo, sendo empregado no rompimento de células para a obtenção de alguns produtos em larga escala (WOODROW; QUIRK, 1982).

O método de sonificação ocorre através do fenômeno de cavitação, ou seja, a vibração de ultrassom é transmitida através da suspensão proporcionando, assim, o

rompimento das células. Embora também empregado para a liberação de G6PD, o método de sonificação tem mostrado interferir na estabilidade desta enzima. Segundo Özbek e Ülgen (2000) o comportamento da estabilidade de diferentes enzimas varia com o tipo e a sua localização dentro da célula, massa molar e fonte de obtenção (microbiana ou tecidos animais). Neste estudo, os autores constataram que o processo de sonificação com 40 W de potência causou um decréscimo de 70% na atividade de G6PD.

Contudo, o método escolhido deve proporcionar, além de eficiente rompimento celular, eficaz liberação da biomolécula-alvo no homogeneizado e a possibilidade de aumento de escala com reduzido custo.

#### 2.2.4 Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase

A glicose-6-fosfato desidrogenase foi primeiramente isolada de eritrócitos humanos por Yoshida (1966 apud<sup>1</sup> COHEN; ROSEMEYER, 1969). Nos anos seguintes, a enzima começou a ser purificada através de materiais de troca iônica usando-se substratos naturais, glicose-6-fosfato e NADP<sup>+</sup>, resultando em um alto grau de purificação (MORELLI et al., 1978; LEVY, 1979). Yüregir et. al. (1994) purificaram a enzima de eritrócitos humanos usando colunas cromatográficas Sephacryl-300, Celulose DE-52 e Celulose CM-52. A cromatografia de afinidade 2'-5'-ADP-Sepharose, usada pela primeira vez por De Flora e co-autores, é uma técnica comum para a purificação de G6PD (LEVY, 1979). Ulusu et al. (1999) purificaram essa enzima em duas etapas: cromatografia de afinidade, 2'-5'-ADP-Sepharose e cromatografia de troca iônica, DEAE-Sepharose. O rendimento alcançado foi de 37%, próximo ao valor encontrado por Çiftçi et. al. (2003), 31%, empregando somente cromatografia de afinidade 2'-5'-ADP-Sepharose.

A maioria das pesquisas reporta resultados obtidos de técnicas cromatográficas. No entanto, técnicas alternativas de purificação de biomoléculas, que sejam mais adequadas para a aplicação em processos industriais, têm sido desenvolvidas. Hasmann et al. (2007) obtiveram um rendimento de 114% em estudos de purificação de G6PD de células de *Saccharomyces cerevisiae*

---

<sup>1</sup>YOSHIDA, A. *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 4966.

empregando extração líquido-líquido por micelas reversas. Rangel-Yagui et al. (2003), com sistemas micelares aquosos, alcançaram um rendimento de 71% de G6PD na fase topo do sistema composto por C10E4/C(10)TAB, com coeficiente de partição de 7,7. A simplicidade da extração líquido-líquido e a facilidade no aumento de escala fazem do sistema de duas fases aquosas um processo de purificação bastante atrativo em diversas aplicações industriais (GAIKAR et al., 1996; COSTA et al., 1998). A purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* em S DFA por processo descontínuo utilizando PEG/citrato e PEG/fosfato alcançou bons resultados, com valores de recuperação próximos a 100% (OLIVEIRA et al., 2001; RIBEIRO, 2001).

### 2.3 SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Existem dois fatores principais que influenciam o desenvolvimento e a escolha do processo de separação ou processos de recuperação (*downstream processing*). Primeiro, com o aumento na demanda de plantas de produção de enzimas há um incentivo econômico em se considerar processos de separação que sejam vantajosos em relação aos custos operacionais e especialmente aos valores dos materiais. O segundo fator importante é a necessidade de se obter um ambiente biocompatível que permita a aplicação de critérios rigorosos de separação sem prejudicar o rendimento do produto final. No caso da purificação de enzimas por S DFA, ambos os fatores são relevantes (WEATHERLEY, 1994).

A extração por solvente orgânico, como um processo de *downstream*, pode ser utilizada na separação ou purificação contínua de compostos presentes em misturas complexas (WEATHERLEY, 1994). No entanto, para enzimas, tais sistemas não são adequados devido à sensibilidade dessas moléculas à desnaturação promovida pelos solventes orgânicos (PESSOA; KILIKIAN, 2005). Por outro lado, a extração em duas fases aquosas, empregando polímeros e sais, oferece um ambiente favorável à separação de enzimas devido à presença de água em ambas as fases do processo (fase superior e fase inferior), importante requisito na manutenção das propriedades das biomoléculas.

As extrações por SDFAs baseiam-se nos mesmos princípios do processo químico de extração líquido-líquido que utilizam solventes orgânicos. Devido a essa semelhança, equipamentos comercialmente disponíveis podem ser utilizados para mistura e separação de fases destes sistemas. Entretanto, as propriedades físicas dos SDFAs são muito diferentes daquelas apresentadas por sistemas solvente-água. A diferença mais notável é a menor tensão interfacial.

Sistemas de duas fases aquosas são preparados adicionando-se soluções aquosas de dois polímeros, ou um polímero e um sal, de modo que cada componente do sistema, após homogeneização, concentre-se em uma das fases, favorecendo, assim, a partição de biomoléculas como proteínas, células, fragmentos celulares ou ácidos nucleicos. A purificação significativa é alcançada quando a molécula-alvo encontra-se em uma das fases, enquanto outras biomoléculas, substâncias interferentes do processo de purificação, migram para a outra fase do sistema (OLIVEIRA et al., 2001). O uso de sistemas de duas fases aquosas para a separação de biomoléculas pode ser economicamente favorável devido à facilidade de ampliação de escala e por ser uma operação rápida se comparada às técnicas convencionais. O investimento e os custos operacionais são baixos, sendo que custos com materiais podem ser efetivamente reduzidos com a reciclagem dos polímeros (ASENJO, 1991).

De modo geral, para que ocorra a purificação de uma biomolécula intracelular é necessário: rompimento das células, adição dos componentes formadores das fases (ex. PEG/sal), ajuste de pH e mistura da suspensão para que o equilíbrio seja alcançado. Em maior escala, este procedimento é realizado em reatores e a baixa tensão interfacial do sistema faz com que uma pequena quantidade de energia seja requerida. O alcance do equilíbrio é rápido ( $\leq 30$  s) quando os componentes são misturados com agitação. As fases se separam em fase superior (topo) e fase inferior (fundo). Geralmente, a fase superior é composta por maior concentração de polímero e a inferior por maior concentração de sal. Esta separação pode ser alcançada por ação da gravidade ou ser acelerada por processo de centrifugação. A centrifugação é recomendada se a viscosidade for alta ou a diferença de densidade entre as fases for baixa.

A re-extração pode ser empregada após a etapa de separação inicial, misturando a fase de topo com sais para a obtenção de um sistema de fases secundário. As condições são selecionadas de modo que a proteína de interesse

seja particionada na fase fundo e possa, em seguida, ser processada após a separação de fases. Alguns procedimentos possíveis para serem utilizados após o isolamento de proteínas por SDFAs são: centrifugação, adsorção, ultrafiltração e eletroforese. Em processos de larga escala, ultrafiltração e diálise são usadas para concentrar e acondicionar o produto a partir da fase fundo secundária. Com isso, a fase topo pode ser reciclada e a fase fundo pode ser aplicada, sob certas condições, a um suporte cromatográfico, como matrizes de interação hidrofóbica (KULA; SELBER, 1999).

Normalmente, a extração é realizada em processo descontínuo, mas a utilização do processo contínuo pode ser uma alternativa. De acordo com Sarubbo et al. (2003) ao empregar SDFA para a purificação de proteínas em larga escala, deve-se considerar o modo contínuo de operação contra-corrente no planejamento do processo. Este modo de operação permite a redução de custos fixos e variáveis, aumento do rendimento relacionado a espaço e tempo, reciclagem contínua dos reagentes utilizados além de proporcionar altos rendimentos e possibilitar a automação do processo. A cromatografia contra-corrente (CCC) é essencialmente uma forma de extração líquido-líquido cromatográfica. Apresenta característica singular, quando comparada a outros métodos cromatográficos, uma vez que não utiliza suporte sólido. No entanto, uma fase líquida estacionária é retida em um tubo coloidal com várias camadas no qual o efeito de Arquimedes (parafuso) é aplicado através de um campo com força centrífuga rotacional (YANAGIDA et al., 2004). Equipamentos com um ou vários estágios de extração líquido-líquido convencional podem ser aplicados ao processo de extração usando SDFAs (SARUBBO et al., 2003).

Nos últimos anos, tem-se observado significativo crescimento nas aplicações e em pesquisas empregando SDFA, sendo estes utilizados na purificação de enzimas industriais e de outras espécies biologicamente ativas. A tecnologia tem se expandido na obtenção de biocatalisadores (MAYERHOFF et al., 2004), enzimas analíticas (SRINIVAS et al., 2002) e proteínas de interesse farmacêutico (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2004). Em adição à separação de enzimas, sistemas de duas fases aquosas são utilizados na separação de DNA e partículas virais (JOHANSSON, 1985; ALBERTSSON, 1986). Alguns trabalhos relatam o potencial de SDFA na recuperação de produtos com alto valor protéico dos efluentes provenientes de indústrias alimentícias e de bebidas (WEATHERLEY, 1994).

### 2.3.1 Diagrama de fases

O Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) é representado, principalmente, por um dos seguintes sistemas: (i) polímero-polímero, (ii) polímero-sal e (iii) outros SDFA. No caso de sistemas compostos por polímero-polímero (ex. polietilenoglicol-dextrana), o elevado custo de um destes polímeros (como no caso da dextrana) condiciona a sua aplicação a processos em que os custos do produto de interesse se sobreponham ao dos reagentes utilizados. Devido às vantagens, como baixo custo, curto tempo para a separação das fases, os sistemas polímero-sal são comumente usados (ex. polietilenoglicol, PEG, e fosfato) (RITO-PALOMARES, 2004). Além disso, para a utilização de SDFA é necessário o conhecimento do comportamento das fases no sistema, o que pode ser obtido através do “diagrama de fases”.

A literatura apresenta curvas de equilíbrio entre as fases líquidas para diversos SDFA, em especial PEG/dextrana e PEG/sal. Porém, como os diagramas são específicos para cada sistema e condição (pH, temperatura e massa molar dos polímeros), freqüentemente é necessário determiná-las. A Figura 2.3.1 apresenta um diagrama de fases de um sistema formado por polímero-sal. A ordenada representa a composição em massa da molécula que apresenta maior concentração na fase de topo (ex. PEG) e a abscissa representa a composição da molécula de maior concentração na fase de fundo (ex. sal). Composições representadas por pontos acima da curva de equilíbrio, também denominada “curva binodal”, levam à formação de duas fases ou região bifásica e, abaixo da curva, a uma só fase ou região monofásica. A formação de um SDFA depende, portanto, da concentração dos componentes do sistema (PESSOA; KILIKIAN, 2001).

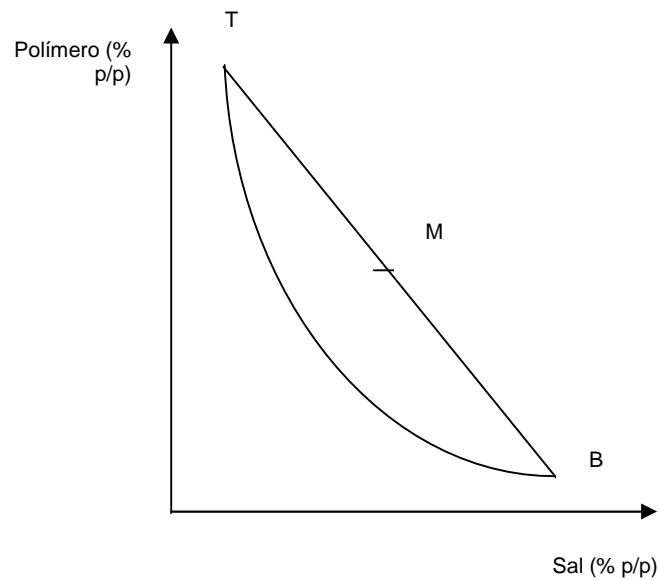


Figura 2.3.1. Diagrama de fases genérico para um sistema composto por polímero/sal

No equilíbrio, o sistema de composição inicial M, passa a apresentar as composições indicadas pelos pontos T (fase superior) e B (fase inferior), de tal modo que ambos os componentes dos sistemas estão presentes nas fases líquidas. A reta TMB é denominada linha de amarração ou “tie-line”. Sistemas cuja composição inicial encontra-se sobre a linha de amarração possuem a mesma composição final nas fases superior e inferior, entretanto a relação de massa entre estas fases é diferente para cada composição inicial. A razão entre os segmentos TM e BM é igual à razão entre as massas de fase inferior e superior.

A curva binodal pode ser obtida empregando um método prático, porém pouco preciso, denominado método de “cloud point” ou titulação. Este método consiste na adição de pequenas gotas de uma solução aquosa de polímero ou sal a outra solução polimérica e, posteriormente, no cálculo da composição da mistura ao atingir a turbidez. O aparecimento da turbidez significa que o sistema está localizado na região bifásica (ZASLAVSKY, 1995).



As linhas de amarração presentes em um diagrama podem ser construídas determinando-se a composição das fases em equilíbrio de um sistema de composição inicial localizado acima da curva binodal. A concentração de polímero pode ser determinada por liofilização. Recolhem-se as fases de topo e fundo, faz-se a liofilização para retirar a água e pesam-se as fases secas. A concentração de sal pode ser determinada por titulação ou calcinação. Análises por HPLC também permitem determinar a concentração do polímero (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

O ponto crítico, o qual corresponde a menor concentração tanto de polímero quanto de sal capaz de proporcionar a formação de um sistema de duas fases, pode ser obtido ao traçar uma curva através dos pontos médios de várias “tie lines” e extrapolar a mesma até o ponto de intersecção com a curva binodal.

Quando um material é particionado em SDFA sob composição total variável deste sistema, torna-se necessário o uso de uma única medida numérica da composição das duas fases. Empiricamente, o comprimento da linha de amarração (TLL) pode ser utilizado como tal medida. O valor de TLL pode ser calculado a partir da concentração de polímero (sal) nas fases coexistentes de acordo com a Equação 1:

$$TLL = \left\{ [C(P)_1 - C(P)_2]^P + [C(Q)_1 - C(Q)_2]^Q \right\}^{0.5} \quad (1)$$

Onde: C(P) é a concentração do polímero P em uma dada fase; C(Q) é a concentração do polímero (ou sal) Q em uma das fases, os números subscritos 1 e 2 denotam as fases coexistentes (superior e inferior) (ZASLAVSKY, 1995).

O conhecimento da curva binodal é essencial para avaliar a influência de parâmetros do sistema como comprimento de linha de amarração, TLL; razão volumétrica das fases,  $V_r$ , e pH; sobre a purificação do produto alvo e, assim, definir as condições de operação do processo em SDFA (RITO-PALOMARES, 2004).

Os principais fatores que influenciam a posição da curva de equilíbrio em um SDFA são: a massa molar do polímero, o tipo de sal e a concentração dos componentes, presença da molécula-alvo, células e fragmentos celulares dentre outros (MERCHUK; ANDREWS; ASENJO, 1998; RITO-PALOMARES; CUETO, 2000; SALABAT, 2001).

### 2.3.2 Polietilenoglicol (PEG)

O polímero mais estudado para aplicação em SDFAs é o polietilenoglicol (PEG), um polímero sintético de alta massa molar disponível em diferentes graus de polimerização. A molécula de PEG apresenta propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas tornando-o solúvel em água e em outros solventes, sendo descrita frequentemente como molécula anfifílica (FARRUGGIA; NERLI; PICÓ, 2003). Este polímero é composto por uma estrutura de subunidades repetidas, denominadas monômeros, sendo encontrado em diversas massas molares e representado pela seguinte fórmula geral:  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ . Apresenta-se como solução incolor ou pasta, para massas molares abaixo de 1000 g/mol, e na forma de pó ou flocos brancos, para massas molares acima de 1000 g/mol. Seu armazenamento pode ser feito à temperatura ambiente (WALTER; BROOKS; FISHER, 1985).

O PEG tem efeito estabilizante sobre proteínas, permitindo que operações de SDFAs sejam realizadas sem resfriamento. Além disso, o baixo calor de solução e a relativa insensibilidade de proteínas à precipitação com PEG, em pequenas variações de temperatura, eliminam a necessidade de controle desta variável (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Em SDFAs, o mecanismo de partição é explicado pela exclusão da proteína do meio rico em polímero para o meio rico em sal, por exemplo. Segundo Albertsson (1986), o efeito da massa molar do polímero, como o PEG, dependerá do tamanho da proteína a ser particionada. Proteínas com elevado peso molecular serão mais influenciados pela mudança na massa molar do polímero.

De acordo Vaidya et al. (2006), a hidrofobicidade do PEG aumenta com o aumento da massa molar. Além disso, verifica-se que quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração necessária para a formação de duas fases, ou seja, a curva de equilíbrio desloca-se no sentido da região monofásica. Para a remoção do PEG de SDFAs, utiliza-se métodos que incluem ultrafiltração, precipitação pela adição de etanol e através da re-extração, ou seja, separação pela formação de duas fases aquosas pela adição de sais (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

### 2.3.3 Solutos de baixa massa molar

O uso de solutos de baixa massa molar, como os sais, auxilia na manutenção da segregação das fases de SDFA. Estes sais alteram a viscosidade entre as duas fases líquidas de um SDFA, bem como a diferença de força iônica (relacionada à condição de menor potencial químico), sobretudo no caso dos sistemas PEG/sal. Ânions monovalentes exercem o efeito de salting-out sobre o PEG, ou seja, a expulsão decorrente do tamanho do PEG. Com relação aos cátions, a substituição de fosfato de sódio por fosfato de potássio, por exemplo, desloca a curva de equilíbrio para a direita, portanto, a concentração dos componentes necessária à formação de duas fases aumenta. Isso sugere que o cátion sódio é mais eficiente que o potássio para exercer efeito salting-out sobre o PEG (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

De modo geral, os sais que possuem uma distribuição diferenciada entre as fases topo e fundo de um SDFA são importantes, pois esses proporcionam diferenças de potencial elétrico entre as fases. Os sais de fosfato apresentam maior afinidade pela fase inferior de um SDFA, o lítio apresenta maior afinidade pela fase superior e o NaCl tem afinidade por ambas fases (HARRIS, 1992).

### 2.3.4 Fatores que influenciam a partição de biomoléculas em SDFA

A partição depende de fatores relacionados à fase polimérica, a composição iônica e a substância particionada. Os fatores relacionados à fase polimérica são: tipo de polímero, seu peso molecular e a presença de certos grupos químicos no polímero (ex. grupos ionizados, hidrofóbicos ou bioespecíficos).

A composição iônica é de grande importância, pois os íons presentes em um sistema determinam o sinal e magnitude do potencial elétrico na interface. Dentre as propriedades da substância que determinam a sua partição estão: tamanho, carga, propriedades hidrofóbicas da superfície e presença de receptores para ligantes bioespecíficos (ALBERTSSON, 1986).

A partição de um soluto, no caso uma biomolécula, entre as fases de um sistema aquoso é descrita pelo coeficiente de partição,  $K$ , definido como a razão

entre as concentrações do soluto na fase superior e inferior. Precisamente, pode-se determinar o coeficiente de partição em um número de fatores, demonstrados na Equação 2:

$$K = K^0 \cdot K_{el} \cdot K_{hfob} \cdot K_{biosp} \cdot K_{tam} \cdot K_{conf} \quad (2)$$

Onde os índices *el*, *hfob*, *biosp*, *tam* e *conf* representam contribuição eletroquímica, hidrofóbica, bioespecífica, tamanho-dependente e conformacional, respectivamente, para o coeficiente de partição. A parte  $K^0$  inclui todos os outros fatores, como a solvatação relativa e geral da molécula do soluto nas fases. A forma logarítmica da relação acima é utilizada quando vários efeitos são estudados (Equação 3):

$$\log K = \log K^0 + \log K_{el} + \log K_{hfob} + \log K_{biosp} + \log K_{tam} + \log K_{conf} \quad (3)$$

Para avaliar a influência de diferentes parâmetros sobre a partição de biomoléculas em processo de SDFA, Rito-Palomares (2004) sugere que seja examinada a purificação do produto na fase superior quando o valor do comprimento de linha de amarração, TLL, é aumentado; e os valores da razão volumétrica ( $V_r=1$ ) e o pH (próximo de 7,0 ou do valor que proporcione maior estabilidade ao produto-alvo) são mantidos constante. Seleciona-se a TLL que resultou maior purificação do produto e em seguida, avalia-se a variação da razão volumétrica (valores devem ser maiores ou menores que 1), mantendo o pH constante. Finalmente, a influência da mudança de pH na purificação do produto é avaliada, mantendo-se a TLL e a  $V_r$  constantes. Esse autor ressalta que, após a manipulação de diferentes parâmetros do sistema se a purificação alcançada não for aceitável, então uma mudança nas condições do sistema selecionado (ex. seleção de sistemas polímero-polímero ou SDFA modificado) necessita ser avaliada.

Alguns trabalhos relacionados à separação de fases em SDFA empregando modelos de sistemas experimentais, caracterizados somente pela presença do produto-alvo, têm sido realizados. Há necessidade de se obter um conhecimento prático a respeito da separação de fases de sistemas polímero-sal, uma vez que os mecanismos que descrevem tais sistemas não foram totalmente esclarecidos (OLIVEIRA et al., 2001).

Publicações recentes têm avaliado do ponto de vista prático, o fenômeno da separação de fases dos sistemas polímero-sal adicionados de suspensão biológica e sua concentração/diluição; a definição da fase contínua em SDFA; o modo de condução do processo (descontínuo ou contínuo) e a geometria do equipamento, que podem influenciar na partição da molécula-alvo. Os processos que utilizam suspensões biológicas complexas requerem, adicionalmente, de uma avaliação da influência desses parâmetros no desempenho de SDFA para facilitar a determinação do modelo de sistema de extração (RITO-PALOMARES e CUETO, 2000).

Cunha et al. (2003) compararam a extração por SDFA em sistema descontínuo e contínuo da enzima extracelular cutinase, selvagem e geneticamente modificada, empregando coluna com disco rotatório perfurado (PRDC). Estes autores concluíram que a extração em sistema contínuo promoveu uma separação 2,5 vezes maior que a extração em sistema descontínuo.

Solano-Castillo e Rito-Palomares (2000) estudaram a influência da razão altura/diâmetro de recipientes e a adição de suspensões biológicas, soro de queijo diluído/não diluído e suspensão de leveduras após rompimento, sobre a cinética de separação de fases em SDFA formado por PEG/fosfato. Os autores observaram que o tempo de separação das fases foi menor ao adicionar suspensões de células rompidas quando comparado à adição de suspensões concentradas. A utilização de recipientes com razão  $A/D < 1,0$  proporcionou uma separação de fases mais rápida que aqueles com  $A/D > 1,0$ .

Assim, torna-se evidente que o desenvolvimento de processos de extração em SDFA, com potencial implementação em escala comercial, necessita da avaliação dos efeitos de diferentes parâmetros do processo sobre o desempenho do modelo de SDFA a ser escolhido.

### **2.3.5 Efeito da adição de suspensões biológicas em SDFA**

Os sistemas de duas fases aquosas (SDFA), principalmente sistemas compostos por polímero-sal (PEG-fosfato), têm sido utilizados com eficácia na purificação de moléculas presentes em meios fermentados e extratos biológicos. Entretanto, para que a aplicação destes sistemas em processos de purificação de

produtos a partir de suspensões biológicas seja eficaz, torna-se necessário o conhecimento das desvantagens do processo associadas às características do material a ser empregado no SDFA (RITO-PALOMARES; HERNANDEZ, 1998).

De acordo com Hudlestone et al. (1991 <sup>2</sup>apud RITO-PALOMARES, 2000), a presença de biomassa em SDFA modifica a posição da curva binodal do diagrama de fases. Os deslocamentos da curva binodal em direção a origem são atribuídos à presença de fragmentos celulares e a polímeros intracelulares, os quais reduzem a quantidade de reagentes necessária para a formação de duas fases.

### 2.3.6 Aplicação de planejamentos experimentais em SDFA

A purificação de um bioproduto por SDFA tem influência de inúmeros fatores como: tipo de polímero, massa molar do polímero, tipo de sal, concentração dos componentes formadores de fase (polímero-sal), pH do sistema, concentração da molécula alvo, temperatura, dentre outros. Devido a essa grande variedade, torna-se laboriosa a definição dos principais fatores que influenciam na purificação do produto-alvo. Adicionalmente, as interações entre esses fatores, devido à complexa inter-dependência entre eles, tornam o emprego do planejamento estatístico de experimentos uma ferramenta importante, o que pode facilitar a avaliação e definição dos fatores significativos.

Marcos et al. (2002) otimizaram a purificação de penicilina acilase de homogeneizado de *Escherichia coli* usando o sistema PEG 3350-citrato de sódio, através de um planejamento fatorial  $2^3$  com composição em face centrada, no qual as variáveis estudadas foram concentrações de PEG, citrato de sódio e de cloreto de sódio. Esses autores, obtiveram fator de purificação de 6,5 e rendimento de 61% da enzima penicilina acilase nas condições otimizadas: 15,1% de PEG 3350, 11,0% de sal citrato de sódio e 8,5% de NaCl.

Mayerhoff et al. (2004) utilizaram um planejamento fatorial  $2^4$  para avaliar a influência das variáveis massa molar de PEG, concentração de PEG, concentração de fosfato e concentração de cloreto de sódio na purificação da enzima xilose redutase de *Candida guilliermondii* em SDFA. Neste estudo, a enzima xilose

---

<sup>2</sup> HUDDLESTON, J.G. et al. **Enzyme Microb. Technol.** v.13, p.24, 1991.

redutase apresentou fator de purificação de 1,89 e rendimento de 103,5% nas condições experimentais otimizadas.

#### **2.4 PROCESSO DE INTEGRAÇÃO**

Atualmente, a realização da integração de operações, relacionadas ao processo de fermentação e a processos de purificação na produção de compostos com valor agregado, tem mostrado benefícios econômicos e práticos. Diferentes autores têm realizado estudos visando à integração de processos. Hamilton et al. (2000) estudaram a produção de uma protease ácida a partir do cultivo de *Yarrowia lipolytica* integrada a recuperação desta proteína extracelular por leite fluidizado, resultando em maior rendimento do produto. Ling et al. (2003) avaliaram a possibilidade de aplicação da cromatografia em leite expandido para a purificação de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) a partir de homogeneizado de *Saccharomyces cerevisiae* não clarificado, ou seja, em presença de fragmentos celulares. Estes autores concluíram que, apesar da necessidade de se intensificar os estudos, a cromatografia em leite expandido pode ser apresentada como uma técnica adicional para utilização em processos integrados.

Outro fato importante seria a integração do processo de rompimento celular a uma operação de purificação, a qual poderia vir a aumentar o rendimento, reduzir custos e a melhorar a qualidade de produtos purificados. Rito-Palomares e Lyddiatt (2002) utilizaram o método de rompimento celular com esferas de vidro (Dyno-mill, KDL) integrado a um sistema de duas fases aquosas visando purificação da enzima intracelular G3PDH. Segundo os autores, a partição de G3PDH no processo integrado apresentou comportamento similar ao processo convencional, o que demonstra o potencial da utilização simultânea das etapas de rompimento e extração líquido-líquido na recuperação direta de proteínas intracelulares específicas.

### 3 OBJETIVOS

#### GERAL:

Obtenção e purificação da enzima G6PD, produzida pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, empregando extração líquido-líquido, em sistemas de duas fases aquosas.

#### ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito das variáveis volume de suspensão de células, velocidade de agitação e o tempo de rompimento sobre a liberação de G6PD de células de levedura, em moinho de esferas de vidro;
- Avaliar o efeito das variáveis massa molar do PEG e comprimento da linha de amarração (TLL) sobre a purificação de G6PD, através da metodologia do planejamento experimental, empregando SDFA convencional e homogeneizado clarificado, em escala reduzida;
- Avaliar o efeito das variáveis massa molar do PEG e comprimento da linha de amarração (TLL) sobre a purificação de G6PD, através da metodologia do planejamento experimental, empregando SDFA convencional e homogeneizado em presença de fragmentos celulares, em escala reduzida;
- Integrar as etapas de rompimento celular e de extração líquido-líquido em SDFA, em escala reduzida e ampliada, visando uma eficiente purificação da G6PD e comparar os resultados com os obtidos em SDFA convencional;
- Realizar estudo cinético e termodinâmico para a reação catalisada pela enzima G6PD presente no meio inicial (homogeneizado) e após purificação em processos integrados em escala reduzida.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO, CONCENTRAÇÃO E TRATAMENTO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ

O hidrolisado foi obtido através de processo de hidrólise ácida da palha de arroz, utilizando-se um reator com capacidade para 350 litros. A hidrólise ácida foi conduzida nas condições determinadas por Roberto et al. (2003). Ao término da reação, a fração líquida coletada foi retornada ao reator de hidrólise para tratamento com carvão ativo nas seguintes condições: relação carvão: hidrolisado de 3% (p/v), temperatura de 45 °C e tempo de agitação de 30 minutos (MUSSATTO; ROBERTO, 2001). Após o processo de adsorção com carvão ativo, o hidrolisado foi centrifugado e então concentrado sob vácuo a 65 °C, de forma a se obter uma concentração final de D-xilose de cerca de 100 g/L. O hidrolisado concentrado foi tratado com NaOH em pastilhas para que o pH desejado fosse alcançado.

### 4.2 MICRORGANISMOS

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada foi adquirida na forma comercial (massa prensada). A levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 utilizada pertence à coleção de culturas do GMBio - DEBIQ/EEL. Essa levedura foi repicada em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte, incubada em estufa a 30 °C por 24 h e conservada em geladeira a 4 °C para posterior utilização.

### 4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO DO INÓCULO DE *Candida guilliermondii*

Células de *C. guilliermondii*, recém repicadas em meio de manutenção, foram transferidas em condições assépticas, com auxílio de uma alça de platina, para tubo de ensaio contendo cerca de 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL do meio constituído por hidrolisado hemicelulósico. O hidrolisado teve seu

pH ajustado para 6,2 com NaOH, seguido de diluição com água destilada esterilizada para que a concentração inicial de xilose de 30 g/L fosse obtida. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (Tecnal mod. Te 420) com agitação de 200 rpm, a 30 °C, por 30 horas. Após o cultivo, as células foram coletadas por centrifugação a 2500 rpm, 20 minutos, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. A concentração celular dessa suspensão foi determinada através de curva-padrão que relaciona absorbância a 600 nm e massa seca.

#### **4.4 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO E PREPARO DO HOMOGENEIZADO DE *Candida guilliermondii***

As células de *C. guilliermondii* foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de hidrolisado de palha de arroz com 1 g/L de inóculo, 70 g/L de xilose em pH 7,5 (GURPILHARES, 2004). Os frascos foram incubados em agitador rotatório (Tecnal mod. 420), a 30 °C e agitação de 200 rpm. Amostras foram coletadas nos tempos inicial e final de fermentação para determinação da concentração celular e das concentrações de açúcares, ácido acético e xilitol. Após o cultivo, as células foram coletadas por centrifugação (2500 rpm, 20 minutos), lavadas em solução-tampão Tris HCl 0,071M em pH 7,5. A partir destas células, suspensões foram preparadas no mesmo tampão de modo a obter concentração celular de aproximadamente 11,0 g/L. Estas suspensões foram mantidas congeladas a -18 °C para posterior utilização.

#### **4.5 ROMPIMENTO CELULAR PARA OBTENÇÃO DE G6PD**

Células da levedura *S. cerevisiae* foram rompidas em moinho de esferas com capacidade de 2L, desenvolvido e confeccionado nos Laboratórios da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP especialmente para este fim (Figura 4.5.1).



Figura 4.5.1. Moinho de esferas de vidro, refrigerado, empregado no rompimento de células para liberação de G6PD

Para os ensaios de rompimento, a câmara foi preenchida com volumes iguais de esferas de vidro (5 mm  $\varnothing$ ) e de suspensão celulares de 6,0 g/L preparadas em tampão Tris-HCl 0,071 M e pH 7,5. O volume de suspensão, tempo de rompimento e velocidade de agitação a serem empregados foram avaliados para a liberação de G6PD através de um planejamento estatístico  $2^3$  (Tabela 4.5.1). A agitação foi promovida por um agitador mecânico (de até 2000 rpm) com 30W de potência (Modelo RW 20.n, IKA®) e o resfriamento foi promovido pela circulação de água, a temperatura aproximada de 25 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), pela camisa da câmara.

**Tabela 4.5.1 – Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  empregado no estudo de rompimento celular**

Ensaio	Níveis codificados das variáveis			Níveis reais das variáveis		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Volume (mL)	Agitação (rpm)	Tempo (min)
1	-1	-1	-1	100	400	5
2	+1	-1	-1	500	400	5
3	-1	+1	-1	100	960	5
4	+1	+1	-1	500	960	5
5	-1	-1	+1	100	400	15
6	+1	-1	+1	500	400	15
7	-1	+1	+1	100	960	15
8	+1	+1	+1	500	960	15

#### 4.6 CONSTRUÇÃO DA CURVA BINODAL

A curva binodal foi determinada pelo método de titulação, como descrito por Albertsson (1986), empregando PEG de 400, 1000 e 1500 g/mol e solução tampão de fosfato. Massa conhecida de aproximadamente 0,3 g de solução de polímero (PEG 400 a 50%, PEG 1000 a 50% ou PEG 1500 a 50%) foi colocada em tubo de centrífuga graduado com o auxílio de pipeta automática. Essa massa foi titulada com solução de  $K_2HPO_4/NaH_2PO_4$  (40% p/p) pH 7,5. A massa do sistema foi monitorada em balança analítica e após cada gota adicionada de solução de sal ou água deionizada, o tubo foi agitado em vórtice. Após turvação do meio, devido à adição gota a gota de solução de sal, anotou-se o valor da massa do sistema. Adicionou-se água, gota a gota, de modo a se obter novamente uma solução transparente, anotando o valor da massa. Esse procedimento foi repetido diversas vezes para a obtenção dos pontos pertencentes à curva binodal.

As concentrações de PEG e fosfato de sódio/potássio foram calculadas baseando-se na concentração inicial de PEG e na massa de solução de sal

adicionada. O procedimento realizado novamente, porém de modo invertido: a massa de solução do sal foi pesada e titulada com solução de PEG.

#### **4.7 DETERMINAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES DO SISTEMA EM EQUILÍBRIO (TLL)**

As TLLs foram obtidas a para os sistemas localizados na região bifásica das curvas binodais. Essas foram calculadas empregando-se a Equação 1 descrita no item 2.3.1. Em tubo de centrifuga graduado, soluções de  $K_2HPO_4/NaH_2PO_4$  40% (p/p) com pH 7,5 e de PEG 400 (50%), 1000 (50%) e 1500 (50%), previamente preparadas, foram misturadas em proporções definidas (composição inicial do sistema) para sistemas com massa total de 6,0 g.

Após adição dos componentes, o sistema foi agitado suavemente de modo a assegurar mistura completa. Com a mistura, os tubos contendo os sistemas foram centrifugados (25 °C, 2200 rpm, 20 minutos) para o alcance do equilíbrio, permitindo completa separação das fases. Amostras, de ambas as fases, foram cuidadosamente retiradas. Para a fase topo foi utilizada uma micropipeta e para a fase fundo, uma seringa com agulha de aço inoxidável. O conteúdo de água de cada fase foi determinado por liofilização e o de fosfato de sódio/potássio foi determinado através da calcinação da amostra em mufla a 400 °C por 2 horas. Posteriormente, empregando balanço de massas, o conteúdo de polímero e sal, em ambas as fases, pôde ser calculado.

Os níveis da variável TLL utilizados no planejamento estatístico para a extração de G6PD em SDFa foram determinados após um estudo de diferentes sistemas, nos quais as concentrações de PEG variaram e a concentração do fosfato foi fixada em 12% (Tabela 4.7.1). A faixa de variação da concentração de PEG e a concentração de fosfato de sódio/potássio foram estipuladas de modo que seus pontos representativos no diagrama de fases estivessem situados acima da curva binodal, para as diferentes massas molares de PEG empregadas.

**Tabela 4.7.1 – Composição dos sistemas utilizados para a determinação do comprimento de linha de amarração (TLL%)**

<b>Massa Molar de PEG</b>	<b>PEG % (p/p)</b>	<b>Sal % (p/p)</b>
400	20	12
400	22	12
400	24	12
400	26	12
400	28	12
400	30	12
400	35	12
1000	16	12
1000	20	12
1000	22	12
1000	24	12
1000	26	12
1000	28	12
1000	30	12
1500	16	12
1500	20	12
1500	22	12
1500	24	12
1500	26	12
1500	28	12
1500	30	12

#### **4.8 EXTRAÇÃO DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS**

Para avaliar o processo de extração da enzima G6PD em SDFA, os experimentos foram conduzidos segundo planejamento fatorial  $2^2$ , com três repetições no ponto central. Nesse planejamento, foi analisada a influência das variáveis comprimento da linha de amarração (TLL) e massa molar de PEG (MM) sobre a partição da enzima G6PD entre as fases topo e fundo (Tabela 4.8.1). O pH da extração foi fixado em 7,5 e a temperatura  $\pm 25$  °C devido às observações de Ribeiro (2001).

Após o estudo das condições de rompimento em moinho de esferas de vidro, o volume de suspensão, o tempo e a velocidade de agitação foram fixados em 100 mL, 15 minutos e 400 rpm, respectivamente. Entretanto, novos experimentos foram

realizados a fim de avaliar a eficiência de rompimento do moinho quando a concentração celular de 6,0 g/L e 11,0 g/L de uma suspensão de células de *S. cerevisiae*, com ou sem inibidores de proteases, fosse submetida a um tempo maior de rompimento. Com estes resultados, estabeleceu-se que as condições de rompimento de células da levedura *C. guilliermondii* seriam: concentração da suspensão celular de 11,0 g/L e volume de 100 mL na presença de inibidores de proteases, agitação de 400 rpm por 25 minutos a temperatura de 25 °C. Os homogeneizados foram obtidos nestas condições (não clarificado, na presença de fragmentos celulares, e clarificado).

Os sistemas de fases foram compostos por PEG adicionados de solução  $K_2HPO_4/NaH_2PO_4$  e do homogeneizado celular com ou sem a remoção de fragmentos celulares. Optou-se pela utilização de  $NaH_2PO_4$ , pois a solução estoque de sal a 40% p/p não poderia ser obtida com  $KH_2PO_4$ , uma vez que este formaria uma solução super-saturada. A variação da proporção de  $KH_2PO_4$  e  $Na_2HPO_4$  é que define o valor do pH de extração (pH 7,5). Os sistemas foram preparados em tubos de centrífuga graduados para uma massa final de 10,0g, que após agitação, permaneceram em repouso por 2 horas para que ocorresse a separação das fases. As fases foram amostradas para análises posteriores. Os valores dos volumes das fases, das atividades enzimáticas e dos teores de proteínas totais nas fases obtidas foram utilizados para avaliar a eficiência do processo de SDFA. Esse estudo foi realizado a temperatura de 25 °C em banho-maria, pois foi mostrado em trabalho anterior que durante 8 horas a essa temperatura e pH 7,5, na presença de inibidores de proteases, não há desnaturação da G6PD (SOUZA et al., 2002).

**Tabela 4.8.1 – Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> empregada no estudo da extração de G6PD em Sistemas de Duas Fases Aquosas**

Ensaio	Níveis codificados		Níveis reais	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	TLL (%)	PEG (MM)
1	-1	-1	30	400
2	+1	-1	40	400
3	-1	+1	30	1500
4	+1	+1	40	1500
5	0	0	35	1000
6	0	0	35	1000
7	0	0	35	1000

PEG 400 a 50%, PEG 1000 a 50% e PEG 1500 a 50% p/p; solução K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40% p/p; homogeneizado com ou sem remoção de fragmentos celulares

#### **4.9 INTEGRAÇÃO DAS ETAPAS DE ROMPIMENTO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO VISANDO À PURIFICAÇÃO DA ENZIMA G6PD**

##### **4.9.1 Escala reduzida do processo de integração das etapas de rompimento a extração por SDFA visando à purificação da enzima G6PD**

Estes experimentos foram conduzidos com a utilização de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, com três repetições no ponto central empregando as condições descritas na Tabela 4.8.1 (item 4.8).

Os sistemas de fases foram preparados utilizando polímero, sal, 1,0 g de suspensão de células de *C. guilliermondii* 11,0 g/L e de igual volume de esferas de vidro adicionados a tubos de centrifuga graduados (massa total de 10,0 g). Os sistemas foram agitados em vórtex durante 5 minutos, com intervalos de 30 segundos em banho de gelo, após cada minuto de agitação. As esferas de vidro foram separadas da parte líquida do sistema através de filtração, sendo essa parte líquida retornada aos tubos de centrifuga sob temperatura controlada (25 °C). Após 2 horas de repouso, para que ocorresse a separação das fases, amostras foram



retiradas para análises posteriores. Os valores dos volumes das fases, das atividades enzimáticas e dos teores de proteínas totais nas fases obtidas foram utilizados para avaliar o processo de SDFA.

#### 4.9.2 Escala ampliada do processo de integração das etapas de rompimento a extração por SDFA visando à purificação da enzima G6PD

Foi empregado o moinho de esferas de vidro (descrito no item 4.5). No preparo dos sistemas, a suspensão de células de *C. guilliermondii* intactas a 11,0 g/L (preparada em tampão Tris-HCl e pH 7,5 adicionado de inibidores de proteases, EDTA, ácido aminocapróico e mercaptoetanol), foi adicionada à câmara de rompimento juntamente com as esferas de vidro, o PEG e solução de fosfato de sódio/potássio, conforme níveis das variáveis estudadas (item 4.8). Após a agitação, o sistema contendo a mistura de polímero, solução de fosfato e homogeneizado foi filtrado á vácuo para retirada das esferas empregando filtro de lã de vidro sinterizado (Figura 4.9.1). O filtrado foi acondicionado em provetas de 100 mL por 2 horas a 25 °C para a separação das fases. A determinação dos volumes das fases, das atividades enzimáticas e dos teores de proteínas totais nas fases obtidas foi utilizada para avaliar a eficiência do processo de SDFA.



Figura 4.9.1. Filtração á vácuo do SDFA para a retenção de esferas de vidro

## 5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A concentração celular foi determinada através da equação de uma curva de calibração que correlaciona massa seca e absorvância. As medidas das absorvâncias de amostras diluídas foram feitas em espectrofotômetro (Beckman DU 640) a 600 nm, utilizando água destilada como branco.

### 5.2 EFICIÊNCIA DE ROMPIMENTO

A eficiência de rompimento foi determinada através da variação da densidade ótica (600 nm) da suspensão celular antes e após o rompimento, conforme a Equação 4:

$$E(\%) = \frac{(DO_o - DO_f)}{DO_o} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

E = eficiência de rompimento;

DO<sub>o</sub> = densidade ótica antes do rompimento;

DO<sub>f</sub> = densidade ótica depois do rompimento;

### 5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação do teor de proteínas totais foi realizada utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro (Beckman DU 640) empregando comprimento de onda de 595

nm. Foram utilizados padrões de albumina bovina entre 100 e 1000 mg/L para construção de uma curva de calibração.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase foi determinada através do monitoramento da redução do cofator NADP<sup>+</sup> em espectrofotômetro a 340 nm. O meio foi composto por: 600 µL de tampão Tris HCl (0,071 M, pH 7,5) adicionado de MgCl<sub>2</sub> (35 mM); 5 µL de NADP<sup>+</sup> (0,131 M); 10 µL de G6P (500 mM) e 100 µL de amostra. Uma unidade (U) de atividade da G6PD foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a redução de 1 µmol de cofator por minuto.

As atividades específicas foram calculadas com base no teor de proteínas totais, previamente determinados e calculados (Equação 5). Define-se atividade específica (A<sub>e</sub>) como:

$$A_e = \frac{A_t}{P_t} \quad (5)$$

Onde:

A<sub>t</sub> = atividade da enzima expressa em [U/L];

P<sub>t</sub> = proteína total expressa em [mg/L].

#### 5.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

A determinação dos parâmetros cinéticos aparentes K<sub>M</sub> (constante de Michaelis - Menten) e V<sub>máx</sub> (velocidade máxima da reação enzimática) foi realizada através da medida da atividade enzimática de G6PD (conforme descrito no item 5.5) antes e após o processo de extração em SDFA utilizando as seguintes concentrações de G6P (substrato): 5; 10; 25; 30; 50; 75; 150; 250; 300; 500; 2500;

7500; 10000 e 12500  $\mu\text{M}$ ; e de  $\text{NADP}^+$  (cofator) nas seguintes concentrações: 150; 350; 500; 750; 1000; 1250; 1500 e 1750  $\mu\text{M}$ .

Os valores de  $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$  foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk (LEHNINGER, 1976).

## 5.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS

A determinação dos parâmetros termodinâmicos variação da energia livre de Gibbs,  $G$ , variação da entalpia,  $H$ , e variação da entropia,  $S$ , foi realizada através da medida da atividade enzimática de G6PD nas seguintes temperaturas: 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75 e 80  $^{\circ}\text{C}$ . Após este procedimento, os valores de  $G$ ,  $H$ ,  $S$  e  $E_a$  (energia de ativação) foram calculados empregando a equação de Arrhenius e Eyring (Equações 6, 7, 8 e 9) (OWUSU et al., 1992).

$$A = A_0 \exp(-E_a / RT) \quad (6)$$

Onde:

$A_0$  = constante de Arrhenius;

$A$  = atividade da enzima (U/L);

$E_a$  = energia de ativação (J/mol);

$R$  = constante universal dos gases ideais (J/mol.K)

$T$  = temperatura absoluta (K).

$$\Delta G = [(RT) / 2,303] * \text{Log}(A * h * k * T) \quad (7)$$

Onde:

$R$  = constante universal dos gases ideais (8,314 J/mol.K);

$A$  = atividade enzimática (U/L);

$h$  = constante de Plank ( $1,105 \times 10^{-35}$  J/min);

$k$  = constante de Boltzman ( $1,38 \times 10^{-23}$  J/K);

$T$  = temperatura absoluta (K).

$$\Delta H = E_a - RT \quad (8)$$

Onde:

R = constante universal dos gases ideais (J/mol.K);

T = temperatura absoluta (K).

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (9)$$

Onde:

T = temperatura absoluta (K).

## 6 ANÁLISE DE RESULTADOS

Para a avaliação dos resultados, foram analisados os seguintes parâmetros:

### 6.1 RENDIMENTO EM PROTEÍNA TOTAL

Define-se como (Equação 10):

$$RP = \frac{P_{t2}}{P_{t1}} \quad (10)$$

Onde:

$p_{t2}$  = proteína total na fase recuperada [mg];

$p_{t1}$  = proteína total da amostra inicial antes da separação [mg];

As massas  $p_{t1}$  e  $p_{t2}$  correspondem à concentração de proteína multiplicada pelo volume da fase considerada.

### 6.2 RENDIMENTO EM ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Definido na Equação 11 por:

$$RA = \frac{a_2}{a_1} \quad (11)$$

Onde:

$a_2$  = atividade na fase recuperada [U];

$a_1$  = atividade da amostra inicial antes da separação [U];

As atividades  $a_1$  e  $a_2$  correspondem à atividade enzimática multiplicada pelo volume da fase considerada.

### 6.3 FATOR DE PURIFICAÇÃO DA G6PD

O fator de purificação é uma medida do aumento da pureza da enzima, e é obtido através da relação entre as atividades específicas da enzima antes e após a separação. Define-se então Fator de Purificação (Equação 12):

$$FP = \frac{A_{e2}}{A_{e1}} \quad (12)$$

Onde:

$A_{e2}$  = atividade específica na fase separada [U/mg];

$A_{e1}$  = atividade específica da amostra inicial antes da separação [U/mg].

### 6.4 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

O coeficiente de partição é um parâmetro que determina a eficiência de partição de uma enzima entre as duas fases presentes na extração líquido-líquido por sistemas de duas fases aquosas. Define-se coeficiente de partição como (Equação 13):

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (13)$$

Onde:

$C_T$ = concentração da proteína e/ou atividade enzimática na fase superior obtida após extração (fase topo);

$C_B$ = concentração da proteína e/ou atividade enzimática na fase inferior obtida após extração (fase fundo);

$K$ = coeficiente de partição (adimensional).

## 6.5 SELETIVIDADE

Define-se seletividade como (Equação 14):

$$S = \frac{[K_{enz}]}{[K_{prot}]} \quad (14)$$

Onde:

$K_{enz}$  = coeficiente de partição da atividade enzimática de G6PD;

$K_{prot}$  = coeficiente de partição das proteínas;

S = seletividade.

## 6.6 DETERMINAÇÃO DO DESVIO PADRÃO NOS ENSAIOS DE EXTRAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS REFERENTE À ATIVIDADE DA ENZIMA G6PD E A QUANTIDADE DE PROTEÍNAS TOTAIS

Foram determinados os desvios padrão para a atividade volumétrica de G6PD, proteína total e atividade específica desta enzima. As amostras para esta determinação foram obtidas nos experimentos convencionais, ou seja, sem integração (rompimento da suspensão de células de *C. guilliermondii* em moinho de esferas de vidro seguido dos experimentos em SDFA). O desvio padrão para a atividade volumétrica e específica de G6PD, bem como para a quantidade de proteínas totais foi estimado através de repetições dos ensaios realizados em dias diferentes (homogeneizado clarificado) e dos ensaios conduzidos em um único dia (homogeneizado na presença de fragmentos celulares). O cálculo destes desvios foi efetuado através da utilização do programa ORIGIN versão 5.0.



## 6.7 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa STATGRAPHICS versão 6.0. Modelos são determinados através de análise de regressão aplicada aos resultados experimentais obtidos nos planejamentos fatoriais completos. Estes modelos são representados pela Equação 15:

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} X_i X_j \quad (15)$$

Onde:  $Y_i$  representa a variável resposta,  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$  e  $b_{ij}$  representam os coeficientes,  $X_i$  e  $X_j$  representam as variáveis estudadas.

Os valores das variáveis nos planejamentos fatoriais foram codificados de acordo com a Equação 16:

$$V_C = \frac{(V_R - V_O)}{\Delta V_R} \quad (16)$$

Onde:

$V_C$ = valor codificado da variável independente;

$V_R$ = valor real da variável independente;

$V_O$ = valor real da variável independente no ponto central;  $\Delta V_R$ = valor do passo, isto é  $(V_{R\text{máx}} - V_{R\text{mín}})/2$ .

As superfícies de resposta foram plotadas utilizando-se o programa STATISTICA versão 6.0.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 ESTUDO DO ROMPIMENTO CELULAR EM MOINHO DE ESFERAS DE VIDRO

O rompimento celular é um passo crítico em processos biotecnológicos. Tradicionalmente, técnicas de rompimento mecânico, químico e enzimático têm sido usadas no rompimento celular em pequena escala. Entretanto, para produções em maior escala, somente homogeneizadores de alta pressão e moinho de esferas de vidro têm sido empregados. Atualmente, muitos processos de rompimento são integrados aos processos de purificação existentes devido à necessidade de otimização destes procedimentos visando, também, a diminuição do número de etapas a serem empregadas (FOSTER, 1995).

O primeiro passo para se obter condições ótimas em um processo é identificar as variáveis que podem influenciar na resposta de interesse. Para o estudo do moinho de rompimento foi utilizado um planejamento experimental  $2^3$ . A levedura *C. guilliermondii* não foi utilizada nesta etapa devido ao grande volume de hidrolisado necessário para o cultivo e para a obtenção das suspensões celulares. Empregou-se suspensão celular de *S. cerevisiae* (comercial), 6,0 g/L, sendo a temperatura do moinho de rompimento mantida a 25 °C ( $\pm 1$  °C).

Neste estudo foram avaliadas as influências das variáveis volume de suspensão celular ( $X_1$ ), velocidade de agitação ( $X_2$ ) e tempo de rompimento ( $X_3$ ) sobre a liberação da enzima G6PD, de proteínas solúveis e eficiência do rompimento celular. As condições empregadas na execução dos ensaios, bem como os resultados alcançados, são apresentadas na Tabela 7.1.

**Tabela 7.1 – Estudo do reator de rompimento empregando um planejamento experimental  $2^3$**

<b>Ensaio</b>	<b>X<sub>1</sub></b> <b>(mL)</b>	<b>X<sub>2</sub></b> <b>(rpm)</b>	<b>X<sub>3</sub></b> <b>(min)</b>	<b>A<sub>v</sub></b> <b>(U/L)</b>	<b>P<sub>T</sub></b> <b>(mg/L)</b>	<b>A<sub>e</sub></b> <b>(U/mg)</b>	<b>Rompimento</b> <b>(%)</b>
1	100	400	5	115	511	0,22	32,5
2	500	400	5	186	416	0,45	29,9
3	100	960	5	169	506	0,33	44,2
4	500	960	5	162	601	0,27	33,8
5	100	400	15	257	996	0,26	58,5
6	500	400	15	316	996	0,32	61,1
7	100	960	15	231	974	0,24	72,8
8	500	960	15	252	1099	0,23	63,7

Observa-se que em todos os ensaios realizados no tempo de rompimento de 5 minutos, tanto a atividade volumétrica quanto a porcentagem de células rompidas apresentaram seus menores valores, variando de 115 a 186 U/L e 29,9 a 44,2%, respectivamente. De acordo com Kuboi et al. (1995), a localização da enzima torna-se importante em processos de rompimento. Uma vez que a maior parte da enzima G6PD está localizada no citoplasma, sua liberação com rompimento celular poderia ocorrer de forma instantânea. No entanto, o tempo de 5 minutos, menor tempo empregado, mostrou-se insuficiente para o rompimento celular e menor quantidade de enzima foi liberada. A análise da eficiência de rompimento celular através da densidade ótica pode vir a provar a existência de uma relação entre a mesma e produto liberado (FOSTER, 1995). Uma vez que a porcentagem de células rompidas é calculada com base na densidade ótica, constatou-se no presente trabalho que o aumento do tempo de 5 para 15 minutos proporcionou uma melhor eficiência de rompimento e, conseqüentemente, uma maior liberação da enzima G6PD.

Nota-se, ainda na Tabela 7.1, que a quantidade de G6PD liberada, medida em atividade volumétrica, mostrou ser dependente do volume de suspensão, tanto para o tempo de rompimento de 5 minutos quanto para o de 15 minutos para ambas as velocidades de agitação: 400 ou 960 rpm. O mesmo comportamento pode ser

observado para a quantidade de proteínas totais liberadas e para a porcentagem de rompimento obtida. Van Gaver e Huyghebaert (1991) observaram que a velocidade de rotação do motor do moinho de esferas não influenciou de modo acentuado no grau de rompimento celular. Estes autores concluíram que devido a eficiente dissipação de energia na câmara de rompimento, altas velocidades de rotação podem aumentar o risco de desnaturação enzimática. No presente estudo, o aumento da velocidade de agitação de 400 para 960 rpm, no tempo de 15 minutos, e volume de suspensão de 100 mL ou 500 mL, mostrou influenciar na quantidade de enzima liberada no extrato celular, reduzindo o valor de atividade volumétrica em decorrência, provavelmente, do efeito de desnaturação.

Em relação à resposta atividade específica verifica-se que, com exceção do ensaio 2, os valores apresentaram pouca variação (0,22 a 0,33 U/mg). Provavelmente, isso se deve ao fato de a liberação de G6PD ser proporcional a de proteínas totais presentes no homogeneizado. A contribuição do efeito de cada variável do processo de rompimento celular, volume de suspensão celular, velocidade de agitação do moinho e tempo de rompimento, além dos efeitos interativos entre elas, foram avaliados estatisticamente em relação às respostas de interesse.

Na Figura 7.1, o Gráfico de Pareto ilustra os efeitos estimados, em ordem decrescente de magnitude, das variáveis analisadas sobre as respostas: atividades volumétrica e específica de G6PD, proteínas totais liberadas e eficiência de rompimento. O tamanho de cada barra é proporcional ao efeito estimado. A linha vertical é utilizada para avaliar quais efeitos são estatisticamente significativos no intervalo de confiança considerado.

Como pode ser visto somente o efeito principal tempo de agitação (3) foi significativo no intervalo de confiança de 90%. Este efeito apresentou estimativa de 10,6 e uma vez que o valor é positivo, isto indica que os resultados de atividade volumétrica são melhorados conduzindo os ensaios no maior tempo (15 minutos). Este efeito também apresentou sinal positivo para a resposta proteínas totais, para o intervalo de confiança de 95%. Conclui-se que, tanto a liberação da enzima quanto a de proteínas, no extrato celular, foram influenciadas somente pelo efeito tempo e que a interação entre as variáveis estudadas não foram significativas nos respectivos níveis de confiança.

Ainda na Figura 7.1, observa-se que os efeitos principais, bem como os efeitos interativos das variáveis não apresentaram significância, no intervalo de confiança de 90%, sobre a resposta atividade específica de G6PD.

A variável dependente eficiência de rompimento, assim como a  $A_v$  e a quantidade de proteínas totais liberadas, foi influenciada pela variável independente tempo, uma vez que o efeito dessa última apresentou valor estimado de 29,7; significativo ao nível de confiança de 95%.

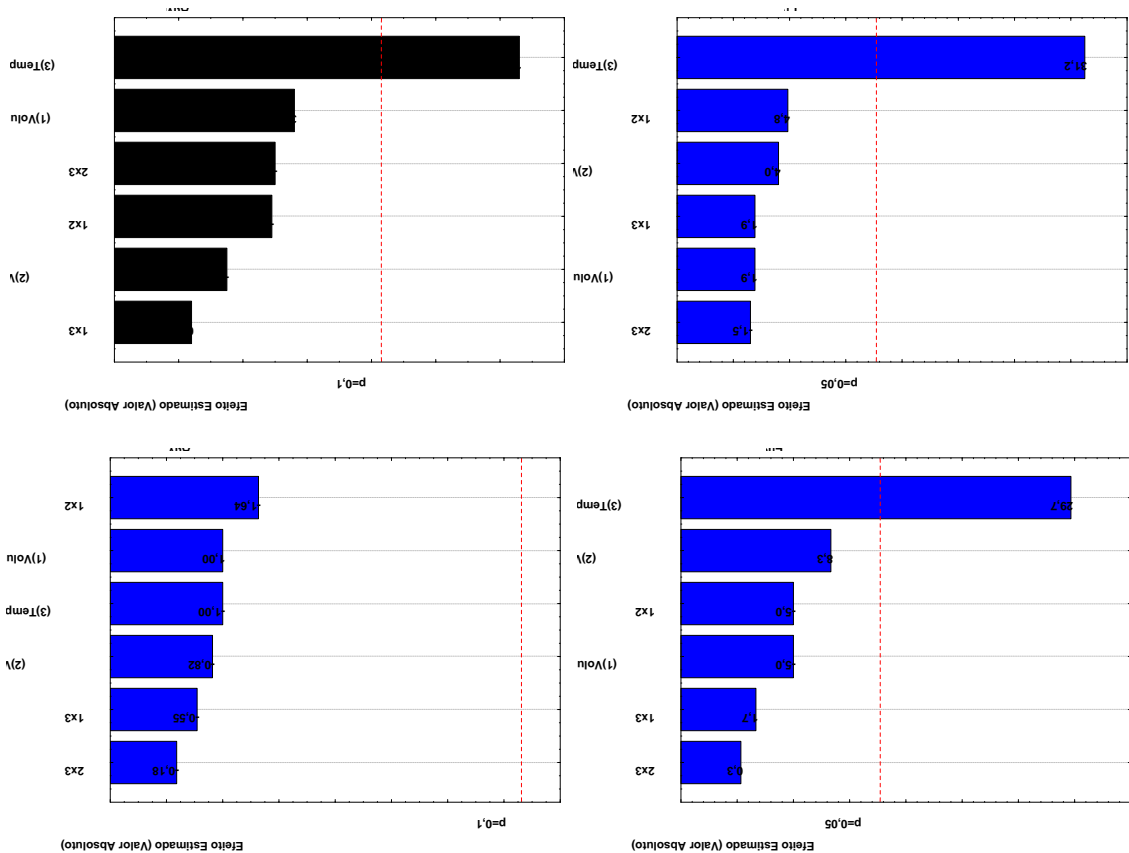


Figura 7.1. Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis volume de suspensão celular, velocidade de agitação e tempo de rompimento nas respostas atividade volumétrica de G6PD ( $A_v$ ), proteínas totais ( $P_t$ ), atividade específica de G6PD ( $A_e$ ) e eficiência de rompimento

Como a atividade específica pouco variou e, sendo o objetivo principal deste trabalho a purificação de G6PD, torna-se interessante a obtenção de uma condição em que a concentração de enzima no homogeneizado celular seja maior ( $A_v$ ). Visando a otimização desta resposta,  $A_v$ , ensaios experimentais foram conduzidos para avaliar a influência das variáveis, volume de suspensão celular e tempo do processo de rompimento, sobre a liberação de G6PD.

Nestes experimentos, os valores empregados para as variáveis foram estabelecidos de acordo com um planejamento fatorial  $2^2$  com composição em face centrada (Tabela 7.2). As suspensões celulares de *S. cerevisiae* tiveram sua concentração mantida em aproximadamente 6,0 g/L e a temperatura do moinho de esferas em 25 °C. Em estudos anteriores observou-se que a velocidade de agitação, variando de 400 a 960 rpm, não influenciou de modo positivo na liberação da enzima G6PD durante o rompimento celular em moinho de esferas de vidro. Com isso, optou-se por manter a velocidade de agitação em 400 rpm.

**Tabela 7.2 – Atividades volumétricas de G6PD ( $A_v$ ) obtidas no planejamento experimental  $2^2$  com composição em face centrada para avaliar a influência do volume de suspensão celular e tempo de rompimento na liberação da enzima de *S. cerevisiae***

Ensaio	Variáveis		Resposta
	Volume (mL)	Tempo (min)	$A_v$ (U/L)
1	100	5	115
2	500	5	186
3	100	15	257
4	500	15	316
5	100	10	240
6	500	10	302
7	300	5	201
8	300	15	337
9	300	10	259
10	300	10	252
11	300	10	276

Na Tabela 7.2, pode-se notar que os valores de atividade volumétrica de G6PD variaram de 115 a 337 U/L. Os menores valores de  $A_V$  foram obtidos com o tempo de 5 minutos, independentemente do volume de suspensão celular empregado. Para este tempo, a  $A_V$  variou de 115 a 201 U/L. Assim, para 10 minutos os valores de  $A_V$  variaram de 240 a 302 U/L e para 15 minutos de 257 a 337 U/L. No entanto, verifica-se que o aumento do volume de suspensão de 100 para 500 mL influenciou positivamente a quantidade de enzima liberada ( $A_V$ ), sendo observado um aumento de 115 para 186 U/L, 240 para 302 U/L e 257 para 316 U/L nos tempos 5, 10 e 15 minutos, respectivamente. Embora a localização da G6PD facilite sua liberação, o tipo de microrganismo envolvido e determinados parâmetros pertinentes ao processo de rompimento celular podem interferir na quantidade de enzima liberada no meio. Esses resultados estão em conformidade aos reportados por Hasmann (2004) que em estudos de rompimento de células de *S. cerevisiae*, empregando moinho de esferas de vidro, verificou que a eficiência do rompimento e a liberação de G6PD foram linearmente dependentes do tempo de rompimento utilizado.

Na Figura 7.2, o Gráfico de Pareto representa os efeitos estimados para as variáveis volume de suspensão celular e tempo de rompimento, bem como suas interações sobre a variável resposta atividade volumétrica de G6PD.

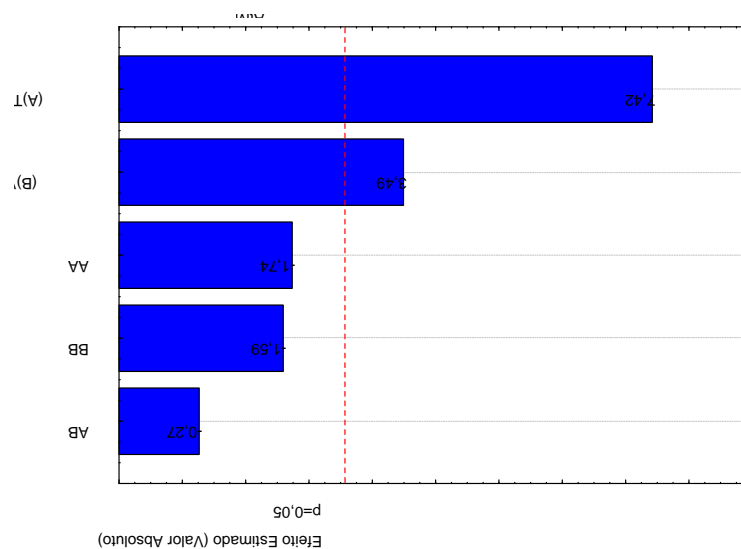


Figura 7.2. Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis volume de suspensão celular e tempo de rompimento sobre a resposta atividade volumétrica de G6PD ( $A_V$ )

Como pode ser visto na Figura 7.2, ambos os efeitos principais, tempo de rompimento (A) e volume de suspensão celular (B), foram significativos para o nível de confiança de 95%. O maior efeito principal observado para esta resposta foi o da variável tempo de rompimento, o qual apresentou estimativa de 7,42; enquanto que a variável volume de suspensão apresentou estimativa de 3,49, sendo ambas positivas. Assim, seria correto dizer que empregando maiores valores para o tempo de rompimento e volume de suspensão, maior seria a quantidade de enzima G6PD liberada no meio. O efeito quadrático das variáveis estudadas sobre a atividade volumétrica de G6PD ( $A^2$  e  $B^2$ ) não apresentaram significância no nível de confiança estudado.

A partir da análise estatística dos dados, um modelo matemático para descrever a influência das variáveis do processo de rompimento, volume de suspensão celular e tempo, sobre a atividade de G6PD foi obtido. A Tabela 7.3 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo representativo da atividade volumétrica da enzima.

**Tabela 7.3 – ANOVA para o modelo matemático do processo de rompimento celular em moinho de esferas de vidro para a obtenção da enzima G6PD**

<b>Fonte</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b><math>\rho</math></b>
Modelo	37735,00	5	7547,00	14,98	0,0050
Resíduo	2518,63	5	503,73		
<i>Falta de ajuste</i>	2213,96	3	737,99	4,84	0,1758
<i>Erro puro</i>	304,67	2	152,33		

$R^2 = 0,94$ ; C.V = 9,01;

SQ = soma quadrática; GL = grau de liberdade; MQ = média quadrática



A significância estatística do modelo quadrático foi avaliada pelo teste  $F$  que revelou ser a regressão estatisticamente significativa ( $F_{\text{modelo}} > F_{\text{tabelado}} = 5,05$ ), no intervalo de confiança de 95%. O modelo não apresentou falta de ajuste ( $p > 0,05$ ) e o coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,94$ ) indica que 94% da variação na resposta pode ser explicada pelo modelo. O modelo matemático que representa a liberação de G6PD, em termos de atividade volumétrica, com o rompimento de células de *S. cerevisiae*, em moinho de esferas de vidro, é expresso na Equação 17:

$$Y = +274,79 + 32,00A + 68,00B - 22,47A^2 - 24,47B^2 - 3,00AB \quad (17)$$

Onde:  $Y$  = atividade volumétrica de G6PD (U/L);  $A$  = volume de suspensão celular (mL);  $B$  = tempo de rompimento (min).

A atividade volumétrica máxima prevista pelo modelo, 324,85 U/L, pode ser alcançada ao se empregar um volume de suspensão de 500 mL com tempo de rompimento de 15 minutos, condições estas definidas pelo modelo. Para a validação do modelo, foi realizado um ensaio sob as condições definidas e obteve-se uma  $A_v$  de 317 U/L, demonstrando que o modelo se adequou aos resultados experimentais.

A Figura 7.3 ilustra a superfície de resposta para a atividade volumétrica de G6PD em função do volume de suspensão e do tempo de rompimento.

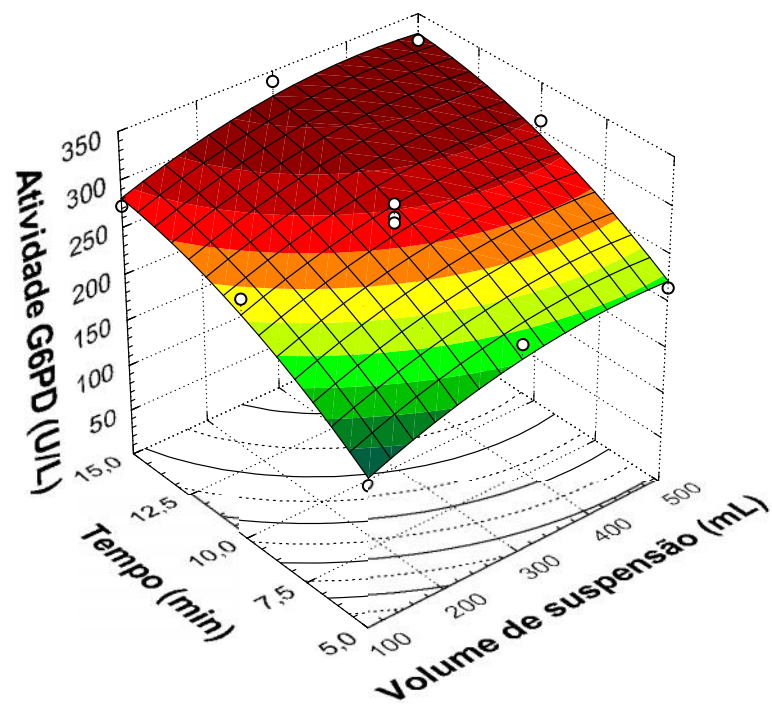


Figura 7.3. Atividade volumétrica de glicose-6-fosfato desidrogenase em função do volume de suspensão celular e do tempo de rompimento empregando uma velocidade de agitação de 400 rpm

Verifica-se que a curvatura não é acentuada, uma vez que a variação do volume de 100 para 500 mL empregado no rompimento proporciona um aumento discreto na resposta  $A_v$ . Assim, devido a pequena variação observada na variável resposta quando da utilização de menor volume de suspensão, optou-se pela continuidade dos estudos empregando 100 mL de suspensão celular e 15 minutos para o tempo de rompimento. O valor de velocidade de agitação fixado no menor nível, 400 rpm, pode ainda contribuir com a utilização de menor quantidade de energia uma vez que esta variável não tenha influenciado na liberação de G6PD.

### **7.1.1 Influência dos inibidores de proteases durante o rompimento celular e liberação da enzima G6PD e das proteínas totais**

Todos os ensaios do planejamento experimental referentes ao estudo do moinho de rompimento foram realizados com suspensões celulares preparadas em tampão Tris-HCl 0,071 M, pH 7,5 sem inibidores de proteases, semelhante aos ensaios realizados por outros autores, como por exemplo, Lovitt et al. (2000) que avaliaram a liberação de G6PD e de proteínas das células de *S. cerevisiae* rompidas em um homogeneizador hidráulico empregando suspensões celulares sem a adição de inibidores de proteases. Taubert et al. (2000), em estudo comparativo do rompimento de células de fungos filamentosos empregando diferentes métodos, também utilizaram suspensões celulares na ausência de inibidores. No entanto, em estudos de rompimento, outros autores empregaram inibidores de proteases tais como: PMSF (SONG e JACQUES, 1997), ácido aminocapróico e ditiotreitól (RICCI-SILVA et al., 2000).

A fim de verificar a magnitude da atuação das proteases, ensaios de rompimento foram realizados empregando inibidores. As condições empregadas foram 100 mL de suspensão celular (6,0 g/L), agitação de 400 rpm, temperatura de 25°C. Foram empregados como inibidores EDTA 0,2 mM, -mercaptoetanol 10 mM e ácido aminocapróico 2 mM. O efeito da presença dessas substâncias sobre  $A_e$ ,  $A_v$  e  $P_T$  em função do tempo de rompimento é mostrado na Figura 7.1.1.

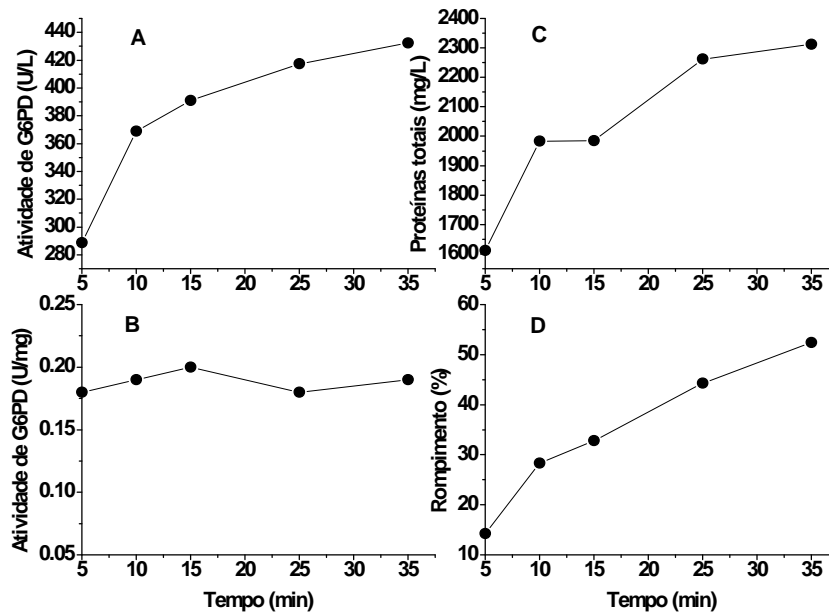


Figura 7.1.1. Influência do tempo de rompimento empregando moinho de esferas de vidro sobre as atividades volumétrica (A) e específica (B) de G6PD, proteínas totais liberadas (C) e porcentagem de rompimento celular (D) de uma suspensão celular de 6,0 g/L na presença de inibidores de proteases

Na Figura 7.1.1 D, pode-se notar que o rompimento celular aumentou, de forma acentuada, com o aumento do tempo de agitação, alcançando valor máximo de  $\pm 52\%$  com 35 minutos de rompimento. O mesmo comportamento foi observado para a liberação das proteínas (Figura 7.1.1 C) que variou de 1612 a 2312 mg/L aumentando-se o tempo de 5 para 35 minutos. Em relação à atividade volumétrica (Figura 7.1.1 A), a quantidade de G6PD liberada aumentou de 289 a 391 U/L (26%) nos primeiros 15 minutos, variando menos, 391 a 432 U/L (10%), nos 20 minutos subsequentes. Entretanto, a atividade específica desta enzima pouco alterou (Figura 7.1.1 B).

Comparando os resultados obtidos nos ensaios sem inibidores aos ensaios com inibidores (Tabela 7.1.1), nota-se que houve uma perda relativa de atividade volumétrica de G6PD e de proteínas totais liberadas. Tal fato pode ser explicado pela atuação das proteases, enzimas capazes de clivar outras proteínas. Desta forma, os valores de atividade específica permaneceram praticamente constantes.

**Tabela 7.1.1 – Ensaio de rompimento realizados na presença ou não de inibidores de proteases nos tempos de 5, 10 e 15 minutos**

Ensaio	Valor codificado		Valor real		Respostas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	A <sub>V</sub> (U/L)	A <sub>E</sub> (U/mg)	P <sub>T</sub> (mg/L)
1	-1	-1	5	Sem	115	0,23	511
2	+1	-1	15	Sem	257	0,26	996
3	-1	+1	5	Com	289	0,18	1612
4	+1	+1	15	Com	391	0,19	1985
5	0	-1	10	Sem	240	0,16	1497
6	0	+1	10	Com	369	0,19	1983

X<sub>1</sub>=tempo de rompimento (min);  
X<sub>2</sub>=inibidores de proteases

Ainda na Tabela 7.1.1, observa-se que empregando 5 minutos de rompimento houve uma redução de 68% na quantidade de proteínas totais e para 10 e 15 minutos, essa redução foi de 25% e 50%, respectivamente.

A fim de verificar a influência dos efeitos tempo de rompimento (quantitativo) e adição de inibidores de proteases (qualitativo) sobre a resposta A<sub>V</sub>, conduziu-se a análise de variância.

**Tabela 7.1.2 – Análise de variância (ANOVA) dos efeitos sobre a resposta atividade volumétrica de G6PD**

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	ρ
X <sub>1</sub> : Tempo	14884,00	1	14884,00	11,89	0,0748**
X <sub>2</sub> :Inibidor	31828,20	1	31828,20	25,42	0,0372*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	400,00	1	400,00	0,32	0,6289
Erro-puro	2504,67	2	1252,33		
Total	49616,87	5			

R<sup>2</sup> = 0,95

SQ=soma quadrática; GL=graus de liberdade; MQ=média quadrática

\*significância ao nível 95%; \*\*significância ao nível de 90%

A análise de variância demonstrou que apenas a presença dos inibidores de proteases apresentou-se significativo à resposta avaliada no intervalo de confiança de 95%. O tempo de rompimento foi significativo ao nível de 90%. Desta forma, para a posterior purificação da enzima G6PD, torna-se necessária a presença de inibidores de proteases durante o processo de rompimento celular nas condições avaliadas (Tabela 7.1.2).

Esse planejamento estatístico demonstrou, mais uma vez, que o tempo de rompimento é uma variável de fundamental importância no processo. Com isso, foram realizados ensaios de rompimento em moinho de esferas de vidro empregando suspensões celulares de 6,0 g/L (Figura 7.1.2) e 11,0 g/L (Figura 7.1.3) na presença ou ausência de inibidores de proteases (EDTA, ácido aminocaprílico e -mercaptoetanol), a temperatura de 25 °C e velocidade de agitação de 400 rpm. Nesse estudo observou-se o efeito do tempo de rompimento sobre a liberação de G6PD e de proteínas totais.

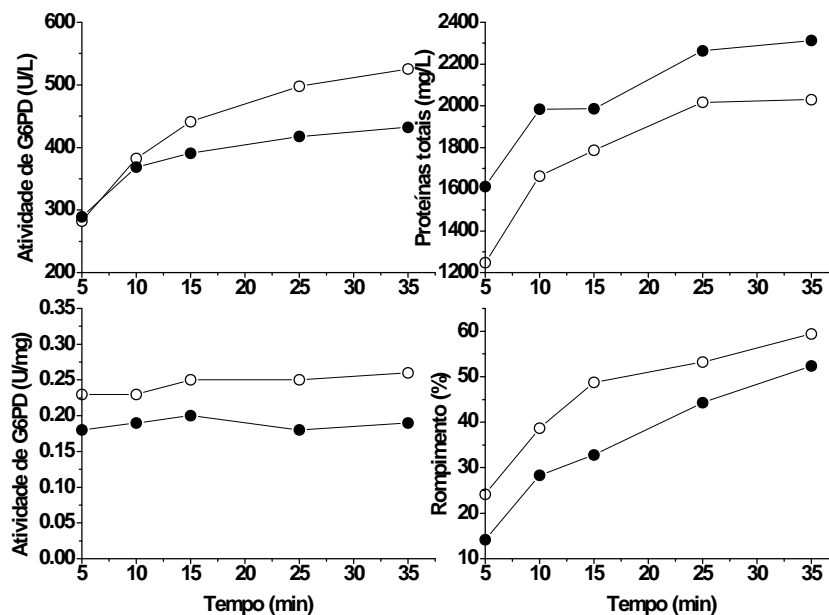


Figura 7.1.2. Influência do tempo de rompimento de células, empregando moinho de esferas de vidro, sobre a atividade volumétrica e específica de G6PD, proteínas totais liberadas e porcentagem de rompimento celular de uma suspensão celular de 6,0 g/L na presença (-●-) ou ausência (-○-) de inibidores de proteases

Na Figura 7.1.2 observa-se que o aumento no tempo de rompimento, em presença ou ausência de inibidores de proteases, favoreceu a liberação da enzima G6PD e de proteínas totais, além de proporcionar um aumento na eficiência de rompimento. No entanto, a atividade específica de G6PD permaneceu praticamente constante. Observa-se que nos ensaios conduzidos com inibidores de proteases presentes nas suspensões celulares de 6,0 g/L, os valores das atividades, volumétrica e específica, e porcentagem de rompimento foram menores que naqueles sem adição de inibidores, a exceção da quantidade de proteínas totais liberadas, que aumentou nos ensaios com inibidores. O fato de a atividade volumétrica de G6PD ser maior nos ensaios conduzidos sem EDTA, ácido aminocapróico e -mercaptoetanol, não significa que o uso destes seja negativo para o processo, uma vez que aumentam a estabilidade da enzima por períodos de até 20 horas (RIBEIRO, 2001).

Como pode ser observado, utilizando suspensão celular de 11,0 g/L (Figura 7.1.3), o aumento no tempo de rompimento favoreceu o rompimento das células e, conseqüentemente, a liberação de G6PD e proteínas totais, tanto em presença quanto ausência de inibidores. Nota-se que, com o aumento no tempo de rompimento de 25 para 35 minutos, a porcentagem de rompimento permaneceu praticamente inalterada. Tal comportamento também pode ser observado para quantidade de enzima (atividade volumétrica) e proteínas liberadas. Com isso, pode-se concluir que o tempo de rompimento de 25 minutos é suficiente para se alcançar eficiente liberação de G6PD, a partir do qual a enzima pode ficar mais susceptível a desnaturação, ainda que a porcentagem de rompimento das células tenha sido de 60%.

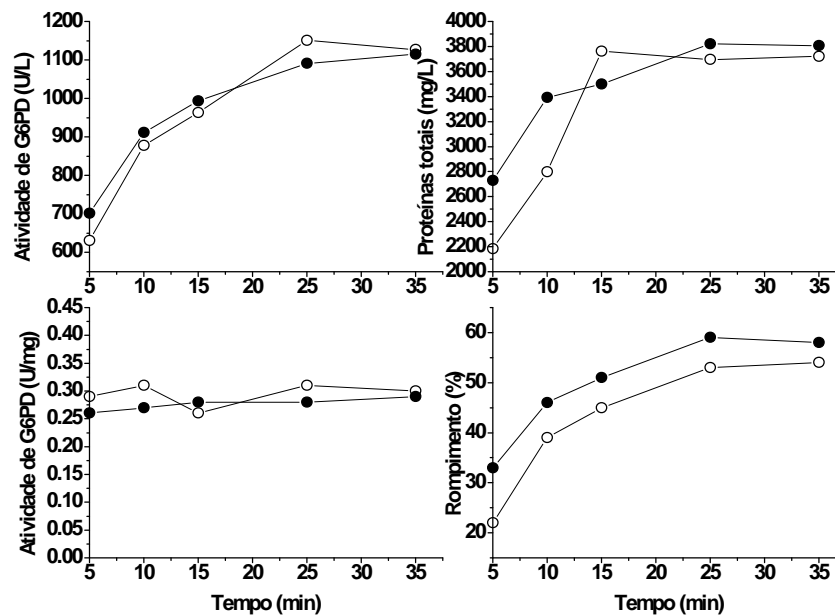


Figura 7.1.3. Influência do tempo de rompimento de células, empregando moinho de esferas de vidro, sobre a atividade volumétrica e específica de G6PD, proteínas totais liberadas e porcentagem de rompimento celular de uma suspensão celular de 11,0 g/L na presença (-●-) ou ausência (-○-) de inibidores de proteases

O aumento na concentração da suspensão celular de 6,0 para 11,0 g/L (Figuras 7.1.2 e 7.1.3), proporcionou um aumento de, aproximadamente, duas vezes na quantidade de G6PD liberada no meio. A presença de inibidores de proteases não demonstrou ser eficaz quando tempos maiores que 10 minutos foram utilizados no rompimento, pois uma discreta diminuição na atividade volumétrica de G6PD foi observada. Provavelmente, ocorra o predomínio do efeito de degradação do atrito entre esferas e biomoléculas sobre a ação de proteases propriamente ditas.

Assim, como em processos de purificação os rendimentos do produto recuperado podem estar relacionados à sua concentração inicial, optou-se pela utilização de suspensões com concentração celular de 11,0 g/L, em presença de inibidores de proteases, e tempo de rompimento de 25 minutos.



## 7.2 ESTUDO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

### 7.2.1 Obtenção dos diagramas de fases

O conhecimento de fatores que interferem na estabilidade da enzima torna-se importante, à medida que diminui a possibilidade de desnaturação durante o processo de *downstream*. A temperatura e o pH são fatores que podem influenciar na estabilidade desse produto de interesse. No presente trabalho, optou-se por manter o pH dos sistemas de duas fases aquosas em 7,5 e a temperatura de aproximadamente 25°C. Estudos realizados por Souza et al. (2002) revelaram que a enzima G6PD é estável no intervalo de pH de 7,0 a 9,5 mesmo após 51 horas quando solubilizadas em tampão. De acordo com esses autores, a estrutura macromolecular desta enzima está adaptada a valores de pH maiores devido ao fato do citoplasma das células de levedura, sua localização, ser normalmente tamponado em pH 6,5 - 7,5. Os valores de pH capazes de proporcionarem melhor estabilidade são maiores que o ponto isoelétrico da enzima, sendo para G6PD o pH 6,0. Com isso, para  $\text{pH} \geq 6,5$  pode-se supor que a carga elétrica efetiva desta enzima é negativa, ou seja, condição favorável à extração de G6PD do homogeneizado através de SDFAs, como em sistemas compostos por PEG e fosfato (SILVA et al., 2002).

A fase fundo de sistemas PEG/sal geralmente é formada por sais de fosfato de potássio. No presente trabalho foi utilizado um par básico/ácido de sais composto por  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  devido à alta solubilidade deste par quando comparado ao  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  ou a um par contendo os mesmos cátions. A elevada solubilidade de  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pode ser útil em aplicações industriais, uma vez que soluções estoque de altas concentrações podem ser necessárias. Além disso, alguns estudos demonstraram que a utilização de diferentes razões molares de sais fosfato de K - Na não afetam na posição da curva binodal quando comparado ao uso de um par de sais básico/ácido com os mesmos íons (KEPKA et al., 2005).

Na Figura 7.2.1.1 são mostradas as curvas binodais de sistemas PEG/fosfato em água.

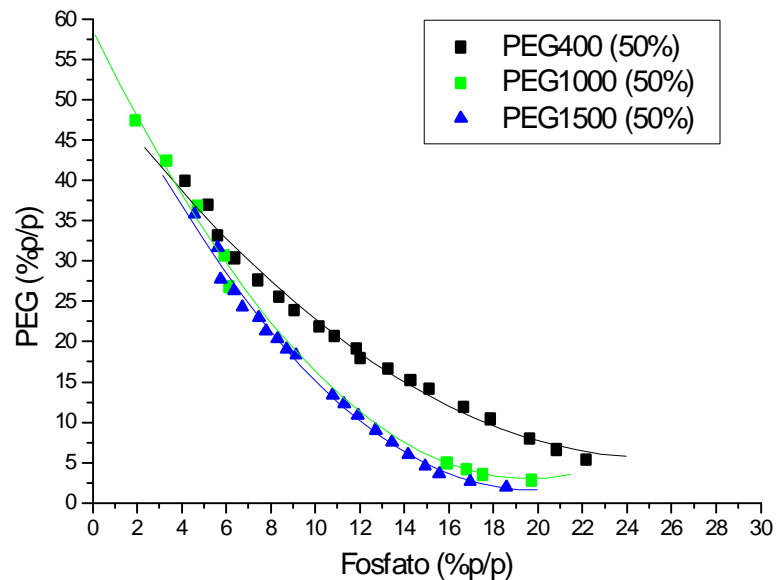


Figura 7.2.1.1. Curvas binodais para os sistemas PEG 400 /fosfato; PEG 1000/fosfato e PEG 1500/fosfato em água, a 25°C e pH 7,5

Nota-se que o aumento na massa molar de PEG provocou o deslocamento da curva binodal para a esquerda (região das menores concentrações dos componentes formadores do sistema), ou seja, a região bifásica aumentou com o aumento da massa molar. Taboada et al. (2001) observaram esta mesma tendência ao obter as curvas binodais de sistemas PEG 2000, 4000 e 6000 empregando o sal carbonato de sódio.

As curvas binodais dos sistemas PEG/fosfato em homogeneizado não puderam ser obtidas devido o homogeneizado apresentar turbidez característica.

### 7.2.2 Obtenção dos comprimentos de linha de amarração (TLL)

Após a obtenção dos diagramas de fases, foram determinados os comprimentos de linha de amarração (TLL). Essa variável substitui as variáveis concentrações de PEG e de fosfato no planejamento experimental para avaliar a extração de G6PD em SDFa. A TLL é a medida numérica única da composição destes sistemas. Para a determinação dos níveis da variável TLL a serem utilizados no planejamento estatístico, diferentes sistemas foram preparados. Nestes sistemas, variou-se a concentração de PEG, sendo que a concentração do fosfato foi mantida em 12%. Estas concentrações foram estipuladas de modo que seus pontos representativos estivessem situados acima das curvas binodais (região bifásica), para as diferentes massas molares de PEG empregadas. A massa de cada componente foi calculada para que a massa total do sistema fosse 6,0 g (Anexo 1).

Após calcular os comprimentos de linha de amarração (TLLs), plotou-se gráficos das TLLs em função de PEG% (p/p) para avaliar o comportamento de cada massa molar de PEG. O PEG 400 pode ser descrito por uma equação linear, ou seja, de 1° grau (Figura 7.2.2.1); PEG 1000 por uma equação de 2° grau (Figura 7.2.2.2) e o PEG 1500 por uma equação de 3° grau (Figura 7.2.2.3). As três equações apresentaram coeficientes de correlação elevados (99%).

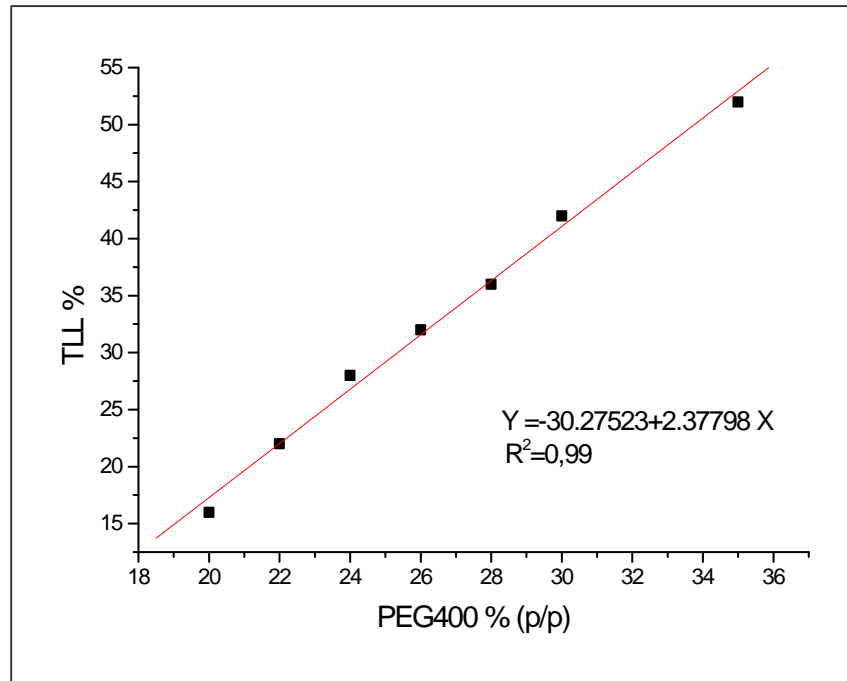


Figura 7.2.2.1. Gráfico do comprimento de linha de amarração (TLL) em função da concentração de PEG 400 (% p/p)

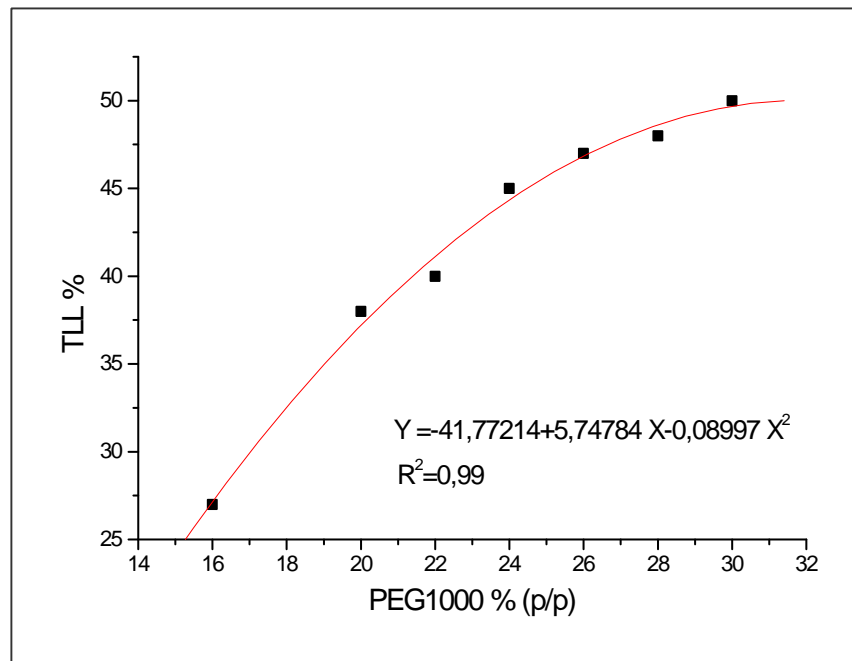


Figura 7.2.2.2. Gráfico do comprimento de linha de amarração (TLL) em função da concentração de PEG 1000 (% p/p)

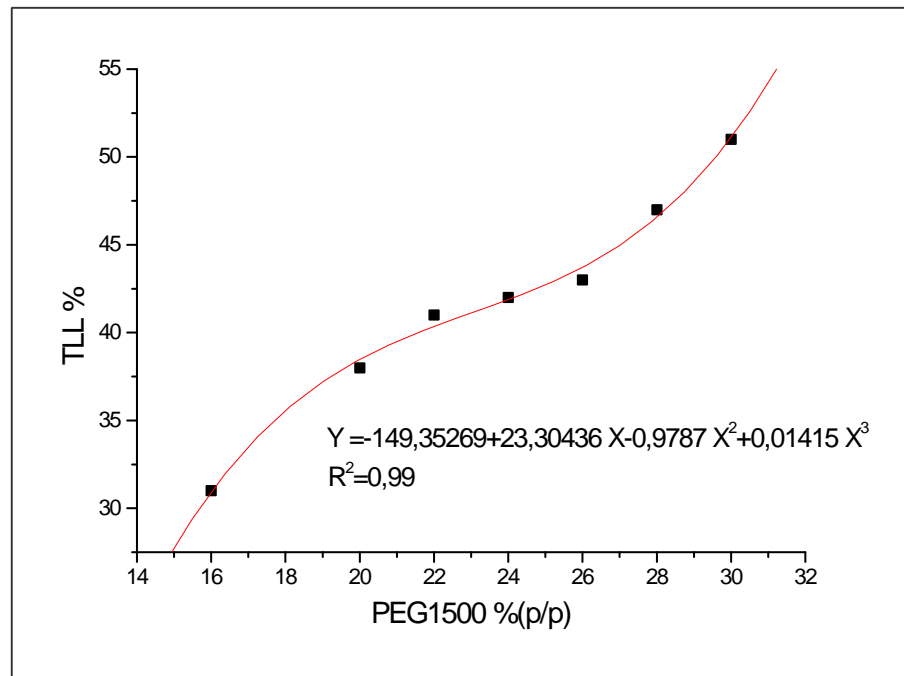


Figura 7.2.2.3. Gráfico do comprimento de linha de amarração (TLL) em função da concentração de PEG 1500 (% p/p)

Essas equações podem ser úteis à medida que, para um dado valor de TLL tornou-se possível calcular a porcentagem de PEG (% p/p) em um sistema com 12% (p/p) de solução de fosfato.

A partir dos comprimentos de linha de amarração, foi estabelecido um planejamento fatorial  $2^2$  para avaliar a extração de G6PD por sistemas de duas fases aquosas (SDFAs).

### 7.3 EXTRAÇÃO DE G6PD EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

Células de *C. guilliermondii* (fonte de G6PD) foram obtidas pelo processo de fermentação empregando hidrolisado de palha de arroz como meio de cultivo (condições descritas nos itens 4.3 e 4.4). Os ensaios de extração de G6PD em SDFAs foram realizados, em escala reduzida, em tubos de centrífuga graduados, com sistemas de massa total de 10,0 g. Previamente, o rompimento das células em

suspensão foi feito em condições definidas: concentração celular de 11,0 g/L, agitação de 400 rpm, tempo de 25 minutos a temperatura de 25°C (banho-maria). O homogeneizado obtido foi utilizado no processo de SDFA de dois modos: i) clarificado por centrifugação e ii) sem clarificar, na presença de fragmentos celulares. Os sistemas utilizados como branco foram preparados sem a adição de homogeneizado que foi substituído por tampão Tris HCl pH 7,5. Para realização do processo de extração, os sistemas foram agitados em agitador de tubos por 1 minuto e deixados em repouso por 2 h para a separação das fases. Uma vez separadas, as fases de topo e fundo foram guardadas em freezer para serem empregadas como branco dos ensaios do planejamento experimental (item 4.8).

Primeiramente, os ensaios de extração de G6PD foram conduzidos com suspensão celular de levedura rompida e clarificada (centrífuga refrigerada, 8000 rpm, 4 °C). Após o rompimento das células de *C. guilliermondii* em moinho de esferas de vidro sob condições predeterminadas, o homogeneizado sem fragmentos celulares foi congelado em frascos separadamente e descongelado à medida que os ensaios eram realizados.

As Figuras 7.3.1, 7.3.2 e 7.3.3 apresentam os comportamentos para a atividade volumétrica de G6PD e proteínas totais (mg/L) antes e após a separação das fases do SDFA, além de apresentar a atividade específica de G6PD (U/mg).

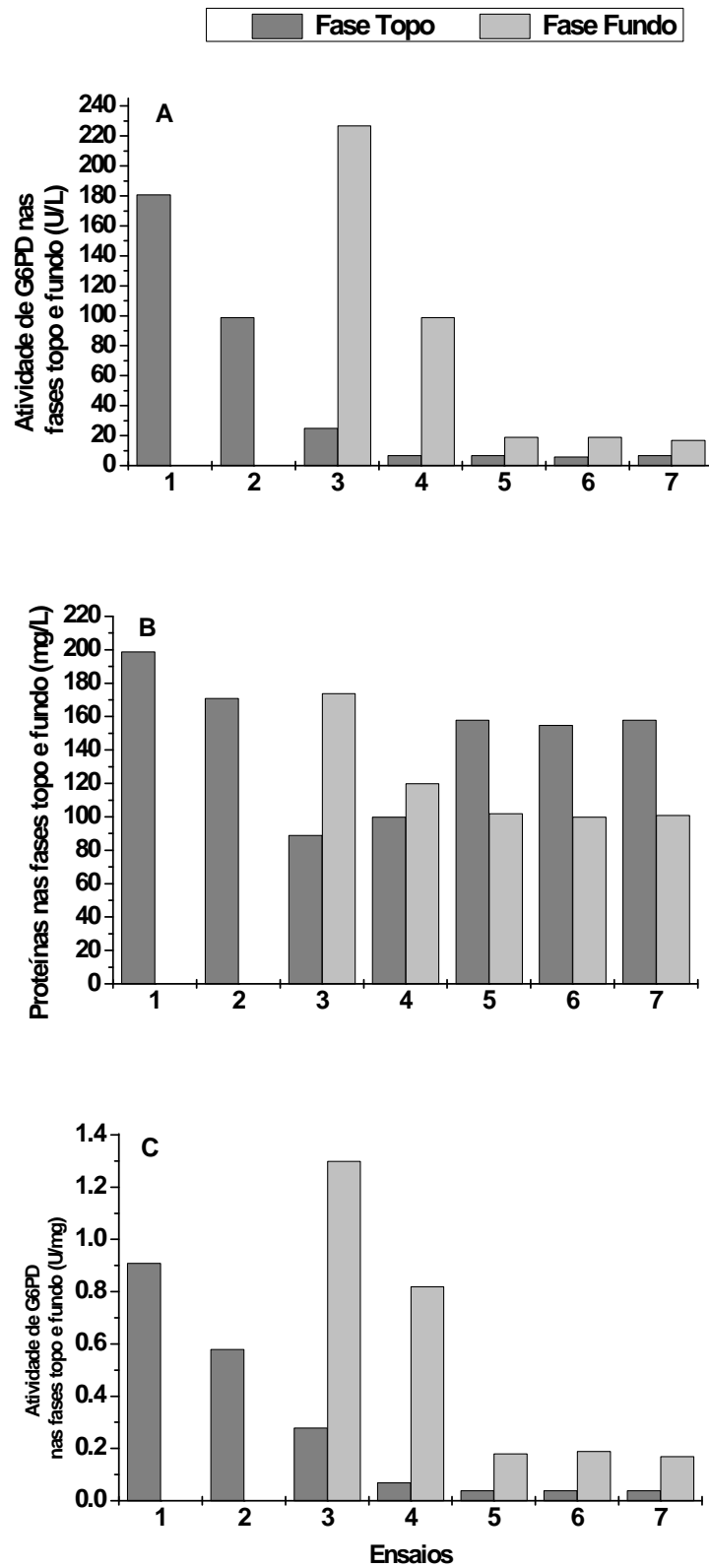


Figura 7.3.1. Valores de atividade volumétrica de G6PD (A), proteínas totais (B) e atividade específica de G6PD (C) nas fases topo e fundo dos ensaios realizados com homogeneizado clarificado

Na Figura 7.3.1 A, nota-se que nos ensaios 3, 4, 5, 6 e 7 a atividade volumétrica foi menor na fase topo, variando de 6,0 a 25,0 U/L, enquanto que na fase fundo, variou de 17,0 a 227,0 U/L. Esses ensaios tem em comum o fato de empregarem PEG de massa molar 1000 g/mol ou 1500 g/mol. De acordo com Cunha et al. (2003) o aumento na massa molar de PEG geralmente tende a diminuir a concentração da biomolécula-alvo na fase topo. Uma vez que a fase topo é rica em polímero, sua massa molar pode ter promovido a exclusão da proteína para a fase fundo. Ao contrário, nos ensaios 1 e 2 a atividade de G6PD foi mais elevada na fase topo, 181,0 e 99,0 U/L, respectivamente. Tais resultados corroboram com a possibilidade de exclusão da proteína, pois a massa molar do polímero empregado foi menor (400 g/mol). Nestes dois ensaios, a concentração de proteínas na fase fundo estava abaixo do limite de detecção do método utilizado (Figura 7.3.1 B). Com relação aos ensaios 3 e 4, as proteínas se apresentaram em maior quantidade na fase fundo. Entretanto, devido à pronunciada exclusão da enzima para esta fase, os maiores valores de atividade específica foram observados nestes ensaios, 1,3 e 0,82 U/mg, respectivamente.

Na Figura 7.3.2 observa-se o mesmo comportamento de migração para as fases topo e fundo da enzima G6PD e das proteínas presentes no homogeneizado contendo, nestes ensaios, fragmentos de células da levedura *C. guilliermondii* quando comparado aos ensaios conduzidos com homogeneizado clarificado (livres de fragmentos celulares). No entanto, os valores absolutos de atividades volumétrica e específica de G6PD e de proteínas totais foram diferentes. Nos ensaios 3, 4, 5, 6 e 7, a atividade volumétrica foi menor na fase topo, efeito de exclusão ocasionado pela massa molar dos polímeros com 1000 e 1500 g/mol, variando de 11,0 a 22,0 U/L, e maior na fase fundo, variando de 145,5 a 182,9 U/L. Semelhante aos ensaios conduzidos com homogeneizado clarificado, os ensaios 1 e 2 apresentaram atividade de G6PD mais elevada na fase topo, 148,5 e 100,2 U/L, respectivamente.

Nos ensaios 1, 2, 5, 6 e 7 as proteínas migraram em sua maior parte para a fase topo (Figura 7.3.2 B). Nos ensaios 3 e 4, nos quais se empregou PEG de maior massa molar, tanto as proteínas quanto a enzima G6PD foram excluídas para a fase fundo. Os melhores valores de atividade específica foram obtidos naqueles ensaios que se empregou PEG de massas molares 1000 e 1500 (ensaios de 3 a 7), alcançando valores de 1,23 a 1,62 U/mg. O efeito de exclusão proporcionou aumento na seletividade.



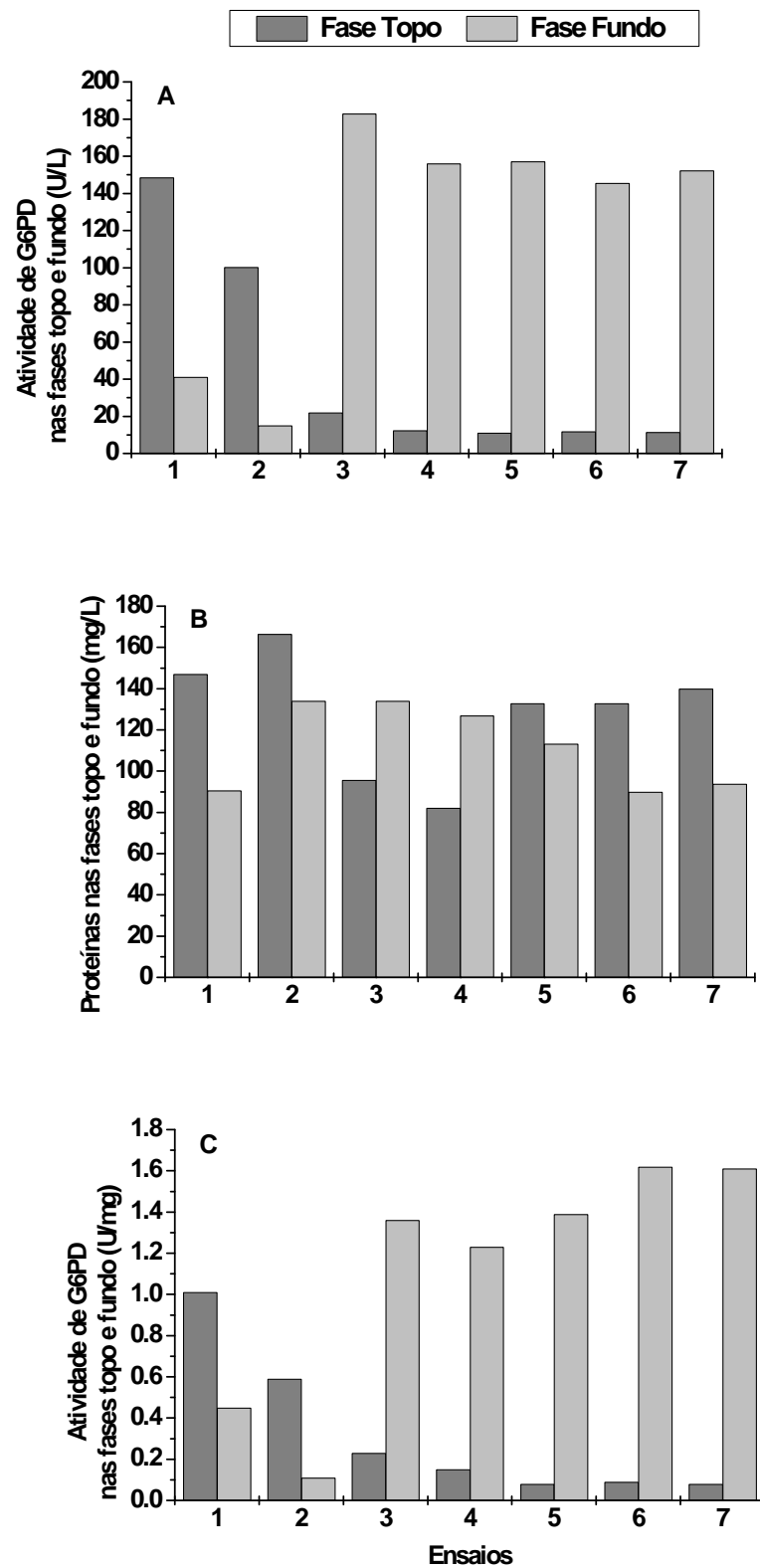


Figura 7.3.2. Valores de atividade volumétrica de G6PD (A), proteínas totais (B) e atividade específica de G6PD (C) nas fases topo e fundo dos ensaios realizados com homogeneizado não clarificado

A fim de se estudar a integração de processos em escala reduzida, foram realizados ensaios de extração em SDFA integrado ao rompimento celular com esferas de vidro em tubos de centrífuga graduados.

Para a realização dos experimentos, empregou-se volume de sistema e volume de esferas de vidro iguais, agitação em agitador de tubos por 5 minutos (com intervalos de 30 segundos em banho de gelo a cada 1 minuto de agitação). Os ensaios foram realizados baseados nas condições estabelecidas por planejamento 2<sup>2</sup>, sendo avaliados o comportamento de partição de G6PD e de proteínas totais no SDFA.

Os comportamentos de partição são apresentados na Figura 7.3.3 a qual representa os valores de atividade volumétrica de G6PD (U/L), proteínas totais (mg/L) e atividade específica de G6PD (U/mg) obtidos após repouso de 2 horas dos sistemas para que pudesse ocorrer a separação de fases. Nota-se que, de modo diferente dos ensaios realizados com homogeneizado clarificado e não clarificado, a enzima G6PD foi particionada em sua maior parte para a fase fundo nos ensaios conduzidos, integrando o rompimento celular à extração em SDFA. A exceção, o ensaio 4, 67,5% da atividade volumétrica da enzima foi dosada na fase topo, 77,0 U/L, e 28,3% na fase fundo, 56,5 U/L (Figura 7.3.3 A).

As proteínas se concentraram na fase topo nos ensaios conduzidos com PEG 1000 e 1500, ao passo que nos ensaios 1 e 2 (PEG 400), as proteínas foram mais particionadas para a fase fundo (Figura 7.3.3 B). Com isso, os maiores valores de atividade específica de G6PD foram obtidos nos ensaios de 3 a 7, alcançando valores de 0,63 a 1,34 U/mg.

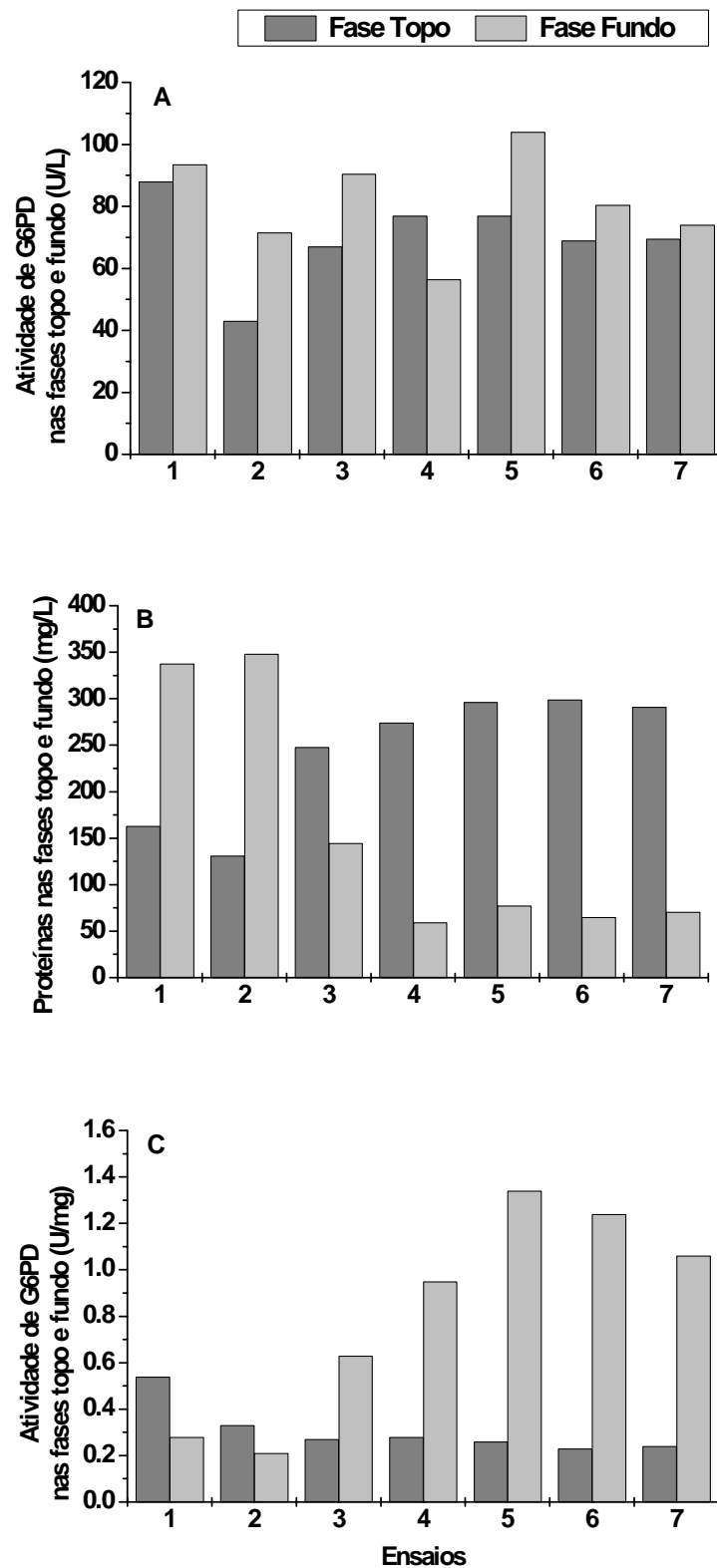


Figura 7.3.3. Valores de atividade volumétrica de G6PD (A), proteínas totais (B) e atividade específica de G6PD (C) nas fases topo e fundo dos ensaios de integração do rompimento celular ao SDFa realizados em escala reduzida (tubo de centrífuga graduado)

### 7.3.1 Comparação entre os processos de extração por SDFAs convencionais ao processo de integrado em escala reduzida

Após a realização dos ensaios, utilizou-se os valores de atividades volumétrica e específica de G6PD e a quantidade de proteínas, antes e após a separação de fases dos SDFAs, para se obter os valores dos parâmetros coeficiente de partição de G6PD ( $K_e$ ), coeficiente de partição de proteínas ( $K_p$ ), fator de purificação da enzima G6PD (FP), rendimento de G6PD e de proteínas e balanço de atividade (BA) e de proteínas (BP).

Nas Tabelas 7.3.1.1 a 7.3.1.3 estão apresentados os valores dos parâmetros relacionados aos ensaios empregando homogeneizado clarificado, não clarificado e de integração em pequena escala, respectivamente.

**Tabela 7.3.1.1 – Parâmetros de extração referentes aos ensaios do planejamento fatorial  $2^2$ , empregando homogeneizado clarificado (na ausência de fragmentos celulares)**

Ensaio	$K_e$	$K_p$	FP		Rendimento G6PD (%)		Balanço Proteína (%)	Balanço G6PD (%)
			Topo	Fundo	Topo	Fundo		
1	-	-	1,04	-	93,9	-	90,3	94,3
2	-	-	1,01	-	79,4	-	78,6	79,9
3	0,11	0,51	0,32	1,49	9,2	74,4	78,2	84,6
4	0,07	0,83	0,18	2,16	7,1	65,9	69,4	73,0
5	0,37	1,55	0,36	1,63	24,9	45,5	87,8	70,4
6	0,31	1,55	0,36	1,72	21,3	46,8	86,9	68,1
7	0,41	1,56	0,57	2,40	36,7	61,8	83,8	98,5

Na Tabela 7.3.1.1, nota-se que os maiores valores de FP na fase topo (1,04 e 1,01) foram obtidos nos ensaios 1 e 2, nos quais o SDFA era composto por PEG 400. No entanto, esses valores de  $FP_t$  não denotam aumento de pureza, uma vez que estão próximos de 1,0. Nestes ensaios os valores de coeficientes de partição tanto de proteínas quanto de enzimas não puderam ser obtidos, pois os valores de proteínas totais e de atividade volumétrica de G6PD na fase fundo não foram detectados. O aumento do tamanho de linha de amarração (TLL) de 30% para 40% provocou uma diminuição nos valores de coeficiente de partição de G6PD e de proteínas nos ensaios 3 e 4. Os ensaios 3, 4, 5, 6 e 7 apresentaram fatores de purificação maiores na fase fundo, de 1,49 a 2,40, com coeficientes de partição de proteínas maiores que os coeficientes de partição de G6PD. Os ensaios 3 e 4, nos quais utilizou-se o PEG 1500, apresentaram FP na fase fundo de 1,49 e 2,16, respectivamente, sendo que, neste último, o valor de  $K_e$  demonstrou uma acentuada preferência da enzima G6PD pela fase rica em sal. O balanço de proteína (BP) e de enzimas (BA) foram maiores que 60% em todos os ensaios realizados.

O ensaio 4 apresentou o melhor resultado com FP de G6PD na fase fundo de 2,16 e um rendimento de 65,9%.

**Tabela 7.3.1.2 – Parâmetros referentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, empregando homogeneizado não clarificado (na presença de fragmentos celulares)**

Ensaio	Ke	Kp	FP		Rendimento G6PD (%)		Balanço Proteína	Balanço G6PD
			Topo	Fundo	Topo	Fundo	(%)	(%)
1	3,63	1,62	1,91	0,85	134,3	14,1	86,5	148,4
2	6,67	1,24	1,11	0,21	88,6	4,9	101,4	93,5
3	0,12	0,72	0,43	2,56	14,7	109,9	76,6	124,6
4	0,07	0,64	0,28	2,32	9,4	71,4	64,7	80,8
5	0,07	1,17	0,15	2,62	8,3	78,6	83,0	86,9
6	0,08	1,47	0,16	3,05	9,2	71,0	77,3	80,2
7	0,07	1,48	0,15	3,03	8,3	76,1	80,8	84,4

Com referência aos parâmetros do processo de extração por SDFA dos ensaios conduzidos com homogeneizado não clarificado (Tabela 7.3.1.2), o melhor resultado foi obtido no ensaio 3 que apresentou um FP de G6PD de 2,56 e um rendimento de 109,9% na fase fundo. Nos ensaios 5, 6 e 7 (ponto central), apesar do FP de G6PD da fase fundo terem sido próximos aos valores do ensaio 3, os rendimentos de G6PD nesta fase foram inferiores, em média 75,2%. O balanço de proteína (BP) e de atividade de G6PD (BA) foram maiores que 60% em todos os ensaios realizados. Os valores de balanço de G6PD acima de 100% são frequentemente relatados em extrações de enzimas empregando Sistemas de Duas Fases Aquosas (DUARTE et al., 1999; FALCO et al., 2000; MAYERHOFF et al., 2004). Rendimentos superiores a 100% podem ser explicados pela eliminação de inibidores durante o processo de purificação e pela composição do sistema, o qual pode favorecer a atividade enzimática. Cortez et al. (2001), concluíram que recuperações da enzima xilitol desidrogenase (XD) através da utilização da extração líquido-líquido, no caso em sistemas micelares reversos, com valores acima de 100% se deve a redução na concentração de diversos compostos inibidores (compostos hidrofóbicos como furfural, hidroximetil furfural, fenóis, etc) presentes no homogeneizado inicial.

Na Tabela 7.3.1.3, estão apresentados os parâmetros do processo de extração por SDFA integrado ao rompimento das células de levedura, em tubos de centrífuga graduados. Observa-se que em praticamente todos os ensaios, o valor de  $K_e$  foi menor que 1,0, demonstrando tendência de partição da enzima G6PD para a fase fundo, exceto o ensaio 4 no qual a enzima apresentou-se em sua maior parte na fase topo ( $K_e > 1,0$ ). Em relação às proteínas, estas se apresentaram concentradas na fase topo, após a separação das fases dos sistemas 3 a 7 (PEG 1000 e PEG 1500) uma vez que os valores de  $K_p$  foram maiores que 1,0. Nos ensaios 1 e 2, os valores de  $K_p$  foram menores que 1,0, ou seja, as proteínas foram concentradas na fase fundo. Os maiores valores de FP foram obtidos na fase fundo dos ensaios conduzidos com PEG de massa molar 1000 e 1500, variando de 1,23 a 2,35.

**Tabela 7.3.1.3 – Parâmetros referentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, empregando integração de processos em escala reduzida**

Ensaio	Ke*	Kp*	FP*		Rendimento		Balanço	Balanço
			Topo	Fundo	Topo	Fundo	Proteína*	G6PD*
							(%)	(%)
1	0,94	0,48	0,67	0,35	48,2	13,1	110	61,3
2	0,60	0,37	0,50	0,32	29,2	12,1	98,2	41,3
3	0,74	1,71	0,52	1,23	46,6	45,3	125,5	91,9
4	1,36	4,60	0,67	2,26	67,5	28,3	112,2	95,8
5	0,74	3,82	0,45	2,35	49,3	33,3	122,4	82,6
6	0,85	4,60	0,38	2,10	45,1	28,2	128,9	73,3
7	0,93	4,12	0,43	1,90	45,5	23,3	117,5	68,8

\*média dos valores de 2 repetições

O balanço de atividade de G6PD foi maior que 60%, com exceção do ensaio 2, enquanto que o balanço de proteína apresentou-se acima de 100% em quase todos os ensaios. Tal fato pode ser explicado pela possível presença de fragmentos celulares, os quais poderiam interferir na análise protéica devido à proximidade de comprimento de onda na qual esta análise e a de densidade ótica são realizadas, 595 e 600 nm, respectivamente.

As comparações entre os parâmetros dos ensaios empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado com os ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em Sistemas de Duas Fases Aquosas são apresentadas nas Figuras de 7.3.1.1 a 7.3.1.8.

Nas Figuras 7.3.1.1 e 7.3.1.2, nota-se um mesmo comportamento para os valores de Ke e Kp. O coeficiente de partição, K, representa a relação entre as concentrações da molécula de interesse na fase topo e na fase fundo, após o equilíbrio entre estas fases. Este valor pode ser utilizado para avaliar a extensão das separações da molécula de interesse nos sistema de duas fases aquosas. Coeficientes de partição significativamente distintos para a molécula de interesse e para as demais moléculas indicam ocorrência de purificação (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

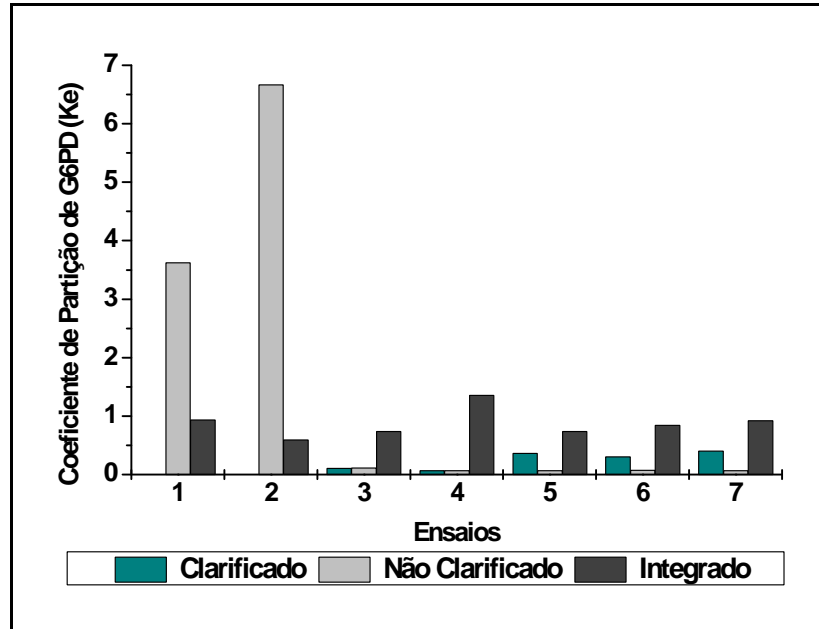


Figura 7.3.1.1. Coeficiente de partição de G6PD ( $K_e$ ) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida

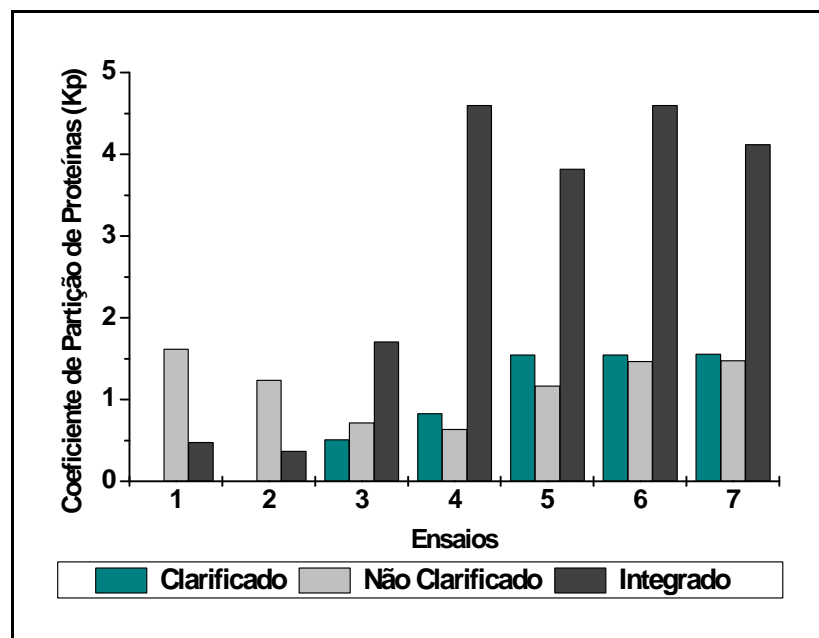


Figura 7.3.1.2. Coeficiente de partição de proteínas ( $K_p$ ) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida



Nos ensaios em que se empregou PEG 400 os valores de  $K_e$  e  $K_p$  foram acentuados, demonstrando a preferência de G6PD e de proteínas pela fase rica em PEG (ensaios 1 e 2). Entretanto, os valores dos parâmetros  $K_e$  e  $K_p$  não puderam ser obtidos nos ensaios conduzidos com homogeneizado clarificado. Nos ensaios em que foram utilizados PEG de massas molares mais elevadas, PEG 1000 e 1500, a enzima G6PD apresentou-se em maior concentração na fase rica em sal, ou seja, na fase fundo, independentemente dos ensaios terem sido realizados com homogeneizado clarificado ou não clarificado. Tal fato pode ser explicado pela teoria do volume de exclusão segundo a qual o aumento na concentração e massa molar de PEG induz a uma diminuição da solubilidade da proteína, no caso a enzima G6PD, na fase rica em polímero (SPELZINI et al., 2005). Com exceção do ensaio 4 empregando a integração de processos de rompimento à extração em SDFa, no qual a enzima apresentou-se mais solubilizada na fase rica em polímero, ou seja, na fase topo.

Em relação às proteínas totais, estas se apresentaram em menor concentração na fase rica em sal e mais solubilizadas na fase rica em polímero, principalmente, nos ensaios realizados com a presença de fragmentos celulares (empregando homogeneizado não clarificado e naqueles conduzidos com a integração de processos). Provavelmente, os compostos sólidos, células inteiras ou rompidas, tendem a ser excluídos da fase polimérica devido ao seu tamanho, impedindo assim, a solubilização das proteínas nesta fase.

Estes valores de  $K_e$  e  $K_p$  podem ser confirmados nas Figuras 7.3.1.3 e 7.3.1.4, nas quais os valores de FP na fase topo foram maiores nos ensaios 1 e 2 e menores para os demais ensaios, exceto no ensaio 4 que apresentou um FP na fase superior maior quando se empregou processo integrado. De modo diferente, os valores de FP na fase fundo foram menores para os ensaios 1 e 2 e maiores para os outros ensaios.

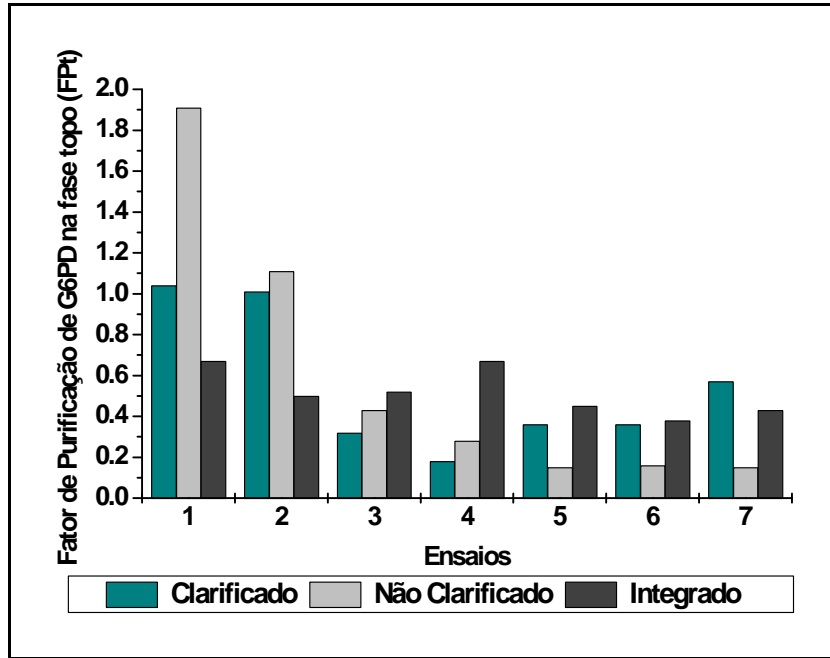


Figura 7.3.1.3. Fatores de purificação de G6PD na fase topo (FPt) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida

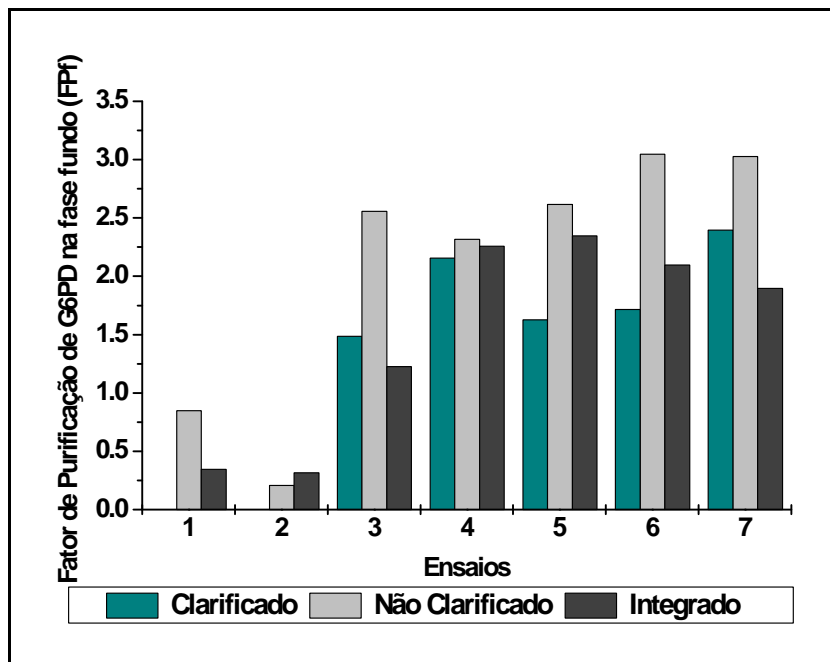


Figura 7.3.1.4. Fatores de purificação de G6PD na fase fundo (FPf) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida

Os valores de FP na fase topo foram maiores para os ensaios 5, 6 e 7 (valor médio dos pontos centrais) realizado com homogeneizado clarificado, 1 e 2 dos ensaios realizados com homogeneizado não clarificado, sendo que nos ensaios 3 e 4, os maiores valores de FP nessa fase foram alcançados com a integração de processos (Figura 7.3.1.3).

Para o FP da fase fundo, os valores foram maiores nos ensaios 1, 3, 4, 5, 6 e 7 efetuados com homogeneizado não clarificado. No entanto, processos de purificação devem apresentar FP maiores que 1,0, ou seja, o processo utilizado foi eficaz na concentração ou purificação da biomolécula de interesse presente no homogeneizado inicial (Figura 7.3.1.4). Com isso, valores maiores que 1,0 foram alcançados nos ensaios conduzidos com polímeros de massa molar 1000 e 1500, independentemente do homogeneizado ser clarificado, não clarificado ou do processo de rompimento celular estar integrado ao processo de extração em SDFAs. De modo geral, os melhores valores de FP na fase fundo obtidos foram nos ensaios de número 4 sendo 2,16; 2,32 e 2,26, respectivamente.

Os rendimentos de G6PD foram menores na fase fundo (Yef) quando comparados aos da fase topo (Yet) dos ensaios 1 e 2, conduzidos em presença de homogeneizado clarificado e não clarificado. Nos ensaios 3, 4, 5, 6 e 7 os maiores rendimentos foram atingidos na fase fundo dos SDFAs. No entanto, comportamento diferente foi observado nos ensaios referentes à integração dos processos, sendo alcançados maiores valores de rendimento na fase polimérica, ou fase topo (Figuras 7.3.1.5 e 7.3.1.6)

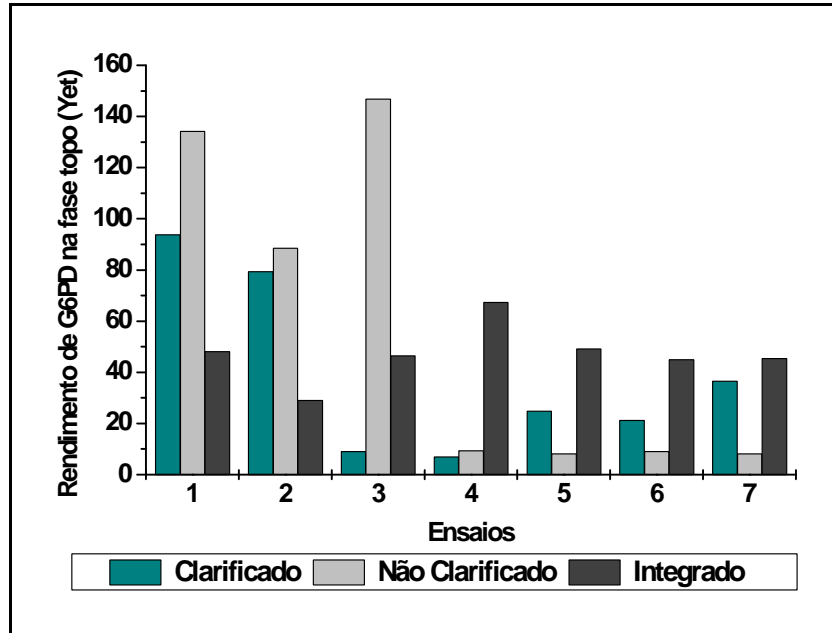


Figura 7.3.1.5. Rendimentos de G6PD na fase topo (Yet) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida

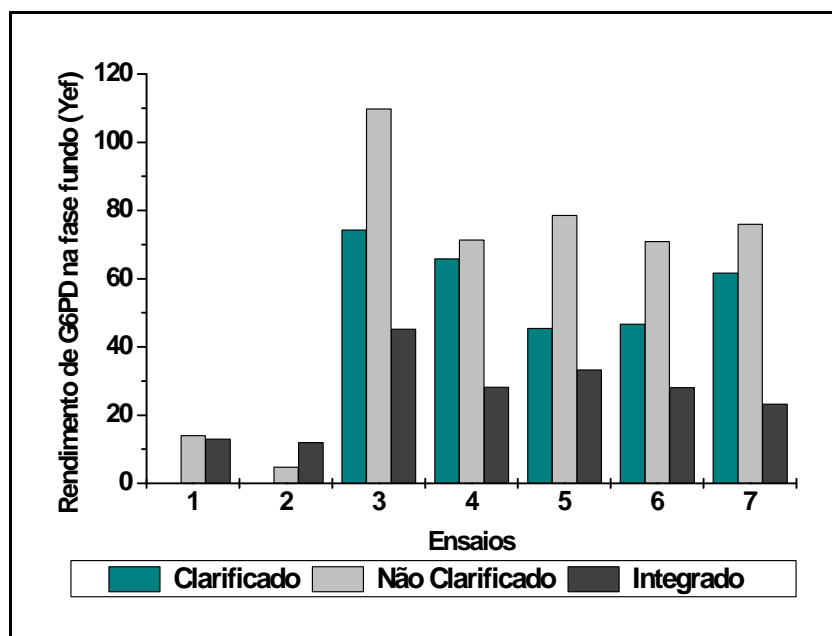


Figura 7.3.1.6. Rendimentos de G6PD na fase fundo (Yef) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA, em escala reduzida

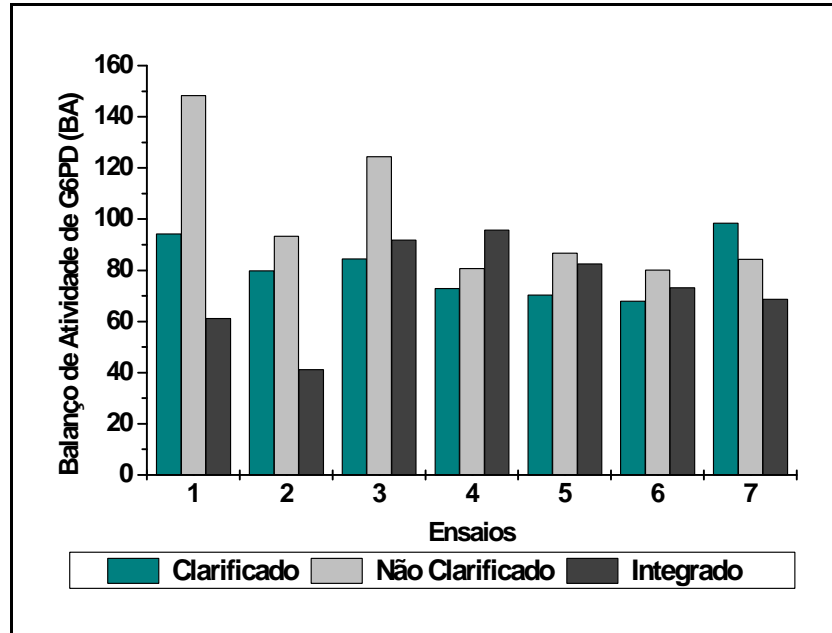


Figura 7.3.1.7. Balanço de atividade de G6PD (BA) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFa, em escala reduzida

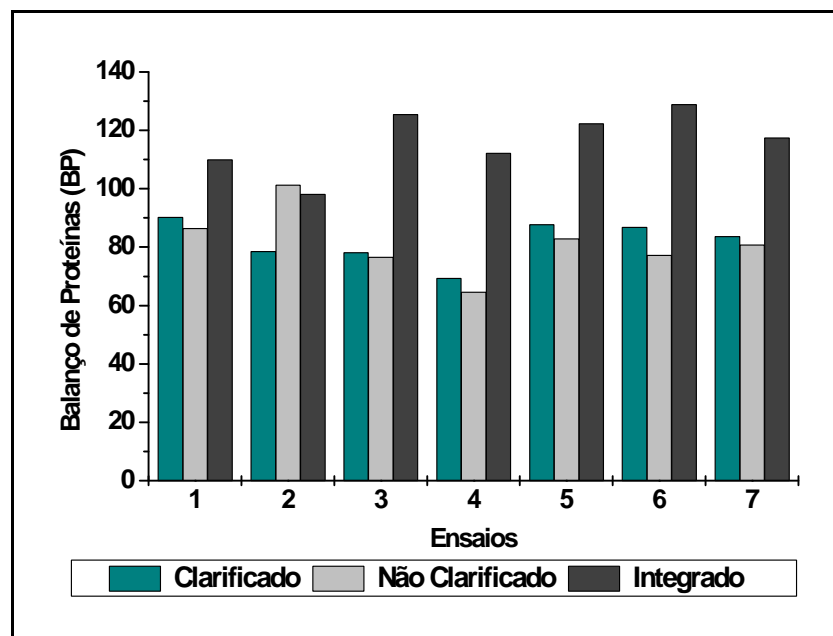


Figura 7.3.1.8. Balanço de proteínas (BP) dos ensaios em Sistemas de Duas Fases Aquosas empregando homogeneizado clarificado, homogeneizado não clarificado e ensaios conduzidos com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFa, em escala reduzida

Os balanços de G6PD (BA) foram maiores que 60%, alcançando valores acima de 100% (exceto ensaio 2 empregando a integração de processos, no qual BA = 41,3%). Já os balanços de proteínas variaram de 64,7% a 128,9% (Figuras 7.3.1.7 e 7.3.1.8). Marcos et al. (2002), constataram que o aumento na concentração de PEG e concentração do sal citrato de sódio provocaram uma diminuição tanto no balanço de proteínas quanto no balanço de atividade da enzima penicilina acilase, provavelmente, devido à precipitação. Estes autores observaram que em elevadas concentrações de PEG e sal o precipitado formado se acumulou na interface ou sedimentou dependendo da densidade da fase fundo.

No presente trabalho, este mesmo comportamento foi observado em todos os ensaios, seja com homogeneizado clarificado, não clarificado ou na integração de processos. Apesar dos ensaios terem sido realizados em uma concentração fixa de fosfato (12 %p/p), o aumento da TLL resulta em um aumento na concentração de PEG. De acordo com Marcos et al. (2002), existem outros fatores relacionados com as características das duas fases do sistema, além da concentração de PEG e sal, que podem determinar a precipitação de proteínas e/ ou inativação da enzima. Para Rito-Palomares e Cueto (2000), a presença de componentes celulares pode modificar as características dos SDFAs, seja no comprimento de linha de amarração (TLL), razão volumétrica ( $V_r$ ) ou posição da curva binodal, que, conseqüentemente, levaria a obtenção de resultados diferentes dos parâmetros do processo de extração por SDFA.

Uma vez que, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a integração dos processos de rompimento das células de *C. guilliermondii* com a extração de G6PD por SDFA, seguiu-se com a análise estatística destes ensaios.

### **7.3.2 Análise estatística dos ensaios de extração de G6PD em sistema de duas fases aquosas (SDFA) empregando integração de processos em escala reduzida**

A influência das variáveis TLL e massa molar de PEG sobre as respostas Fator de purificação de G6PD na fase topo ( $FP_t$ ) e na fase fundo ( $FP_f$ ), Rendimento de G6PD na fase topo ( $Ye_t$ ) e na fase fundo ( $Ye_f$ ), dos ensaios realizados com a integração dos processos de rompimento celular à extração da enzima de interesse

em SDFA (escala reduzida), pôde ser melhor avaliada empregando-se a análise estatística.

**Tabela 7.3.2.1 – Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> empregado para avaliar o efeito da TLL e da massa molar de PEG na extração de G6PD por SDFA integrada ao rompimento celular em escala reduzida**

<b>Ensaio</b>	<b>TLL (%)</b>	<b>PEG (MM)</b>	<b>FP<sub>t</sub></b>	<b>FP<sub>f</sub></b>	<b>Ye<sub>t</sub> (%)</b>	<b>Ye<sub>f</sub> (%)</b>
1	30	400	0,67	0,35	48,2	13,1
2	40	400	0,50	0,32	29,2	12,1
3	30	1500	0,52	1,23	46,6	45,3
4	40	1500	0,67	2,26	67,5	28,3
5	35	1000	0,45	2,35	49,3	33,3
6	35	1000	0,38	2,10	45,1	28,2
7	35	1000	0,43	1,90	45,5	23,3

As respostas fator de purificação na fase topo (FP<sub>t</sub>), fator de purificação na fase fundo (FP<sub>f</sub>) e rendimento de G6PD na fase topo (Ye<sub>t</sub>) e na fase fundo (Ye<sub>f</sub>) foram analisadas estatisticamente.

A Figura 7.3.2.1 mostra o gráfico de Pareto o qual representa os efeitos estimados, em ordem decrescente de magnitude, das variáveis TLL (1), massa molar de PEG (2) e suas interações (1x2) sobre as respostas FP<sub>t</sub>, FP<sub>f</sub>, Ye<sub>t</sub> e Ye<sub>f</sub>, bem como o efeito da curvatura. O tamanho de cada barra é proporcional ao efeito estimado. A linha vertical é utilizada para avaliar quais dos efeitos são estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 90%.

Pode-se observar que o efeito da curvatura foi significativa tanto para a resposta FP<sub>t</sub> quanto para a resposta FP<sub>f</sub>, sendo que o efeito principal da variável massa molar de PEG (2) foi significativo para as respostas FP<sub>f</sub>, Ye<sub>t</sub> e Ye<sub>f</sub>. O efeito positivo desta variável sobre estas respostas, demonstra que a utilização de PEG com massa molar maior proporciona um aumento no fator de purificação da enzima na fase fundo dos SDFAs e nos rendimentos da enzima G6PD tanto para a fase

topo quanto para a fase fundo. A interação das variáveis TLL e massa molar de PEG (1x2) também foi significativa para as respostas  $FP_t$  e  $Ye_t$ .

Os valores de coeficientes de determinação, ou  $R^2$ , foram 97%, 98%, 99% e 94% para as respostas  $FP_t$ ,  $FP_f$ ,  $Ye_t$  e  $Ye_f$ , respectivamente.

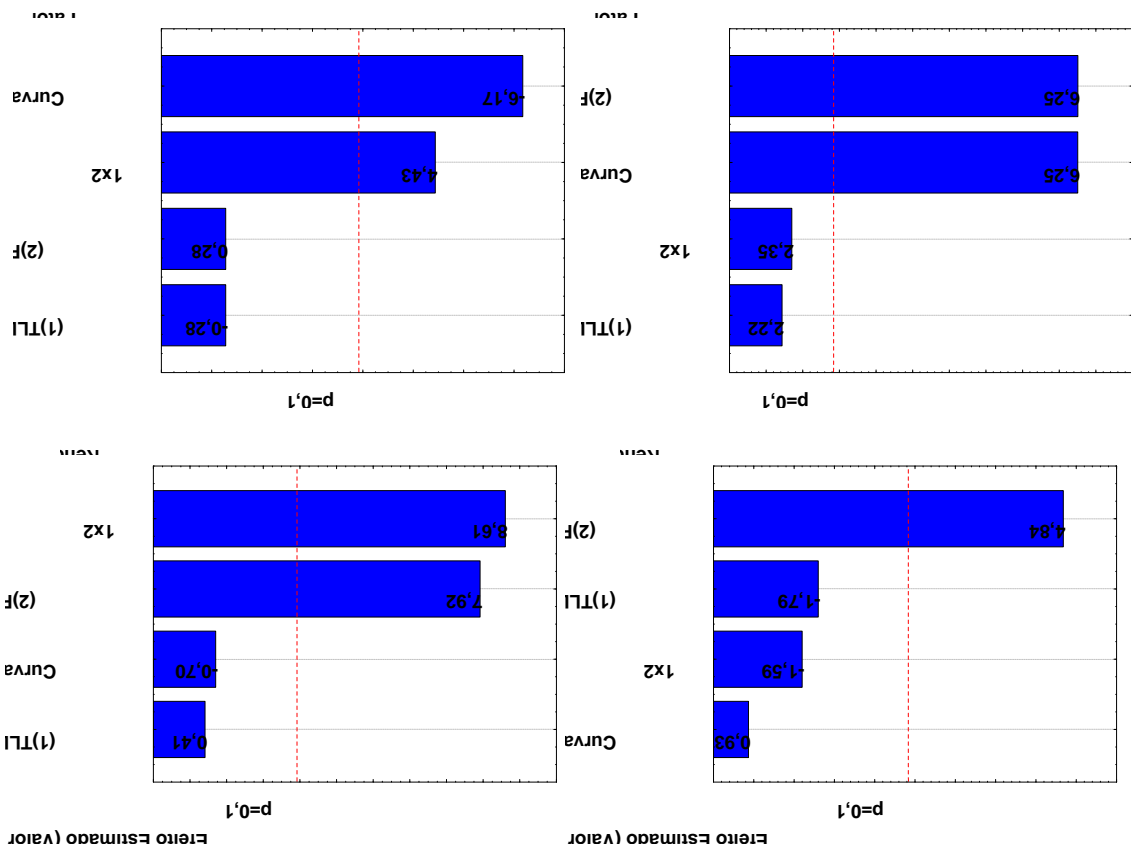


Figura 7.3.2.1. Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis comprimento de linha de amarração (1) e massa molar de PEG (2) sobre as resposta  $FP_t$ ,  $FP_f$ ,  $Ye_t$  e  $Ye_f$  dos ensaios em SDFA realizados com a integração do processo de rompimento celular



Nos ensaios conduzidos com a integração de processos, os valores de fator de purificação de G6PD na fase rica em sal foram maiores que os da fase rica em polímero nos sistemas de duas fases aquosas empregando PEG 1000 e 1500 g/mol. Com relação ao emprego de PEG 400 g/mol, não se observou aumento na pureza de G6PD ( $FP < 1,0$ ) tanto na fase topo quanto na fase fundo. A massa molar relativamente menor deste polímero, quando comparado aos outros dois utilizados, permitiu uma partição da enzima e de proteínas para ambas as fase, ou seja, uma baixa seletividade, diminuindo o valor de FP.

Além da massa molar de PEG, para a resposta  $FP_f$ , a curvatura apresentou-se significativa. Com isso optou-se por realizar a otimização do processo utilizando um planejamento experimental com face centrada. Como o objetivo deste trabalho é a purificação de G6PD, ressalta-se que a condição favorável seria a obtenção de bom rendimento da enzima na fase rica em sal e com elevado fator de purificação.

### **7.3.3 Otimização do processo de extração de G6PD por SDFA integrado ao rompimento celular em escala reduzida**

Buscando-se um modelo matemático para descrever a purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, através da integração do processo de rompimento celular com a extração em SDFA, empregou-se um planejamento fatorial completo  $2^2$  com face centrada e 3 repetições no ponto central, sendo estudadas as variáveis comprimento de linha de amarração (TLL) e massa molar de PEG. Os níveis utilizados nos experimentos para as duas variáveis e os valores obtidos para as variáveis resposta,  $FP_f$  e  $Y_{ef}$  estão apresentados na Tabela 7.3.3.1.

Os níveis dos fatores usados na otimização foram codificados em -1, 0, +1, correspondendo ao nível inferior, ponto central e nível superior, respectivamente.

**Tabela 7.3.3.1 – Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com face centrada dos ensaios de extração de G6PD em SDFA em processos integrados (escala reduzida)**

Ensaio Nº	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		FP <sub>f</sub>	Ye <sub>f</sub>
	TLL	PEG	TLL	PEG		
	(%)	(MM)	(%)	(MM)		
1	-1	-1	30	400	0,35	13,1
2	+1	-1	40	400	0,32	12,1
3	-1	+1	30	1500	1,23	45,3
4	+1	+1	40	1500	2,26	28,3
5	-1,6	0	27	1000	2,95	39,0
6	+1	0	40	1000	2,80	25,9
7	0,3	-1	36	400	0,41	17,5
8	0,5	+1	38	1500	3,31	40,9
9	0	0	35	1000	2,35	33,3
10	0	0	35	1000	2,10	28,2
11	0	0	35	1000	1,90	23,3

Rendimento de G6PD na fase fundo, Ye<sub>f</sub> %

Como pode ser visto na Tabela 7.3.3.1, independentemente do comprimento de linha de amarração utilizado, em valores de massa molar de PEG 1000 e 1500 g/mol, obteve-se os melhores valores tanto de rendimento de G6PD na fase fundo (Ye<sub>f</sub>) quanto de fator de purificação de G6PD na fase fundo (FP<sub>f</sub>). De acordo com ANTOV et al. (2006), uma vez que o objetivo de uma extração satisfatória por SDFA é encontrar um sistema de fases aplicável, no qual a separação seletiva destas fases possa ser alcançada, a escolha da massa molar do polímero é, geralmente, a primeira etapa deste processo de purificação. A massa molar do polímero influencia a partição da biomolécula através da alteração do diagrama de fases, seja influenciando na composição das fases topo e fundo, seja pela mudança das interações entre enzima-polímero. Com o aumento do tamanho da biomolécula, a partição para uma das fases tende a aumentar. Usualmente, o coeficiente de

partição da enzima de interesse diminui com o aumento do comprimento da cadeia de polietilenoglicol e, conseqüentemente, com a massa molar do polímero.

Os parâmetros de um modelo de segunda ordem (quadrático) usados para estimar o fator de purificação de G6PD na fase fundo ( $FP_f$ ) em função do comprimento de linha de amarração (TLL) e da massa molar do PEG foram obtidos através da análise de regressões múltiplas, mostrada na Tabela 7.3.3.2.

**Tabela 7.3.3.2 – Efeito estimado, teste  $t$  (Student), valores de  $F$  do planejamento completo  $2^2$  com face centrada e 3 repetições no ponto central para avaliar a purificação de G6PD obtida com a integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA**

Variáveis	Coefficientes	$t$	$F$
Média	2,245	6,761	0,001*
TLL (A)	0,248	1,005	0,361
PEG (B)	0,888	3,512	0,017*
TLLxPEG (AB)	0,369	1,241	0,269
TLLxTLL ( $A^2$ )	0,286	1,017	0,355
PEGxPEG ( $B^2$ )	-1,185	-3,155	0,025*

A significância estatística do modelo quadrático (Tabela 7.3.3.3) foi avaliada pelo teste  $F$ , e revelou que esta regressão é estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade. O modelo não apresentou falta de ajuste e o coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,84$ ) indica que 84% das variações no fator de purificação da enzima, por este sistema, podem ser explicadas pelo modelo. Desta forma, um modelo matemático que descreve a purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase através da integração do rompimento celular a extração em SDFA, considerando a região em estudo, pode ser expresso pela Equação 18:

$$FP_f = 2,25 + 0,25A + 0,89B + 0,37AB + 0,29A^2 - 1,19B^2 \quad (18)$$

Onde:  $FP_f$  = fator de purificação de G6PD na fase fundo, A e B são os valores codificados da massa molar de PEG e do comprimento de linha de amarração (TLL), respectivamente.

**Tabela 7.3.3.3 – Análise de variância (ANOVA) dos fatores significativos ao processo de integração do rompimento celular a extração de G6PD em SDFa em escala reduzida**

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	
Modelo	9,90	5	1,98	5,30	0,0455*
Resíduo	1,87	5	0,37		
<i>Falta de ajuste</i>	<i>1,76</i>	<i>3</i>	<i>0,59</i>	<i>11,57</i>	<i>0,0806</i>
<i>Erro Puro</i>	<i>0,10</i>	<i>2</i>	<i>0,051</i>		

$R^2 = 0,84$  GL=graus de liberdade, SQ=soma quadrática, MQ=média quadrática

A superfície de resposta obtida pela equação do modelo que representa o Fator de Purificação de G6PD na fase rica em sal em função das variáveis comprimento de linha de amarração (TLL%) e massa molar de PEG (MM), na região estudada, está mostrada na Figura 7.3.3.1. Nota-se uma tendência crescente da resposta avaliada com o aumento do nível de TLL e PEG, ou seja, o Fator de Purificação da fase fundo pode ser melhorado com o aumento da concentração e da massa molar do polímero empregado (PEG).

Através da equação obtida, o modelo matemático prevê um  $FP_f$  máximo de 2,8 empregando-se TLL de 40% e PEG 1500 g/mol, podendo ocorrer uma variação de 1,6 a 4,1 dentro do intervalo de confiança de 95%. O modelo foi validado experimentalmente, sendo o valor médio obtido para a resposta  $FP_f$  de 3,8. Este resultado demonstra que o modelo se adequou aos resultados experimentais, descrevendo a região em estudo.

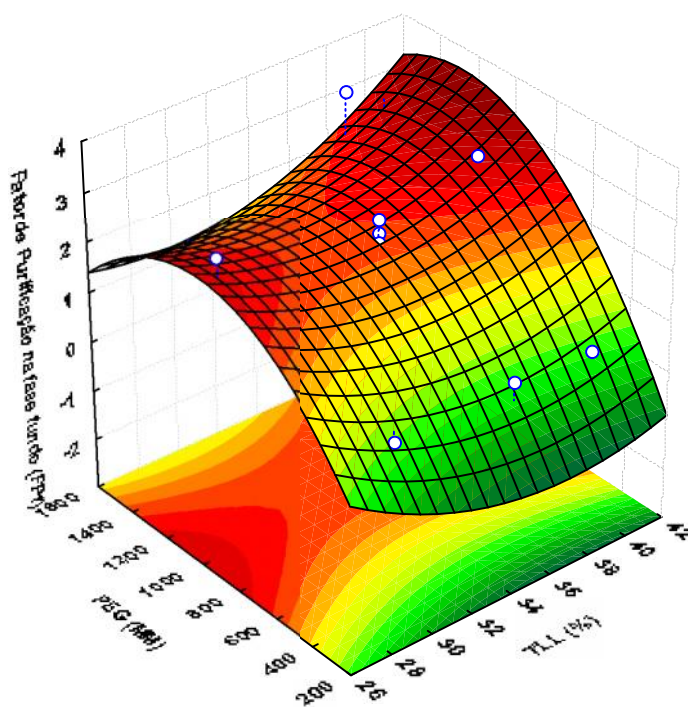


Figura 7.3.3.1. Superfície de Resposta descrita pelo modelo da equação 18, que representa o fator de purificação da enzima G6PD na fase fundo (FP<sub>f</sub>) em condições otimizadas das variáveis comprimento de linha de amarração (TLL%) e massa molar de PEG (MM)

### 7.3.4 Integração do rompimento das células de *Candida guilliermondii* a extração de G6PD em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) em escala ampliada empregando moinho de esferas de vidro

As condições empregadas nesta etapa foram baseadas nos estudos realizados em escala reduzida (tubos de centrífuga graduados). Na Tabela 7.3.4.1 são mostradas as quantidades de cada componente empregada na composição dos sistemas.

**Tabela 7.3.4.1 – Quantidade necessária de cada componente do sistema para a extração da enzima G6PD em SDFA integrado ao rompimento celular**

<b>Sistema</b>	<b>TLL%</b>	<b>PEG (MM)</b>	<b>PEG % (p/p)</b>	<b>Fosf % (p/p)</b>	<b>PEG (g)</b>	<b>Fosf (g)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (g)</b>	<b>Amostra (g)</b>
<b>3</b>	<b>30</b>	<b>1500</b>	16	12	32	30	28	10
<b>4</b>	<b>40</b>	<b>1500</b>	22	12	44	30	16	10

Massa do sistema= 100 g e qsp com H<sub>2</sub>O deionizada, sendo a massa da amostra fixa, 10 g e suspensão celular na concentração de 11 g/L

A Tabela 7.3.4.2 apresenta os valores de atividade G6PD e proteínas totais antes e após a extração em SDFA e os valores dos parâmetros do processo de integração da extração de G6PD por SDFA com o rompimento celular em escala ampliada.

**Tabela 7.3.4.2 – Resultados dos ensaios de integração de SDFA ao rompimento celular visando à purificação de G6PD em escala ampliada**

<b>Processo</b>	<b>Resposta</b>	<b>Sistema 3</b>	<b>Sistema 4</b>
<b>Antes da Purificação</b>	A <sub>v</sub>	233,0	195,0
	P <sub>T</sub>	200,0	149,0
	A <sub>e</sub>	1,2	1,3
<b>Após Purificação (fase topo)</b>	A <sub>v</sub>	126,0	96,0
	P <sub>T</sub>	102,0	101,0
	A <sub>e</sub>	1,2	0,9
<b>Após Purificação (fase fundo)</b>	A <sub>v</sub>	333,0	256,0
	P <sub>T</sub>	257,0	150,0
	A <sub>e</sub>	1,3	1,7
<b>Parâmetros:</b>	K <sub>e</sub>	0,4	0,4
	K <sub>p</sub>	0,4	0,7
	FP <sub>t</sub>	1,1	1,1
	FP <sub>f</sub>	0,7	1,3
	Ye <sub>t</sub>	31,0	31,0
	Ye <sub>f</sub>	62,0	48,0
	BP	84,0	80,0
	BA	93,0	79,0

A<sub>v</sub>: atividade volumétrica de G6PD (U/L); P<sub>T</sub>: proteínas totais (mg/L); A<sub>e</sub>: atividade específica de G6PD (U/mg); K<sub>e</sub>: coeficiente de partição de G6PD; K<sub>p</sub>: coeficiente de partição de proteínas; FP<sub>t</sub>: fator de purificação de G6PD na fase topo; FP<sub>f</sub>: fator de purificação de G6PD na fase fundo; Ye<sub>t</sub>: rendimento de G6PD na fase topo (%); Ye<sub>f</sub>: rendimento de G6PD na fase fundo (%); BA: balanço de atividade de G6PD (%); BP: balanço de proteínas (%)

Observa-se que tanto a enzima quanto as proteínas totais foram particionadas preferencialmente para a fase rica em sal (fase fundo). Tal fato pode ser confirmado com valores de coeficiente de partição de G6PD,  $K_e$ , e de proteínas,  $K_p$ , menores que 1. O ensaio 3 apresentou um melhor balanço de proteínas e de G6PD quando comparado ao ensaio 4. Neste último ensaio, pôde-se alcançar um melhor FP na fase fundo em decorrência do  $K_p$  de 0,7 ainda que o rendimento de G6PD na fase rica em sal fosse de 48% (Tabela 7.3.4.2).

A integração de processos visando à purificação da enzima intracelular G6PD demonstrou que o rompimento celular simultâneo a extração em duas fases aquosas permite alcançar a recuperação primária desta biomolécula a partir de células da levedura *C. guilliermondii*. As condições operacionais estabelecidas neste estudo facilitaram a pré-purificação, ou concentração, de G6PD uma vez que reduziram a quantidade de proteínas no homogeneizado e eliminaram os fragmentos celulares em uma única etapa. Os fragmentos das células rompidas apresentaram-se, preferencialmente, na fase polimérica enquanto que a enzima foi concentrada na fase rica em sal (Figura 7.3.4.1). Entretanto, novos estudos seriam necessários para que a quantidade de células pudesse ser aumentada e o rendimento da enzima na fase fundo fosse além dos atuais 48% e 62%, sem que o fracionamento e qualidade do produto fossem comprometidos.



Figura 7.3.4.1. Sistema de Duas Fases Aquosas integrado ao rompimento das células de *Candida guilliermondii* para a extração da enzima G6PD (sistema 4)



## 7.4 ESTUDO CINÉTICO E TERMODINÂMICO DE G6PD

### 7.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos

O processo de extração foi conduzido sob as condições ótimas indicadas pelo planejamento avaliado no item 7.3.2 (TLL de 40% e PEG 1500 MM).

A Figura 7.4.1.1 representa as atividades enzimáticas da enzima G6PD em função da concentração de G6P (substrato) para a enzima presente no homogeneizado inicial (clarificado) e após a extração em processos integrados (rompimento celular e extração em sistemas de duas fases aquosas). As condições de extração foram: temperatura 25 °C, comprimento de linha de amarração de 40% e massa molar de PEG de 1500 g/mol.

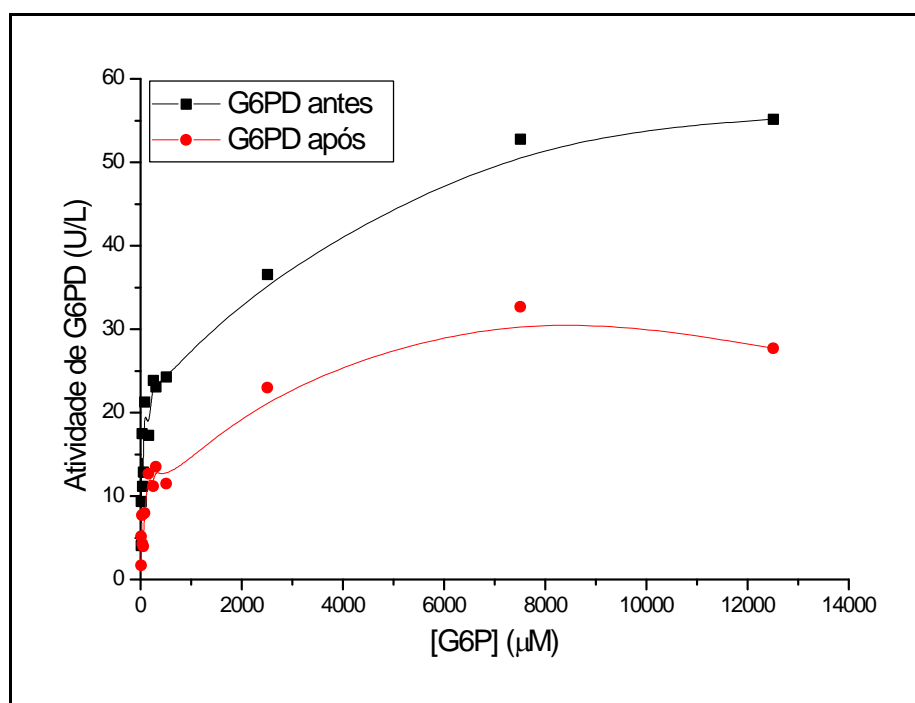


Figura 7.4.1.1. Valores da atividade catalítica da enzima G6PD presente no homogeneizado inicial e da enzima presente na fase fundo (rica em sal) após o processo de extração em função da concentração do substrato

Observa-se na Figura 7.4.1.1 que a atividade enzimática de G6PD aumentou com o aumento da concentração de substrato atingindo um valor máximo na concentração 12500  $\mu\text{M}$  (55,2 U/L) no extrato antes da purificação e 7500  $\mu\text{M}$  (13,1 U/L) após a purificação.

Para determinação das constantes cinéticas  $K_M$  e  $v_{\text{máx}}$  empregando o substrato G6P e o cofator  $\text{NADP}^+$  (Figuras 7.4.1.2, 7.4.1.3 e 7.4.1.4, 7.4.1.5, respectivamente), aplicou-se o método de linearização proposto por Lineweaver-Burk, que consiste na obtenção de um gráfico no qual os eixos são compostos pelo inverso da atividade em função do inverso da concentração do substrato ou do cofator.

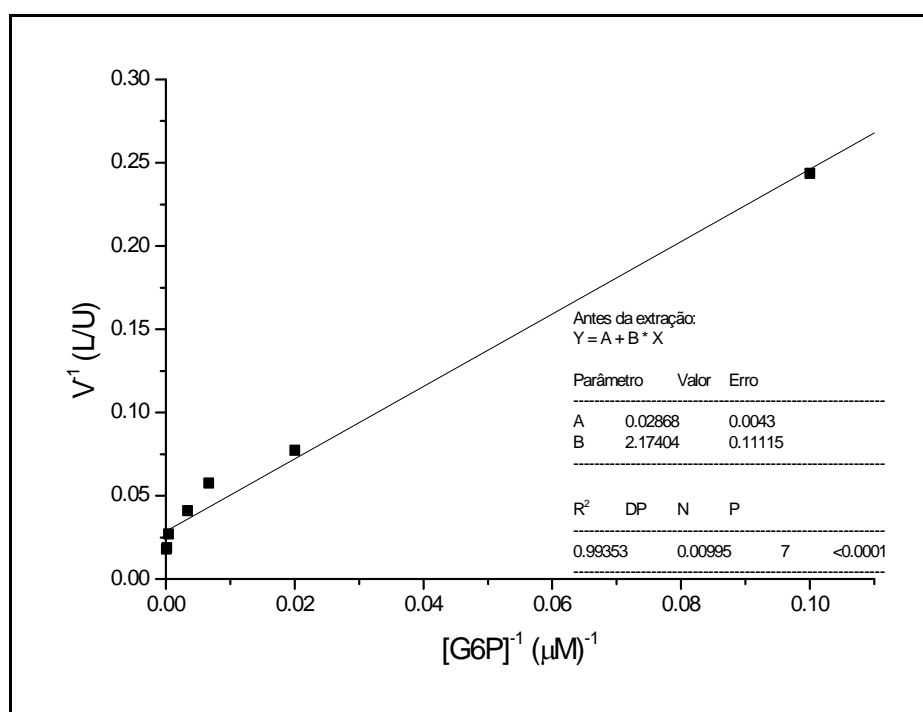


Figura 7.4.1.2. Curva correspondente ao inverso dos valores das atividades de G6PD ( $1/V$ ) em função do inverso das concentrações do substrato ( $1/S$ ) antes da extração

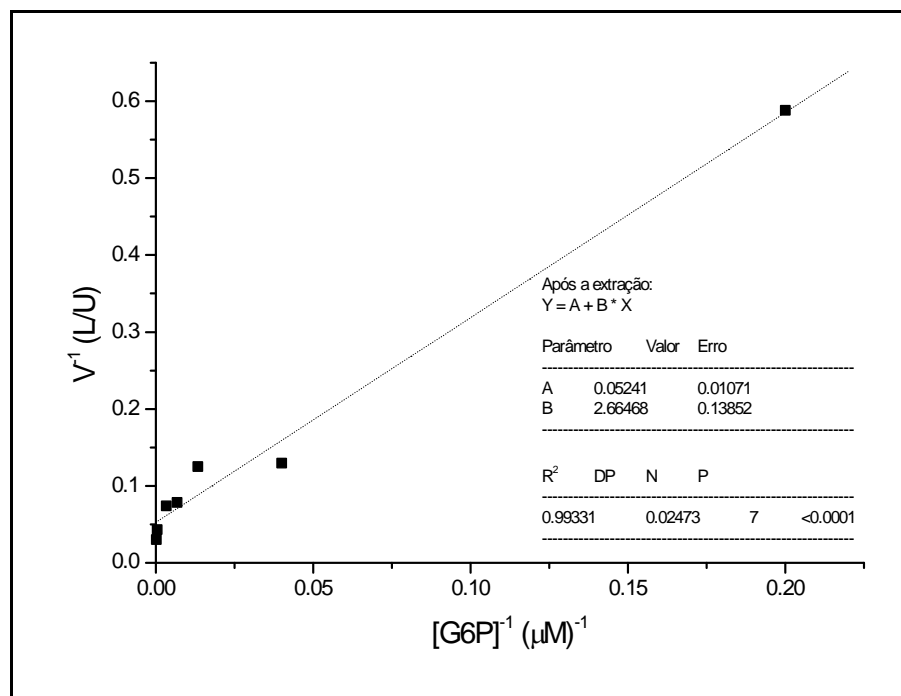


Figura 7.4.1.3. Curva correspondente ao inverso dos valores das atividades de G6PD ( $1/V$ ) em função do inverso das concentrações do substrato ( $1/S$ ) após a extração

Através da observação das Figuras 7.4.1.2 e 7.4.1.3, identifica-se um evidente processo de inibição da reação enzimática. A inibição existente é do tipo reversível não competitiva, ou seja, o inibidor não compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, formando além de complexos ES e EI, um terceiro complexo, enzima-inibidor-substrato (EIS). A enzima é inativada quando o inibidor está ligado, o substrato estando presente ou não. Uma concentração infinitamente alta de substrato não consegue levar toda enzima sob forma de ES, que é a forma produtiva. Para qualquer  $[I]$  uma parte da enzima permanecerá sob a forma EIS, onde se pode prever que  $V_{m\acute{a}x}$  será menor que a  $V_{m\acute{a}x}$  observada na ausência de inibidor.

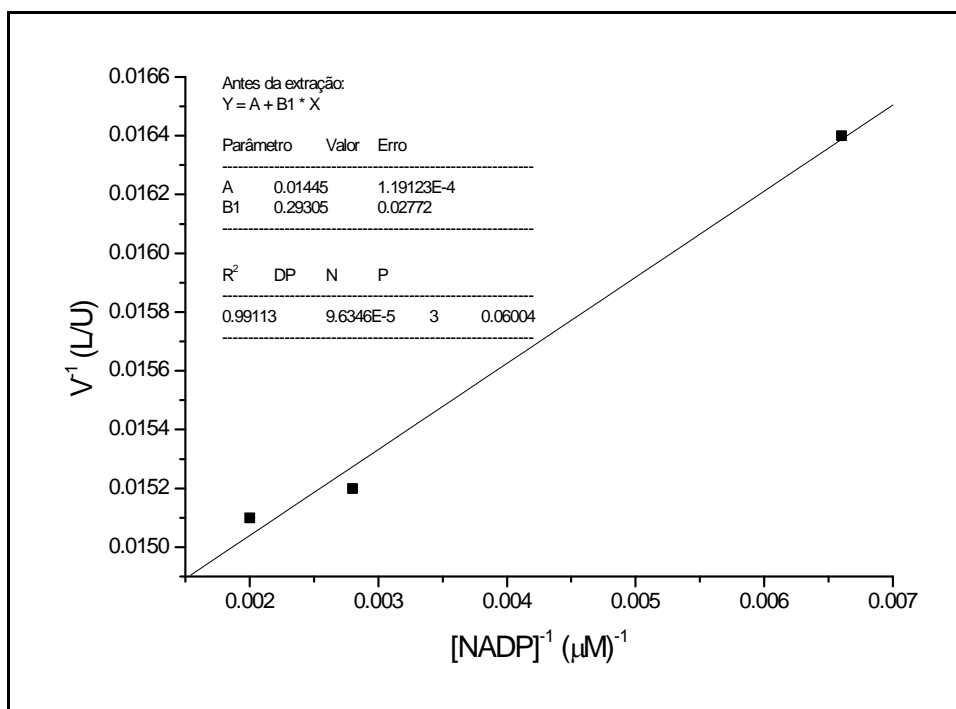


Figura 7.4.1.4. Curva correspondente ao inverso dos valores das atividades de G6PD ( $1/V$ ) em função do inverso das concentrações do cofator ( $1/S$ ) antes da extração

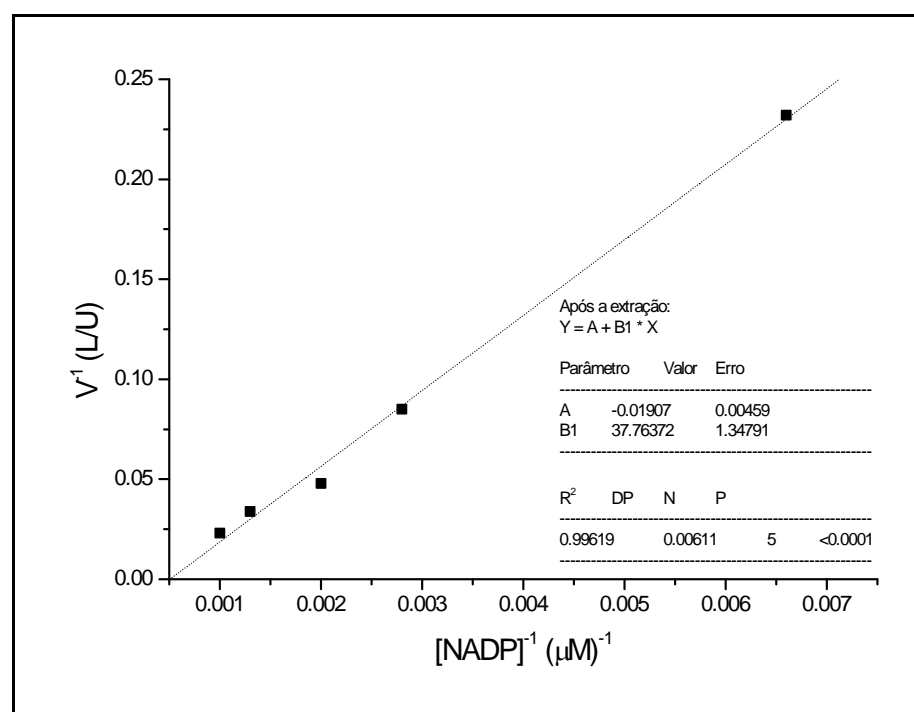


Figura 7.4.1.5. Curva correspondente ao inverso dos valores das atividades de G6PD ( $1/V$ ) em função do inverso das concentrações do cofator ( $1/S$ ) após a extração

As constantes cinéticas  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  determinadas para a enzima do homogeneizado inicial, ou seja, antes da extração, e após a extração em sistemas de duas fases aquosas integrado ao rompimento celular são mostradas na Tabela 7.4.1.1

**Tabela 7.4.1.1 – Parâmetros cinéticos para G6PD de *C. guilliermondii* utilizando o substrato G6PD e o cofator NADP<sup>+</sup>**

Substrato	$K_M$ (mM)		$V_{m\acute{a}x}$ (U/L)	
	Antes da extração*	Após a extração**	Antes da extração*	Após a extração**
G6P	0,07	0,05	34,8	19,1
NADP	0,02	1,98	69,2	52,4

\* enzima presente no homogeneizado inicial, sem fragmentos celulares; \*\* enzima obtida após extração em SDFa integrado ao rompimento celular em escala reduzida

Com relação à glicose-6-fosfato (G6P), substrato da reação catalisada por G6PD, observa-se que o valor para a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) antes e após a extração da enzima, em processos integrados, apresentou uma pequena variação, ou seja, a especificidade da enzima pelo substrato após o processo de extração pouco modificou, devido à pequena redução nos valores das constantes cinéticas da enzima (Tabela 7.4.1.1). Tal fato pode indicar um efeito inibitório do sal fosfato sobre a enzima G6PD que foi obtida a partir da fase fundo do SDFa. Essa inibição demonstra uma possível interação fosfato-G6PD, através da formação de ligações covalente entre as macromoléculas. Os resultados para  $K_M$  são representativos da inibição reversível não competitiva, uma vez que o  $K_M$  aparente da enzima para o substrato, no caso G6P, após o processo de extração, ou seja, na presença de inibidor é praticamente o mesmo que na ausência do sal (antes da extração).

Para os ensaios realizados empregando o cofator NADP<sup>+</sup>, nota-se que o valor para a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) antes e após a extração de G6PD em processos integrados apresentou uma grande variação (Tabela 7.4.1.1). Em relação às  $V_{m\acute{a}x}$ , observa-se que seus valores não foram muito diferentes. Esse fato nos leva a concluir que há inibição do tipo reversível competitiva. Os inibidores competitivos apresentam forma estrutural semelhante à do substrato, sendo assim ligados ao sítio ativo da enzima. O grau de inibição poderá, então, depender de dois fatores: das concentrações relativas de substrato e inibidor competitivo e da afinidade diferencial da enzima pelo substrato e pelo inibidor. Neste caso, o inibidor se liga de modo reversível à enzima tornando a competição favorável ao substrato através da adição de mais substrato ao meio reacional. Devido a isso, a  $V_{m\acute{a}x}$  apresenta valores próximos, ao contrário do  $K_M$ , que aumentará na presença do inibidor.

Os valores de  $K_M$  antes e após a extração em SDFA integrado ao processo de rompimento celular, 0,07 e 0,05 respectivamente, empregando o substrato G6P são próximos ao encontrado por Kotorman et al. (1994) para a enzima G6PD, solúvel, de *S. cerevisiae*,  $K_M$  de 0,059 mM, antes de ser imobilizada em matriz de poliacrilamida. Por outro lado, o valor de  $K_M$  antes de ser purificada, 0,02 mM, empregando o cofator NADP<sup>+</sup> foi igual ao da G6PD solúvel determinada por esses autores.

A comparação dos resultados obtidos no presente trabalho, com aqueles relatados na literatura não é adequada, uma vez que as características cinéticas da G6PD se mostram dependentes de fatores como fonte de obtenção da enzima, pH e temperatura do meio. Entretanto, os valores de  $K_M$  obtidos neste estudo são próximos aos obtidos nos estudos cinéticos empregando o substrato G6P para a enzima G6PD obtida de *bovine lens*, 0,035 mM, placenta humana, 0,04 mM, córtex de rins de carneiro, 0,041 mM, células de *S. cerevisiae*, 0,049 mM antes e após extração por micelas reversas (HASMANN et al., 2007, ÖZER, 2001).

#### 7.4.2 Determinação dos parâmetros termodinâmicos

A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática deve ser entendida em duas fases distintas: inicialmente, aumentos na temperatura levam a aumentos na velocidade de reação por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. Por outro lado, temperaturas mais elevadas levam à desnaturação da enzima através da alteração nas ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional.

No presente trabalho, foi avaliada a influência da temperatura sobre a atividade enzimática de G6PD antes e após purificação (Figura 7.4.2.1)

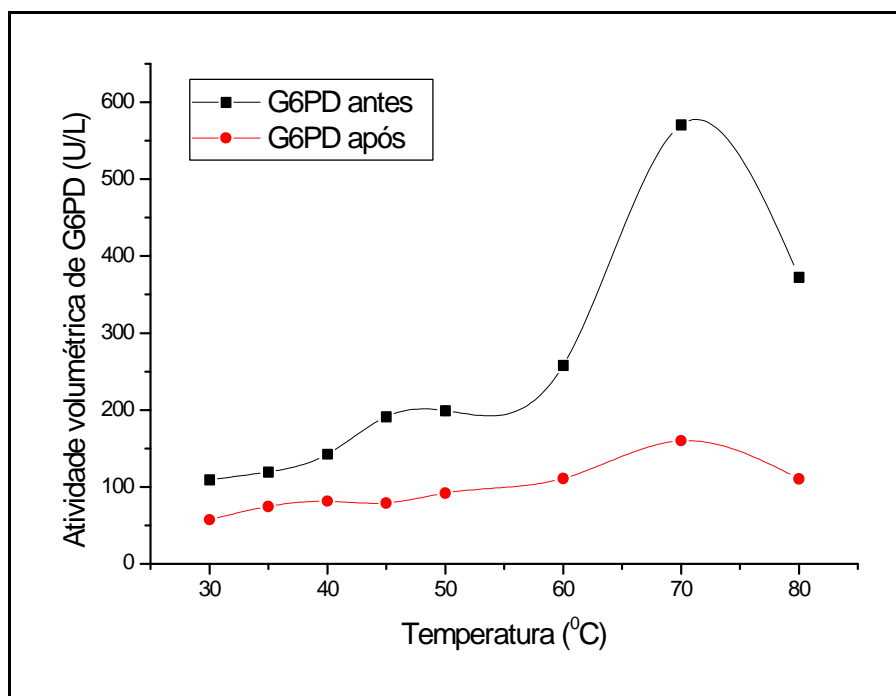


Figura 7.4.2.1. Variação da atividade enzimática de G6PD em função da temperatura

Nota-se na Figura 7.4.2.1 que os perfis da atividade catalítica de G6PD em função da temperatura reacional para a enzima antes e após a extração foram similares. A temperatura na qual observou-se maior atividade volumétrica de G6PD foi em torno de 70 °C para ambas as situações. A 30 °C, temperatura similar à preconizada pela literatura como ideal para a dosagem da atividade catalítica de G6PD (BERGMEYER, 1984), a atividade volumétrica na fração anterior a purificação foi de 110 U/L e após a extração por SDFA em processo integrado ao rompimento por esferas de vidro, de 57 U/L. Observa-se que estes valores aumentam gradualmente com a elevação da temperatura até 70 °C, quando foram dosadas em 571 U/L, para a enzima não purificada, e 160 U/L, para a enzima purificada, sendo que acima de 70 °C os valores diminuem drasticamente. Assim, como relatado anteriormente por Hasmann (2004) e Hasmann et al. (2007), apesar da glicose-6-fosfato desidrogenase ter sido obtida de microrganismos mesofílicos, como é o caso das leveduras *C. guilliermondii* (presente trabalho) e *S. cerevisiae* (trabalhos citados), esta enzima intracelular apresenta relativa estabilidade à temperatura, uma vez que sua atividade catalítica é aumentada com a elevação deste parâmetro.

Para que a comparação do perfil catalítico da enzima G6PD, presente no homogeneizado antes e após extração em SDFA, pudesse ser realizada; os parâmetros termodinâmicos,  $G$ ,  $H$  e  $S$  foram calculados conforme proposto por Owusu et al. (1992). As equações utilizadas no cálculo dos parâmetros encontram-se no item 5.6.

Com a equação da reta obtida na Figura 7.4.2.2, a energia de ativação,  $E_a$ , foi calculada através da equação de Arrhenius, podendo assim, ser utilizada no cálculo dos parâmetros termodinâmicos.



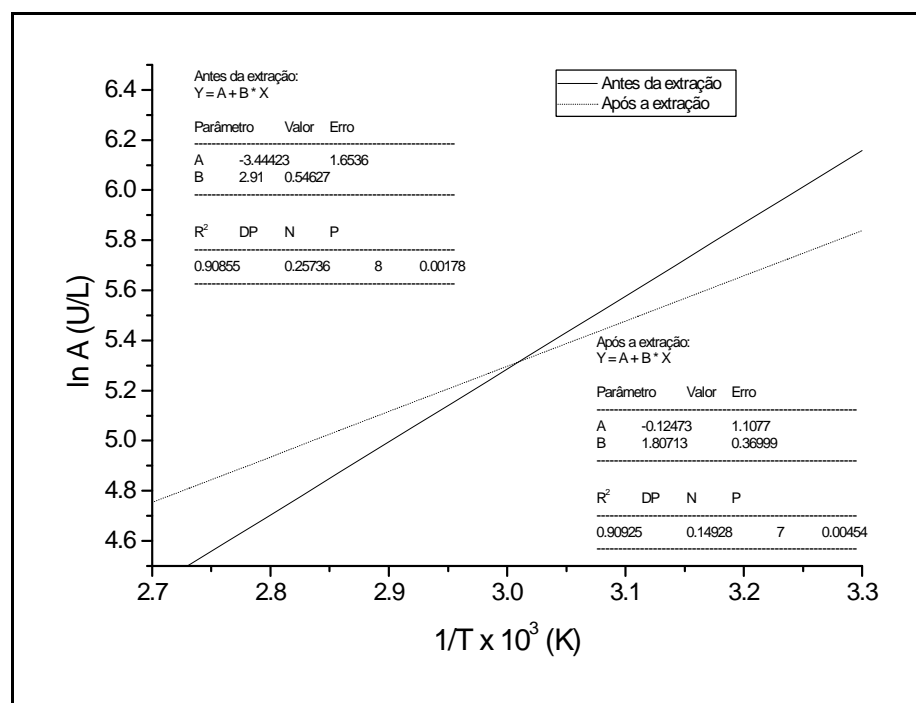


Figura 7.4.2.2. Curvas correspondentes ao logaritmo neperiano das atividades de G6PD (1/V) presente no homogeneizado inicial livre de células e após a extração em função do inverso das temperaturas absolutas (1/T)

A Tabela 7.4.2.1 mostra os valores dos parâmetros termodinâmicos para a enzima presente no homogeneizado inicial livre de células e a obtida após a extração por SDFA integrado ao processo de rompimento celular nas condições ótimas previstas pelo planejamento: temperatura 25 °C, comprimento de linha de amarração de 40% e massa molar de PEG de 1500 g/mol.

**Tabela 7.4.2.1 – Valores dos parâmetros termodinâmicos encontrados para a enzima G6PD no homogeneizado inicial livre de células e após extração em SDFA integrado ao processo de rompimento celular**

Enzima	G (kJ/mol)	H (kJ/mol)	S (J/mol.K)	E <sub>a</sub> (kJ/mol)
Antes da extração	-13,71	-2,49	37,02	24,18
Após a extração	-13,64	-2,50	36,77	15,02

Temperatura 298 K, Pressão de 1 atm, R = 8,314 J/mol.K

A variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) indica a espontaneidade da reação catalisada sob as condições de temperatura e pressão empregadas. No presente trabalho, os valores obtidos para o parâmetro  $\Delta G$  não são diferentes para a reação catalisada por G6PD antes e após a purificação, nas condições empregadas. Ambos os valores de  $\Delta G$  são negativos indicando que o processo é espontâneo, ou seja, ocorrem de modo natural. Essas reações são consideradas transformações exotérmicas, assim como a maior parte das reações químicas comuns, em sua direção natural (CASTELLAN, 1994).

Em sistemas biológicos deve-se considerar a presença de compostos de “alta energia”, cuja hidrólise promove a liberação de energia livre, a qual é utilizada pelas células para realizar suas funções. Dentre estes compostos estão o fosfoenolpiruvato cujo valor de  $\Delta G$  padrão é de -61,9 kJ/mol, o ATP de -30,5 kJ/mol e o substrato utilizado na reação catalítica estudada, a glicose-6-fosfato, cujo  $\Delta G$  padrão é de -13,8 kJ/mol, valores semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Os valores negativos apresentados, denominados de potencial de transferência de grupos fosfato, são medidas da tendência dos grupos fosforilados em transferir seus grupos fosfatos para a água. Desta forma o ATP com -30,5 kJ/mol possui maior tendência de transferir grupos fosfatos que a G6P com -13,8 kJ/mol (HASMANN, 2004).

A variação da entalpia no sistema,  $\Delta H$ , corresponde ao calor liberado ou absorvido na transformação, em pressão constante. No presente estudo, o valor negativo deste parâmetro antes e após a purificação indica que a reação catalítica trata-se de uma reação exotérmica, ou seja, o calor de reação é liberado para o meio na transformação de substratos em produtos sob condições de temperatura e pressão constante (CASTELLAN, 1994).

Por outro lado, a entropia  $\Delta S$  apresentou valor positivo, sugerindo a formação de um estado de transição com baixa rigidez estrutural. De acordo com a teoria de Michaelis-Menten, isto significa que o passo limitante da atividade enzimática de G6PD seria próximo ao rompimento do complexo E-S ao invés da formação desse complexo (ROSSI et al., 2002). Os valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  obtidos no presente trabalho são menores e maiores que zero, respectivamente, significando que a reação é espontânea à temperatura utilizada, podendo, assim, ser considerada próxima as reações de outros sistemas biológicos.

Sob condições fisiológicas a energia das moléculas reagentes é insuficiente para superar a energia de ativação que separa os reagentes (substratos e cofatores) dos produtos. Com isso, nas condições empregadas, seria improvável ocorrer a transformação do substrato glicose-6-fosfato, G6P, em 6-fosfogluconato utilizando somente a energia contida em suas moléculas. Nesse caso, a enzima G6PD é utilizada para aumentar a velocidade da reação. A utilização desses catalisadores biológicos (enzimas) promove a redução da energia de ativação. Entretanto, deve-se ressaltar que essa redução na energia de ativação da reação ocorre através do mecanismo da reação catalisada ser diferente daqueles nos quais esses catalisadores não estão presentes e a energia de ativação necessária seria muito elevada. Neste trabalho, observamos para ambas as frações analisadas baixo valor para a energia de ativação, o que significa que essa reação enzimática ocorre facilmente, necessitando de pouca energia para alcançar o estado de transição.

Observa-se, ainda, uma diminuição da energia de ativação,  $E_a$ , para a enzima G6PD após sua purificação. Um menor valor de  $E_a$  poderia ser resultado da presença de substrato G6P e de cofator  $\text{NADP}^+$  de origem endógena e presentes no homogeneizado, os quais se encontram concentrados na fase fundo do SDFA facilitando, assim, a formação do complexo intermediário entre G6PD e os substratos. Neste caso, o sistema necessitaria de menor quantidade de energia para atingir o estado de transição e conseqüentemente catalisar a conversão do substrato.

#### **7.5 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO DE G6PD EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS A PARTIR DAS CÉLULAS DE *CANDIDA GUILLIERMONDII***

Os resultados da Tabela 7.5.1 são apresentados a fim de comparar os resultados dos parâmetros de extração em SDFA da enzima G6PD, na condição otimizada no planejamento estatístico empregado (comprimento de linha de amarração de 40% e massa molar de PEG de 1500 g/mol), a partir da levedura *Candida guilliermondii* nos diferentes ensaios realizados.

**Tabela 7.5.1 – Valores dos parâmetros dos ensaios de extração em SDFA visando à purificação de G6PD a partir de células de *Candida guilliermondii***

Parâmetro	A	B	C	D
$K_e$	0,07	0,07	1,36	0,4
$K_p$	0,83	0,64	4,60	0,7
$FP_t$	0,18	0,28	0,67	0,7
$FP_f$	2,16	2,32	2,26	1,3
$Ye_t$	7,1	9,4	67,5	31
$Ye_f$	65,9	71,4	28,3	48
BA	73,0	80,8	95,8	79
BP	69,4	64,7	112,2	80
$S_t$	0,08	0,10	0,29	0,57
$S_f$	12,5	10,0	3,44	1,75

A: ensaios em SDFA com homogeneizado clarificado; B: ensaios em SDFA com homogeneizado em presença de fragmentos celulares; C: ensaios em SDFA integrados ao rompimento celular em escala reduzida; D: ensaios em SDFA integrados ao rompimento celular em moinho de esferas de vidro;  $S_t$ : seletividade na fase topo ( $K_e/K_p$ );  $S_f$ : seletividade na fase fundo ( $K_p/K_e$ )

Pode-se observar que tanto os coeficientes de partição da enzima G6PD quanto os das proteínas totais foram menores que 1,0 para os ensaios conduzidos nas condições A, B e D; demonstrando preferência das proteínas e da enzima pela fase rica em sal (fase fundo). Ao contrário, o ensaio conduzido na condição C apresentou  $K_e$  e  $K_p > 1,0$ , ou seja, tanto enzima quanto proteínas foram particionadas para a fase rica em polímero (fase topo). Com relação aos fatores de purificação em ambas as fases,  $FP_t$  e  $FP_f$ , observa-se que os maiores valores foram obtidos na fase fundo, sendo que, mesmo conduzindo os ensaios de modo diferente, esses valores foram muito próximos ( $FP_f \approx 2,2$ ), exceto para o ensaio realizado com integração em moinho que apresentou um valor menor de  $FP_f$ . Tal fato pode ser explicado pela influência da escala, a qual foi aumentada 10 vezes (moinho em relação ao tubo de centrífuga graduado) sobre a eficiência no rompimento das células de levedura para a liberação da enzima G6PD e pela agitação dos componentes do SDFA, a qual se apresentou mais eficiente em escala reduzida

(mais vigorosa). Adicionalmente, a geometria do recipiente pode influenciar no tempo de separação das fases do sistema. Para Benavides e Rito-Palomares (2006) a escolha de um recipiente com geometria adequada para a sedimentação e separação das fases do SDFA é importante e facilita a implementação destes sistemas em maior escala. Esses autores concluíram que recipientes com baixos valores da razão altura/diâmetro ( $A/D < 1,0$ ) apresentam uma área de interface suficiente para a distribuição de partículas sólidas presentes no homogeneizado celular, sem que haja seu acúmulo. Com isso, espera-se que a separação das fases sob a ação da gravidade ocorra em um tempo relativamente menor do que em recipientes com maior valor de  $A/D (> 1,0)$ .

Os rendimentos da enzima foram maiores na fase rica em sal (fosfato Na/K),  $Ye_f$ , quando comparados à fase rica em PEG,  $Ye_t$ . A diminuição do rendimento de proteínas solúveis, como a enzima G6PD, na fase polimérica do SDFA com o aumento da massa molar de PEG, condição utilizada nesses ensaios (PEG 1500 g/mol), pode ser explicada, em parte, pelo fenômeno de exclusão hidrofóbica (WALKER et al., 1996).

Os balanços de atividade e de proteína, BA e BP, foram maiores que 60% em todos os ensaios realizados.

Os valores de seletividade foram baixos para a fase topo ( $0,08 \leq S_t \leq 0,57$ ) e maiores para a fase fundo ( $1,75 \leq S_f \leq 12,5$ ). Apesar de a  $S_f$  ser maior no ensaio conduzido com homogeneizado clarificado (ensaio A), os resultados dos ensaios nos quais houve a integração dos processos foram tão bons quanto o ensaio convencional. De modo geral, o melhor resultado foi obtido no ensaio B, que apresentou alta seletividade, com  $FP_f$  de 2,32 e um rendimento na fase rica em sal de 71,4%. Este ensaio foi conduzido com a integração dos processos de clarificação do homogeneizado, ou seja, remoção dos fragmentos celulares, com a recuperação da enzima. Os ensaios C e D também apresentam a integração de processos visando à redução do número de etapas a serem empregadas na purificação da biomolécula de interesse. No ensaio C os resultados obtidos alcançou-se um  $FP_f$  de 2,26, no entanto o rendimento de G6PD foi de 28,1%. Com a ampliação de escala do rompimento celular integrado a purificação de G6PD em moinho, o valor de  $Ye_f$  aumentou 20% quando comparado ao ensaio realizado em menor escala (tubos graduados), no entanto,  $FP_f$  foi reduzido a metade. A Figura 7.5.1 apresenta um fluxograma dos ensaios realizados com ou sem a integração de processos.

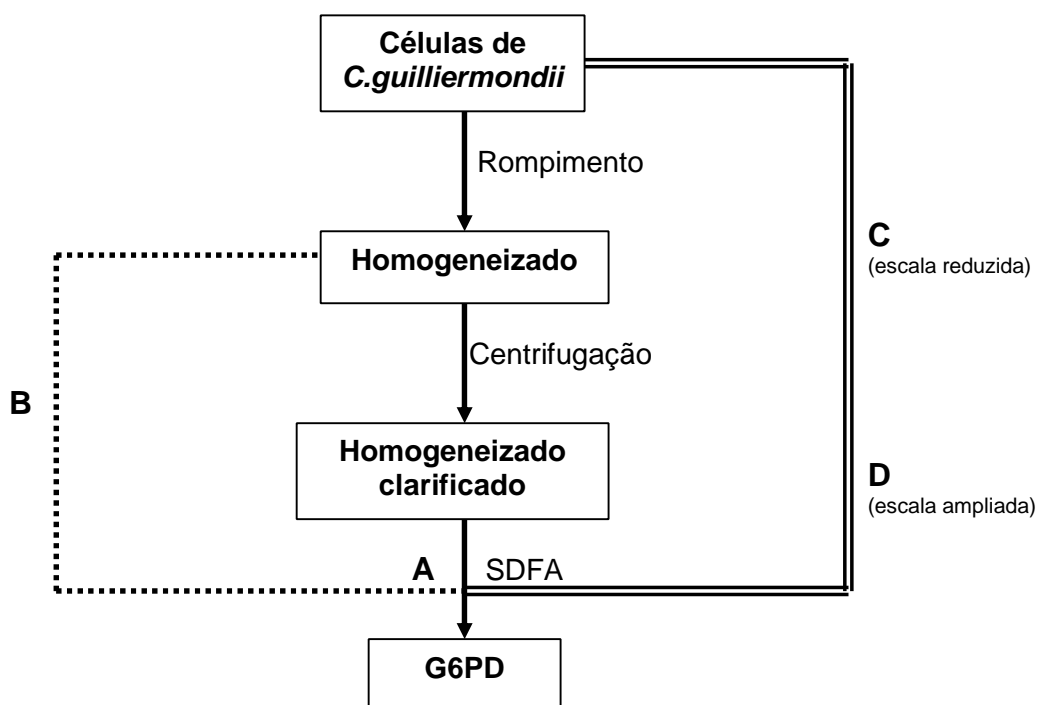


Figura 7.5.1. Fluxograma das etapas necessárias para a purificação da enzima G6PD a partir de células de *Candida guilliermondii*: A) processo convencional rompimento-clarificação-extração em SDFA; B) processo convencional rompimento-extração em SDFA; C) processo de integração do rompimento celular a extração de G6PD por SDFA em escala reduzida; D) processo de integração do rompimento celular a extração de G6PD por SDFA em escala ampliada

Assim, a aplicação da integração de processos, como apresentado neste trabalho pode servir como solução para as dificuldades inerentes a separação líquido-líquido, além de promover a redução no tempo e custos do processo com a redução do número de etapas (Figura 7.5.1).

Entretanto, vale ressaltar que existem outros parâmetros do processo integrado que devem ser avaliados para obtenção de maior produtividade, rendimento e pureza do produto de interesse.

## 8 CONCLUSÕES

- O estudo do rompimento de *Saccharomyces cerevisiae* em moinho permitiu que as condições de trabalho fossem estabelecidas, de modo que uma maior liberação da enzima G6PD pudesse ser alcançada. As melhores condições foram: 500 mL de suspensão celular, 400 rpm de agitação e 15 minutos de rompimento em moinho de esferas de vidro;
- A adição de inibidores de proteases é importante e necessária durante o processo de rompimento celular, pois a purificação da enzima está relacionada à quantidade de enzima G6PD no extrato celular e a ausência destes inibidores demonstrou que pode haver perda na quantidade desta enzima;
- A análise estatística dos ensaios de purificação de G6PD com integração dos processos de rompimento celular e extração por SDFA, em escala reduzida, demonstrou que a interação das variáveis TLL e massa molar de PEG tiveram efeito significativo sobre os parâmetros  $FP_t$  e  $Ye_t$ , e que a variável massa molar de PEG teve efeito significativo sobre os parâmetros  $FP_f$ ,  $Ye_t$  e  $Ye_f$ ;
- O planejamento fatorial  $2^2$  com 3 repetições no ponto central empregado para a otimização do processo integrado em escala reduzida originou um modelo quadrático para a resposta  $FP_f$  e prevê valores máximos de 2,8 podendo ocorrer uma variação de 0,8 a 4,8 dentro do intervalo de confiança de 95%, sob as seguintes condições: TLL de 40% e PEG 1500 g/mol;
- O principal benefício da integração dos processos de rompimento das células de *C. guilliermondii* a extração em SDFA visando à purificação de G6PD foi a constatação da possibilidade de concentração desta enzima. Reduziu-se a quantidade de proteínas no homogeneizado e eliminou-se os fragmentos celulares em uma única etapa, o que provavelmente proporcionaria uma redução no tempo e custos do processo de purificação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO-NETO, J.; INFANTI, P.; VITOLO, M. Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.14, n.1, p.89-94, 1997.

ALBERTSSON, P.A. Partition of cell particles and macromolecules. 3rd. ed. New York: Wiley Interscience, 1986.

ANTOV, M.G.; PERICIN, D.M.; DASIC, M.G. Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*. **Process Biochemistry**, v.41, p. 232-235, 2006.

ASENJO, J.A. Separation processes in biotechnology. New York: Marcell Dekker, 1991, 801p.

BASSI, A.S.; TANG, D.Q.; BEGOUGNOU, M.A. Mediated, amperometric biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6-phosphate dehydrogenase, Mg<sup>+2</sup> ions, tetracyanoquinodimethane and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste. **Analytical Biochemistry**, v.268, n.2, p.223-228, 1999.

BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3rd. ed. Wheinheim: Velag Chemie, 1984. v.2, 539 p.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of  $\beta$ -phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. **Journal of Chromatography B**, v.807, p.33-38, 2004.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Simplified two-stage method to  $\beta$ -phycoerythrin recovery from *Porphyridium cruentum*. **Journal of Chromatography B**, v.844, p.39-44, 2006.

BRADFORD, M.A. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.



BROWNELL, J.E.; NAKAS, J.P. Bioconversion of acid-hydrolyzed poplar hemicellulose to acetic acid *Clostridium thermoaceticum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.7, p.1-6, 1991.

CASTELLAN, G. **Fundamentos de Físico-Química**. 5. ed. Rio de Janeiro; São Paulo: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, 1994. v.2, 527p.

CHATEL, S.; VOIRIN, A.; LUCIANI, A.; ARTAUD, J. Starch identification and determination in sweetened fruit preparations. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, n.2, p. 502-506, 1996.

ÇİFTÇİ, M.; BEYDEMİR, S.; YILMAZ, H.; ALTİKAT, S. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from buffalo (*Bubalus bubalis*) erythrocytes and investigation of some kinetic properties. **Protein Expression & Purification**, v.29, p.304-310, 2003.

COHEN, P.; ROSEMEYER, M.A. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: purification of the erythrocyte enzyme and the influence of ions on its activity. **European J. Biochem**, v.8, p.1-7, 1969.

COSTA, S.A.; PESSOA JÚNIOR, A.; ROBERTO, I.C. Xylanase recovery: effect of extraction conditions on the aqueous two-phase systems using experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70/72, p.629-639, 1998.

CUNHA, M.T.; COSTA, M.J.L.; CALADO, C.R.C.; FONSECA, L.P.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Integration of production and aqueous two-phase systems extraction of extracellular *Fusarium solani pisi* cutinase fusion proteins. **Journal of Biotechnology**, v.100, p.55-64, 2003.

DETROY, R.W.; LINDENFELSER, L.A.; SUMMER, S.; ORTON, W.L. Bioconversion of wheat straw to ethanol: chemical modification, enzymatic hydrolysis, and fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p.1527-1535, 1981.

Du TOIT, P.J.; OLIVIER, S.P.; VAN, P.L. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates I: characterization of bagasse with regard to monosaccharide hemicellulose and amino acid composition. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p. 1071-1078, 1984.

DUARTE, M. C. T.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; BIM, M. A.; TAGLIARI, C. V.; FRANCO, T. T. Production and purification of alkaline xylanases. **Bioresource Technology**, v.68, p.49-53, 1999.

ELIASSON, A.; BOLES, E.; JOHANSSON, B.; ÖSTERBERG, M.; THEVELEIN, J.M.; SPENCER-MARTINS, I.; JUHNKE, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylulose fermentation by mutant and wild-type strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.53, p.376-382, 2000.

FALCO, A. L. P.; DURRANT, L. R.; FRANCO, T. T. Purification of  $\beta$ -galactosidase from seeds of *Sesbania marginata*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, p.819-825, 2000.

FARRUGGIA, B.; NERLI, B.; PICÓ, G. Study of the serum albumin-polyethyleneglycol interaction to predict the protein partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.798, p.25-33, 2003.

FOSTER, D. Optimizing recombinant product recovery through improvements in cell-disruption technologies. **Current Opinion in Technology**, v.6, p.523-526, 1995.

GAIKAR, G.V.; BODHANKAR, S.S.; LATHA, V.J. The effect of surface active additives on the partitioning of proteins and enzymes in aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Technology and Biotechnol**, Oxford, v.67, p.329-332, 1996.

GÍRIO, F.M.; ROSEIRO, J.C.; SÁ-MACHADO, P.; DUARTE-REIS, A.R.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. Effect of oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.16, p.1074-1078, 1994.

GRANSTRÖM, T.; OJAMO, H.; LEISOLA, M. Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.55, p.36-42, 2001.

GURPILHARES, D. B. **Produção de glicose-6-fosfato desidrogenase a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Candida guilliermondii***. 2004, 71p. Dissertação (Mestrado) – DEBIQ/FAENQUIL, Lorena, S.P.

GURPILHARES, D. B.; HASMANN, F. A.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C. Optimization of glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from *Candida guilliermondii* by disruption with glass beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.591-595, 2006.

HAMILTON, G.E.; LUECHAU, F.; BURTON, S.C.; LYDDIATT, A. Development of a mixed mode adsorption process for the direct product sequestration of an extracellular protease from microbial batch cultures. **Journal of Biotechnology**, v.79, p.103-115, 2000.

HARRIS, J. M. **Poly(ethylene glycol) Chemistry**. Biotechnical and Biomedical Applications. New York: Plenum Press, 1992.

HASMANN, F.A. **Extração líquido-líquido por micelas reversas de glicose-6-fosfato desidrogenase**. 2004, 139p. Tese (Doutorado) – USP/IPT/BUTANTAN, São Paulo, SP.

HASMANN, F. A.; GURPILHARES, D. B.; ROBERTO, I. C.; CONVERTI, A.; PESSOA Jr., A. New combined kinetic and thermodynamic approach to model glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and stability. **Enzyme and Microbial Technology**, V.40, p.849-858, 2007.

JOHANSSON, G. Aqueous two phase system in protein purification. **Journal of Biotechnology**, v.3, p.11-18, 1985.

JEPSSON, M.; JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1604-1609, 2002.

KEPKA, C.; COLLET, E.; ROOS, F.; TJERNELD, F.; VEIDE, A. Two-step recovery process for tryptophan tagged cutinase: interfacing aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1075, p.33-41, 2005.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Sccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.776-783, 1993.

KOTORMAN, M.; SIMON, L.M.; SZAJANI, B. Coenzyme production using immobilized enzymes. III. Immobilization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bakers' yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.974-978, 1994.

KUBOI, R.; UMAKOSHI, H.; TAKAGI, N.; KOMASAWA, I. Optimal disruption methods for the selective recovery of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.79, n.4, p.335-341, 1995.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, n.2, p.151-172, 1993.

KULA, M. R.; SELBER, K. Protein purification, aqueous liquid extraction. In: FLICKINGER, M. C., DREW, S. W. eds. **Encyclopedia of Bioprocess Technology**. New York: John Wiley & Sons, 1999. v.4, p.2179-2191.

LEITE, A.A. **Determinação das atividades da glicose-6-fosfato desidrogenase em neutrófilos de equínos adultos puro sangue inglês**. 1989. Dissertação (Mestrado) – FCF/USP, S.P.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. nd ed. New York: Worth Publishers Inc., 2000, 839 p.

LEVY, H.R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, In: A. Meister (Ed.), **Ad. Enzymol.**, New York: John Wiley and Sons, 1979, p.97. v.48.

LING, T.C.; LYDDIATT, A.; CARMICHAEL, I.; PURDOM, G.; HATHI, P.; LEVISON, P.R. Direct enzyme adsorption from an unclarified microbial feedstock using suspended bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.989, p.109-118, 2003.

LOVITT, R.W.; JONES, M.; COLLINS, S.E., COSS, G.M.; YAU, C.P.; ATTOUCH, C. Disruption of bakers' yeast using a disrupter of simple and novel geometry. **Process Biochemistry**, v.36, p.415-421, 2000.

MARCOS, J.C.; FONSECA, L.P.; RAMALHO, M.T.; CABRAL, J.M.S. Application of surface response analysis to the optimization of penicillin acylase purification in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.1006-1014, 2002.

MAYERHOFF, Z.D.V.L.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, p.217-223, 2004.

MAYERHOFF, Z.D.V.L. **Obtenção da enzima xilose redutase de *Candida mogii* e sua purificação em sistemas de duas fases aquosas.** 2002. 131 p. Tese (Doutorado) – UNICAMP, Campinas, S.P.

MERCHUK, J.C.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.285-293, 1998.

MORELLIM, A.; BENATTI, U.; GAETANI, G.F.; De FLORA, A. Biochemical mechanisms of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.75, p. 1979-1983, 1978.

MORI, H.; ISHIDA, M.; OKAMOTO, S. Glucose determination using a flow system with enzyme reactor and application to analysis of glucose content in beverages. **Journal of Health Science**, v.45, n.3, p.126-129, 1999.

OLIVEIRA, G.G.; SILVA, D.P.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M.; PESSOA JÚNIOR, A. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, n.2, p.177-187, 2001.

OWUSU, R.K.; MAKHZOUM, A.; KNAPP, J.S. Heat inactivation of lipase from psychrotrophic *P. fluorescens* P38: activation parameters and enzyme stability at low or ultra-high temperatures. **Food Chem.**, v.44, p.261-268, 1992.

ÖZBEK, B.; ÜLGEN, K.Ö. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, v.35, p.1037-1043, 2000.

ÖZER, N.; AKSOY, Y.; ÖGÜS, H.I. Kinetic properties of human placental glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.33, p.221-226, 2001.

PESSOA Jr. A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDELL, W. *et al.* coords. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2. p.493-522.

PESSOA Jr. A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos.** São Paulo: Ed. Manole Ltda, 2005.

RANGEL-YAGUI, C.O.; LAM, H.; KAMEI, D.T.; WANG, D.I.C.; PESSOA, A.; BLANKSTEIN, D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, n.4, p.445-456, 2003.

RIBEIRO, M.Z. **Extração de glicose 6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas**. 2001. 136 p. Dissertação (Mestrado) – USP/FCF, São Paulo.

RICCI-SILVA, M.E.; VITOLO, M.; ABRAHÃO-NETO, J. Protein and glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from baker's yeast cells disrupted by a vertical bead mill. **Process Biochemistry**, v.35, p.831-835, 2000.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chromatography B**, v.807, p.3-11, 2004.

RITO-PALOMARES, M.; CUETO, L. Effect of biological suspensions on the position of the binodal curve in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.5-12, 2000.

RITO-PALOMARES, M.; LYDDIATT, A. Process integration using aqueous two-phase partition for the recovery of intracellular proteins. **Chemical Engineering Journal**, v.87, p.313-319, 2002.

RITO-PALOMARES, M.; HERNADEZ, M. Influence of system and process parameters on partition of cheese whey proteins in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.81-90, 1998.

ROBERTO, I.C. **Utilização da fração hemicelulósica de palha de arroz para a obtenção de xilitol por processo fermentativo**. 1997. 150 p. Tese (Doutorado) – USP/FCF, São Paulo.

ROBERTO, I.C.; MUSSATTO, S.; RODRIGUES, R.C.L.B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor, **Industrial Crops and Products**, v.17, p.171-176, 2003.

ROSSI, F.G.; RIBEIRO, M.Z.; CONVERTI, A.; VITOLO, M.; PESSOA Jr, A. Kinetic and thermodynamic aspects of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and synthesis, **Enzyme and Microbial Technology**, v.6195, p.1-7, 2002.

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. **Fluid Phase Equilibria**, v.187-188, p.489-498, 2001.

SARUBBO, L.A.; OLIVEIRA, L.A.; PORTO, A.L.F.; LIMA-FILHO, J.L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; TAMBOURGI, E.B. Performance of a perforated rotating disc rotator in the continuous extraction of a protein using the PEG-cashew-nut tree gum aqueous two-phase system, **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p.221-227, 2003.

SEVERO, L.G. **Determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) em eritrócitos humanos**. 1979. 68 p. Dissertação (Mestrado) – USP/FCF, São Paulo.

SILVA, D. P.; PONTES, M. Z. R.; SOUZA, M. A.; VITOLO, M.; SILVA, J. B. A.; PESSOA, A. J. Influence of pH on the partition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in aqueous two phase system. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.3, 2002.

SLIVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. 2007, 144p. Dissertação (Mestrado) EEL/USP, Lorena, S.P.

SOLANO-CASTILLO, C.; RITO-PALOMARES, M. Kinetics of phase separation under different process and design parameters in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.195-201, 2000.

SONG, D. D.; JACQUES, N. A. Cell disruption of *Escherichia coli* by glass bead stirring for the recovery of recombinant proteins. **Analytical Biochemistry**, v.248, p.300-301, 1997.

SOUZA, M.A.; RIBEIRO, M.Z.; SILVA, D.P.; PESSOA-JÚNIOR, A; VITOLO, M. Effect of pH on the stability of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **App. Biochemistry and Biotech.**, v.98-100, p.265-272, 2002.

SPELZINI, D.; FARRUGGIA, B.; PICÓ, G. Features of the acid protease partition in aqueous-two phase systems of polyethylene glycol-phosphate: chymosin and pepsin. **Journal of Chromatography B**, v.821, p.60-66, 2005.

SUN, R.C.; TOMKINSON, J.; MA, P.L.; LIANG, S.F. Comparative study of hemicellulose from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p. 111-122, 2000.

SRINIVAS, N.D.; BARHATE, R.S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.1-6, 2002.

TAUBERT, J.; KRINGS, U.; BERGER, R. G. A comparative study on disintegration of filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v.42, p.225-232, 2000.

ULUSU, N.N.; KUS, M.S.; ACAN, N.L.; TEZCAN, E.F. A rapid method for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine lens. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.31, p.787-796, 1999.

Van GAVER, D.; HUYGHEBAERT, A. Optimization of yeast cell disruption with a newly designed bead mill. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, n.8, p.665-671, 1991.

VAIDYA, B.K.; SUTHAR, H.K.; KASTURE, S.; NENE, S. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v.28, p.161-166, 2006.

VIEIRA-NETO, E.; PEREIRA, C.N.; FONSECA, A.A. Avaliação do desempenho de rastreamento neonatal de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em amostras de sangue em papel filtro. **Laes & Haes**, n.119, p.98-104, 1999.

WALKER, S.G.; DALE, C.J.; LYDDIATT, A. Aqueous-two phase partition of complex protein feedstocks derived from brain tissue homogenates. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.680, p.91-96, 1996.

WALTER, H.; BROOKS, D.E.; FISHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology**, Orlando: Academic Press, 1985. p.85-130.

WEATHERLEY, L.R. **Engineering processes for bioseparations**, Oxford, 1994. 296 p.



WILKE, C.R.; YANG, R.D.; SCIAMANNA, FREITAS, R.P. Raw materials evaluation and process development studies for conversion of biomass to sugar and ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p.163-183, 1981.

WOODROW, J.R.; QUIRK, A.V. Evaluation of the potencial of a bead mill for the release of intracellular bacterial enzymes. **Enzyme Microbial and Technology**, v.4, p.385-389, 1982.

YANAGIDA, A.; ISOZAKI, M.; SHIBUSAWA, Y.; SHINDO, H.; ITO, Y. Purification of glucosyltransferase from cell-lysate of *Streptococcus mutans* by counter-current chromatography using aqueous polymer two-phase system. **Journal of Chromatography B.**, v.805, p.155-160, 2004.

YU, E.K.C.; DESCHATELETS, L.; SADDLER, J.N. The combined enzymatic hydrolysis and fermentation of hemicellulose to 2,3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.365-372, 1984.

YÜREGİR, G.T.; AKSOY, K.; ARPACI, A.; ÜNLÜKURT, I.; TULI, A. Studies on red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase. Evaluation of reference values. **Ann. Clin. Biochem.**, v.31, p.50-55 , 1994.

ZASLAVSKY, B.Y. **Aqueous two-phase partitioning**: physical chemistry and bioanalytical applications. New York: Marcel Dekker, 1995. p.81.

## ANEXO 1

**Tabela 1 – Composição de cada componente dos SDFAs para a determinação dos comprimentos de linha de amarração (TLL)**

<b>Massa Molar de PEG</b>	<b>PEG% (p/p)</b>	<b>Sal% (p/p)</b>	<b>PEG + Sal</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>TLL%</b>
400	(20x6)/50=2,40g	(12x6)/40=1,80g	4,20g	1,80g	16,24
400	(22x6)/50=2,64g	(12x6)/40=1,80g	4,44g	1,56g	22,57
400	(24x6)/50=2,88g	(12x6)/40=1,80g	4,68g	1,32g	28,57
400	(26x6)/50=3,12g	(12x6)/40=1,80g	4,92g	1,08g	32,31
400	(28x6)/50=3,36g	(12x6)/40=1,80g	5,16g	0,84g	36,55
400	(30x6)/50=3,60g	(12x6)/40=1,80g	5,40g	0,60g	41,77
400	(35x6)/50=4,20g	(12x6)/40=1,80g	6,00g	-	52,03
1000	(16x6)/50=1,92g	(12x6)/40=1,80g	3,72g	2,28g	27,04
1000	(20x6)/50=2,40g	(12x6)/40=1,80g	4,20g	1,80g	37,69
1000	(22x6)/50=2,64g	(12x6)/40=1,80g	4,44g	1,56g	40,06
1000	(24x6)/50=2,88g	(12x6)/40=1,80g	4,68g	1,32g	45,03
1000	(26x6)/50=3,12g	(12x6)/40=1,80g	4,92g	1,08g	46,52
1000	(28x6)/50=3,36g	(12x6)/40=1,80g	5,16g	0,84g	48,32
1000	(30x6)/50=3,60g	(12x6)/40=1,80g	5,40g	0,60g	49,76
1500	(16x6)/50=1,92g	(12x6)/40=1,80g	3,72g	2,28g	31,04
1500	(20x6)/50=2,40g	(12x6)/40=1,80g	4,20g	1,80g	37,71
1500	(22x6)/50=2,64g	(12x6)/40=1,80g	4,44g	1,56g	41,30
1500	(24x6)/50=2,88g	(12x6)/40=1,80g	4,68g	1,32g	42,67
1500	(26x6)/50=3,12g	(12x6)/40=1,80g	4,92g	1,08g	43,25
1500	(28x6)/50=3,36g	(12x6)/40=1,80g	5,16g	0,84g	47,06
1500	(30x6)/50=3,60g	(12x6)/40=1,80g	5,40g	0,60g	50,64

**Tabela 2 – Planejamento fatorial 2<sup>2</sup>: quantidade necessária de cada componente do sistema para a extração da enzima G6PD em S DFA convencional (sem integrar a etapa de rompimento)**

<b>Sistema</b>	<b>TLL%</b>	<b>PEG (MM)</b>	<b>PEG % (p/p)</b>	<b>Fosf % (p/p)</b>	<b>PEG (g)</b>	<b>Fosf (g)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (g)</b>	<b>Amostra (g)</b>
1	30	400	25	12	5,0	3,0	1,0	1,0
2	40	400	30	12	6,0	3,0	-	1,0
3	30	1500	16	12	3,2	3,0	2,8	1,0
4	40	1500	22	12	4,4	3,0	1,6	1,0
5	35	1000	19	12	3,8	3,0	2,2	1,0
6	35	1000	19	12	3,8	3,0	2,2	1,0
7	35	1000	19	12	3,8	3,0	2,2	1,0

massa do sistema= 10,0 g e qsp com H<sub>2</sub>O deionizada, sendo a massa da amostra fixada em 1,0 g

Tabelas de 3 a 7 apresentam os volumes dos ensaios dos Sistemas de Duas Fases Aquosas.

**Tabela 3 – Volumes relacionados ao SDFAs convencional empregando homogeneizado clarificado (ausência de fragmentos celulares)**

<b>Ensaio</b>	<b>V<sub>Total</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>Topo</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>Fundo</sub> (mL)</b>	<b>R<sub>V</sub></b>
1	8,6	6,5	2,1	3,0
2	8,7	6,6	2,1	3,1
3	8,7	4,6	4,1	1,1
4	8,8	5,3	3,5	1,5
5	8,7	5,2	3,5	1,5
6	8,8	5,2	3,6	1,4
7	8,8	5,2	3,6	1,4

V<sub>Total</sub> = volume total do sistema; V<sub>Topo</sub> = volume da fase topo; V<sub>Fundo</sub> = volume da fase fundo; R<sub>V</sub> = razão volumétrica

**Tabela 4 – Volumes relacionados ao SDFAs empregando homogeneizado em presença de fragmentos celulares**

Ensaio	V <sub>Total</sub> (mL)	V <sub>Topo</sub> (mL)	V <sub>Fundo</sub> (mL)	R <sub>V</sub>
1	8,7	6,3	2,4	2,6
2	8,5	6,2	2,3	2,7
3	8,8	4,7	4,2	1,1
4	8,7	5,5	3,2	1,7
5	8,8	5,3	3,5	1,5
6	8,8	5,4	3,4	1,6
7	8,8	5,3	3,5	1,5

V<sub>Total</sub> = volume total do sistema; V<sub>Topo</sub> = volume da fase topo; V<sub>Fundo</sub> = volume da fase fundo; R<sub>V</sub> = razão volumétrica

**Tabela 5 – Volumes relacionados ao SDFAs e erro-padrão, empregando integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA em tubos de centrífuga graduados**

Ensaio	V <sub>Total</sub> (mL)	Erro-padrão	V <sub>Topo</sub> (mL)	Erro-padrão	V <sub>Fundo</sub> (mL)	Erro-padrão	R <sub>V</sub>
1	4,4	0,05	3,5	0,15	0,9	0,10	3,8
2	4,0	0,25	3,2	0,10	0,8	0,15	4,0
3	4,3	0,1	2,5	0,25	1,8	0,15	1,4
4	4,4	0,05	2,8	0,25	1,6	0,20	1,8
5	4,1	0,1	2,4	0,10	1,7	0	1,4
6	4,1	0	2,6	0	1,5	0	1,7
7	4,2	0,05	3,4	0	0,8	0,05	4,3
8	4,1	0	2,3	0	1,8	0	1,3
9	4,2	0	2,8	0,15	1,4	0,15	2,0
10	4,3	0,05	2,8	0,10	1,5	0	1,9
11	4,3	0,15	2,9	0,20	1,4	0,05	2,1

V<sub>Total</sub> = volume total do sistema; V<sub>Topo</sub> = volume da fase topo; V<sub>Fundo</sub> = volume da fase fundo; R<sub>V</sub> = razão volumétrica

**Tabela 6 – Volumes relacionados ao SDFAs empregando integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA em escala reduzida nas condições de otimização do processo (repetição)**

<b>Ensaio</b>	<b>V<sub>Total</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>Topo</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>Fundo</sub> (mL)</b>	<b>R<sub>V</sub></b>
4	4,1	2,1	2,0	1,1
4'	4,0	2,2	1,8	1,2

V<sub>Total</sub> = volume total do sistema; V<sub>Topo</sub> = volume da fase topo; V<sub>Fundo</sub> = volume da fase fundo; R<sub>V</sub> = razão volumétrica

**Tabela 7 – Volumes relacionados ao SDFAs empregando integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA em moinho de esferas de vidro**

<b>Ensaio</b>	<b>V<sub>Total</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>Topo</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>Fundo</sub> (mL)</b>	<b>R<sub>V</sub></b>
3	67	38	29	1,3
4	64	40,5	23,5	1,7

V<sub>Total</sub> = volume total do sistema; V<sub>Topo</sub> = volume da fase topo; V<sub>Fundo</sub> = volume da fase fundo; R<sub>V</sub> = razão volumétrica

Tabelas de 8 a 12 apresentam os valores de atividades volumétrica e específica de G6PD e de proteínas totais dos ensaios de Sistemas de Duas Fases Aquosas.

**Tabela 8 – Resultados do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para os ensaios empregando homogeneizado clarificado (na ausência de fragmentos celulares) e congelado**

Sistema (tempo de congelamento)	Antes da extração (inicial)			Depois da extração (SDFA)					
	A <sub>v</sub>	P <sub>t</sub>	A <sub>e</sub>	Topo			Fundo		
				A <sub>v</sub>	P <sub>t</sub>	A <sub>e</sub>	A <sub>v</sub>	P <sub>t</sub>	A <sub>e</sub>
1 <sup>a</sup>	1250	1434	0,87	181	199	0,91	nd	Nd	Nd
2 <sup>b</sup>	822	1437	0,57	99	171	0,58	nd	Nd	Nd
3 <sup>a</sup>	1250	1434	0,87	25	89	0,28	227	174	1,3
4 <sup>c</sup>	525	1368	0,38	7	100	0,07	99	120	0,82
5 <sup>d</sup>	146	1342	0,11	7	158	0,04	19	102	0,18
6 <sup>d</sup>	146	1342	0,11	6	155	0,04	19	100	0,19
7 <sup>e</sup>	99	1413	0,07	7	158	0,04	17	101	0,17

<sup>a</sup> = uso imediato, sem estocagem; <sup>b</sup> = armazenado a -10 °C por 24 h; <sup>c</sup> = armazenado por 48 horas; <sup>d</sup> = armazenado por 120 h; <sup>e</sup> = armazenado por 144 h; nd = não detectado; A<sub>v</sub> = atividade volumétrica de G6PD (U/L); P<sub>t</sub> = proteínas totais (mg/L); A<sub>e</sub> = atividade específica de G6PD (U/mg)

**Tabela 9 – Resultados do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para os ensaios realizados em um único dia empregando homogeneizado não clarificado**

Sistema	Antes da extração			Depois da extração					
	A <sub>v</sub>	P <sub>t</sub>	A <sub>e</sub>	Topo			Fundo		
				A <sub>v</sub>	P <sub>t</sub>	A <sub>e</sub>	A <sub>v</sub>	P <sub>t</sub>	A <sub>e</sub>
1	699,0	1323,4	0,53	148,5	147,1	1,01	41,2	90,6	0,45
2	699,0	1323,4	0,53	100,2	166,5	0,59	15,0	134,1	0,11
3	699,0	1323,4	0,53	22,0	95,7	0,23	182,9	134,1	1,36
4	699,0	1323,4	0,53	12,4	82,1	0,15	156,1	126,9	1,23
5	699,0	1323,4	0,53	11,0	132,8	0,08	157,2	113,3	1,39
6	699,0	1323,4	0,53	11,8	132,8	0,09	145,5	89,9	1,62
7	699,0	1323,4	0,53	11,4	139,9	0,08	152,3	93,8	1,61

A<sub>v</sub> = atividade volumétrica de G6PD (U/L); P<sub>t</sub> = proteínas totais (mg/L); A<sub>e</sub> = atividade específica de G6PD (U/mg)

**Tabela 10 – Resultados do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para os ensaios de integração em escala reduzida**

Sistema	Antes da extração*			Depois da extração*					
	A <sub>v</sub>	P <sub>t</sub>	A <sub>e</sub>	Topo			Fundo		
				A <sub>v</sub>	P <sub>t</sub>	A <sub>e</sub>	A <sub>v</sub>	P <sub>t</sub>	A <sub>e</sub>
1	145,0	180,5	0,80	88,0	163,0	0,54	93,5	337,5	0,28
2	117,5	177,5	0,66	43,0	131,0	0,33	71,5	348,0	0,21
3	83,5	163,0	0,51	67,0	248,0	0,27	90,5	144,5	0,63
4	72,5	174,5	0,42	77,0	274,0	0,28	56,5	59,5	0,95
5	104,0	182,5	0,57	77,0	296,5	0,26	104,0	77,5	1,34
6	99,5	168,5	0,59	69,0	299,0	0,23	80,5	65,0	1,24
7	103,0	186,5	0,55	69,5	291,0	0,24	74,0	70,5	1,05

A<sub>v</sub> = atividade volumétrica de G6PD (U/L); P<sub>t</sub> = proteínas totais (mg/L); A<sub>e</sub> = atividade específica de G6PD (U/mg) ; \* média dos valores de 2 repetições

**Tabela 11 – Atividade volumétrica de G6PD dos SDFAs e erro-padrão, empregando integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA em escala reduzida**

Ensaio	Av <sub>inicial</sub> (U/L)	Erro-padrão	Av <sub>Topo</sub> (U/L)	Erro-padrão	Av <sub>Fundo</sub> (U/L)	Erro-padrão
1	145,0	8,0	88,0	4,0	93,5	29,5
2	117,5	19,5	43,0	8,0	71,5	1,5
3	83,5	1,5	67,0	4,0	90,5	5,5
4	72,5	2,5	77,0	16,0	56,5	0,5
5	42,5	2,5	26,0	3,0	40,0	4,0
6	31,0	0	21,5	0,5	22,0	4,0
7	44,5	0,5	30,0	1,0	41,0	1,0
8	37,0	14,0	21,0	6,0	34,5	0,5
9	104,0	12,0	77,0	1,0	104,0	16,0
10	99,5	2,5	69,0	1,0	80,5	1,5
11	103,0	9,0	69,5	8,5	74,0	1,0

Av<sub>inicial</sub> = atividade volumétrica inicial; Av<sub>Topo</sub> = atividade volumétrica da fase topo; Av<sub>Fundo</sub> = atividade volumétrica da fase fundo

**Tabela 12 – Proteínas totais dos SDFAs e erro-padrão, empregando integração dos processos de rompimento celular a extração em SDFA em escala reduzida**

Ensaio	Pt <sub>inicial</sub> (mg/L)	Erro-padrão	Pt <sub>Topo</sub> (mg/L)	Erro-padrão	Pt <sub>Fundo</sub> (mg/L)	Erro-padrão
1	180,5	4,5	163,0	26,0	337,5	65,5
2	177,5	4,5	131,0	3,0	348,0	49,0
3	163,0	5,0	248,0	33,0	144,5	8,5
4	174,5	19,5	274,0	10,0	59,5	7,5
5	204,0	1,0	228,5	26,5	64,5	5,5
6	146,5	9,5	231,5	10,5	6,0	2,0
7	132,5	3,5	59,0	5,0	297,5	8,5
8	168,0	5,0	231,5	13,5	47,5	1,5
9	182,5	1,5	296,5	35,5	77,5	0,5
10	168,5	7,5	299,0	22,0	65,0	2,0
11	186,5	0,5	291,0	30,0	70,5	1,5

Pt<sub>inicial</sub> = proteínas totais iniciais; Pt<sub>Topo</sub> = proteínas totais da fase topo; Pt<sub>Fundo</sub> = proteínas totais da fase fundo

A Tabela 13 se refere à repetição dos ensaios nas condições otimizadas através da utilização de um planejamento 2<sup>2</sup> com face centrada.

**Tabela 13 – Resultado dos ensaios (repetição) conduzidos nas condições otimizadas no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com face centrada (extração de G6PD em SDFA em processos integrados em tubos de centrífuga graduados)**

Ensaio Nº	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		FP <sub>f</sub>
	TLL	PEG	TLL	PEG	
	(%)	(MM)	(%)	(MM)	
4	+1	+1	40	1500	3,6 (50,4)
4'	+1	+1	40	1500	4,1 (43,1)

( ) rendimento de G6PD na fase fundo, Ye<sub>f</sub> %



## APÊNDICE A

Curvas de Peso Seco:

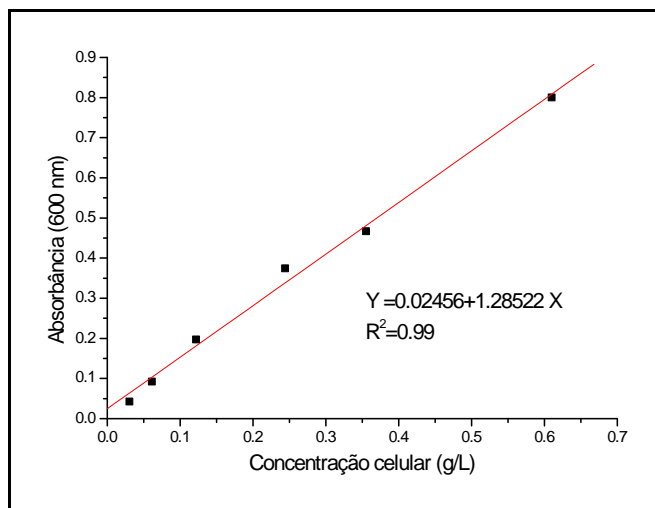


Figura 1. Curva de calibração que correlaciona a concentração de células de *Saccharomyces cerevisiae* com a absorvância a 600 nm

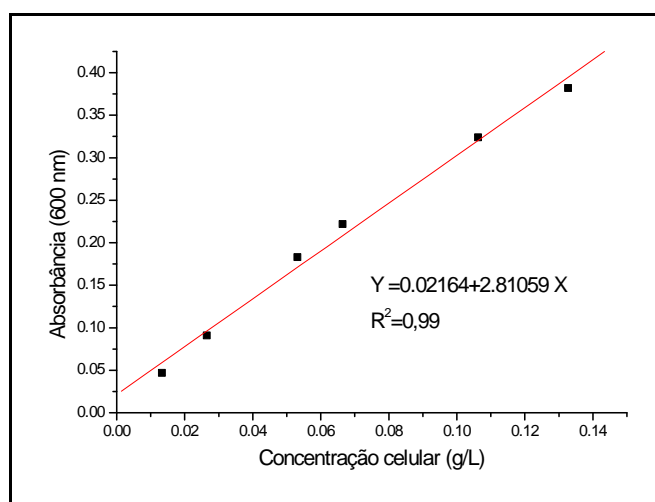


Figura 2. Curva de calibração que correlaciona a concentração de células de *Candida guilliermondii* com a absorvância a 600 nm

**APÊNDICE B**

Curvas Padrão de Proteínas (Bradford):

