



**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Curso de Pós-Graduação em Química**

**Extração, Recuperação e Atividade da
 α -Quimiotripsina em Sistemas de Micelas
Reversas**

Elisa Helena Siegel Moecke

Orientadora: Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

Abril de 2000

Extração, Recuperação e Atividade da α -Quimiotripsina em Sistemas de Micelas Reversas

Elisa Helena Siegel Moecke

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do grau de Doutor em Química, e aprovada em sua forma final pela orientadora e demais membros da banca examinadora.

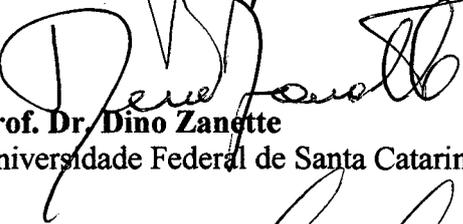

Prof.^a. Dr.^a. Maria da Graça Nascimento
Orientadora

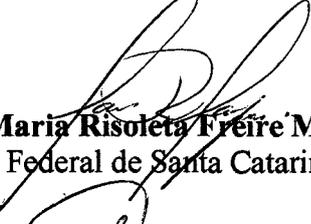

Prof. Dr. Valdir Soldi
Coordenador

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP


Prof. Dr. Paulo José Samenho Moram
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP


Prof. Dr. Dino Zanette
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC


Prof.^a. Dr.^a. Maria Risoleta Freire Marques
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC


Prof.^a. Dr.^a. Maria Marta de Sousa Siera
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

O verdadeiro saber

A busca pelo conhecimento

é uma constante no nosso dia a dia da vida acadêmica:

cada vez mais, queremos alcançar o máximo.

Mas somente a Sabedoria inspirada por Deus,

nos faz verdadeiros homens e mulheres.

Ao Marcos, Filipe e Martha,
que muito me amaram
e muito me amam.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, quero deixar o meu agradecimento a todas aquelas pessoas que comigo participaram direta ou indiretamente desta etapa de minha vida.

Agradeço a amiga e professora Maria da Graça Nascimento pela sua orientação, incentivo e confiança que em muito me ajudaram na elaboração e conclusão deste trabalho.

Ao professor Brian H. Robinson da University of East Anglia (UEA) da Inglaterra pela maneira como me recebeu em seu laboratório, bem como pela ajuda e sugestões durante o desenvolvimento inicial deste trabalho.

Ao Gareth D. Rees pelo auxílio nas atividades laboratoriais na University of East Anglia (Inglaterra).

Aos colegas e amigos do Laboratório 301, Flávia, Jair, Janaína, Mariana, Neide, Paulo, Pedro, Roberto, Sandra e Tais pela amizade e apoio. E um agradecimento especial ao Pedro Luís Ferreira da Silva pela colaboração nas atividades laboratoriais.

Agradeço ainda aos colegas Alex, Sônia, Angelo, Sandro e Elisane pela colaboração e amizade.

Aos professores Valdir Soldi, Ricardo Nunes e Eduardo Stadler (*in memoriam*) pela colaboração e sugestões.

Ao relator e demais membros da banca examinadora por suas valiosas sugestões.

Aos funcionários Graça e Jadir da Secretária de Pós-Graduação pela prestabilidade demonstrada durante o curso. E ao Dênio da Central de Análise pelo auxílio nas análises por Karl Fischer.

Agradeço aos demais professores e funcionários do Departamento de Química pela amizade e colaboração no decorrer deste trabalho.

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

E um agradecimento muito especial ao Marcos, meu esposo, que junto comigo caminhou para que esta etapa de minha vida pudesse se tornar realidade. E que, nos momentos difíceis desta caminhada, não permitiu que eu desistisse, mas que eu olhasse para frente em busca do meu ideal.

E outro tão especial aos meus filhos, Filipe Eduardo e Martha Luisa que souberam esperar por um momento não tão cheio de afazeres, por um momento só nosso.

A UFSC pela oportunidade de realização deste trabalho.

E acima de tudo, agradeço ao DEUS ETERNO, por ter me capacitado e amparado ao longo deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ENZIMAS.....	1
1.1.1 Definição e classificação.....	1
1.1.2 Catálise enzimática.....	3
1.1.3 Serina proteases.....	10
1.1.4 Quimiotripsina	10
1.2 ENZIMÁTICA EM MEIO ORGÂNICO	15
1.2.1 Métodos usados para catálise enzimática em meio orgânico.....	16
1.2.2 Enzimas em microemulsão	19
1.2.3 Micela reversa	20
1.2.4 Solubilização de enzimas em soluções micelares	21
1.2.5 Fatores que influenciam na transferência ou extração de compostos biologicamente ativos	24
1.2.6 Propriedades cinéticas da α -quimiotripsina (α -CT) em sistemas micelares	27
1.3 OBJETIVOS.....	31
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	32
2.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	32
2.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE MICELA REVERSA.....	33
2.2.1 Solução micelar de AOT com α -CT	33
2.2.2 Solução micelar de AOT com GPNA	33
2.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO	34
2.4 EXTRAÇÃO DA ENZIMA	36
2.5 DESIDRATAÇÃO DA SOLUÇÃO DE MICELA REVERSA	38
2.6 DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE MÁXIMA ($V_{m\acute{a}x}$) E A CONSTANTE DE MICHAELIS (K_M) EM SISTEMA MICELAR DE AOT	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

3.1	EXTRAÇÃO DA α-CT DA MICELA REVERSA DE AOT E SbPC PARA UMA FASE AQUOSA BÁSICA RECEPTORA.....	43
3.1.1	Curvas de calibração	43
3.1.2	Efeito do tempo de agitação na transferência reversa da enzima.....	47
3.1.3	Estabilidade da micela reversa SbPC em função do tempo de estocagem.....	50
3.1.4	Estudo do efeito do pH da fase aquosa de α -CT no processo de transferência reversa.....	51
3.2	DESIDRATAÇÃO DA MICELA REVERSA DE AOT CONTENDO α-CT, ATRAVÉS DO MÉTODO DE EQUILÍBRIO DA FASE VAPOR DA SOLUÇÃO MICELAR COM LiCl UMEDECIDO	54
3.2.1	Determinação da concentração de água.....	54
3.2.2	Determinação da concentração de proteína.....	57
3.3	ESTUDOS DA ATIVIDADE DA α-CT - MEDIDAS CINÉTICAS.....	62
3.4	ESTUDOS CINÉTICOS DA α-CT EM SISTEMA DE MICELA REVERSA DE AOT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGUA (W_0) DA MICELA REVERSA, E DO pH DA SOLUÇÃO AQUOSA	66
3.4.1	Influência do pH nos parâmetros cinéticos: constante cinética (k_{cin}) e constante catalítica (k_{cat})	66
3.4.2	Influência da concentração de água nos parâmetros cinéticos	68
4.	CONCLUSÕES.....	79
5.	BIBLIOGRAFIA	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Modelo de chave e fechadura da interação de substratos com enzimas.	4
Figura 1.2	Modelo de encaixe induzido da interação de substratos com enzima.	4
Figura 1.3	Diagrama energia, para uma reação catalisada com enzimas envolvendo um substrato simples (—), e a reação correspondente não catalisada (—). E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato; EP = complexo enzima-produto; P = produto; ΔG = energia livre de ativação.	6
Figura 1.4	Gráfico da velocidade de reação, em função da concentração do substrato, para uma enzima que obedece à cinética de Michaelis-Menten.	6
Figura 1.5	Estrutura tridimensional da α -quimiotripsina, mostrando os três resíduos de aminoácidos cataliticamente importantes, Ser 195 (serina 195), His 57 (histidina 57) e Asp 102 (aspartato 102). ¹¹	11
Figura 1.6	Hidrólise do acetato p-nitrofenila catalisada pela quimiotripsina.	13
Figura 1.7	Conformação da tríade catalítica serina-histidina-aspartato na quimiotripsina. ⁵	14
Figura 1.8	Apresentação esquemática da conversão enzimática em sistema de duas fases. S = Substrato, P = Produto, E = Enzima.	15
Figura 1.9	Fórmulas estruturais de surfactantes neutro, catiônicos, aniônicos e anfótero. (a) $C_{12}E_4$ (tetraetilenoglicolmono-n-dodeciléter); (b) CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio); (c) AOT (di-2-etilhexil-sulfosuccinato de sódio) e (d) SbPC (lecitina de soja contendo a fosfatidilcolina).	19
Figura 1.10	Diagrama de fases para sistemas água/óleo/surfactante. A região escura representa o domínio da microemulsão. ⁵⁹	20
Figura 1.11	Representação esquemática da micela reversa.	21
Figura 1.12	Três métodos utilizados para solubilização de proteínas em micelas reversas: a) método de transferência; b) método de injeção; c) método para proteínas insolúveis em água.	22
Figura 1.13	Representação esquemática do processo de transferência direta de proteínas da fase aquosa para a fase orgânica com surfactante - Método de Transferência.	23
Figura 1.14	Representação esquemática da extração de enzimas de micelas reversas formadas por um surfactante aniônico para uma fase aquosa receptora, manipulando o pH em relação ao pI da enzima.	25
Figura 2.1	Extração da α -CT da microemulsão de AOT para a fase aquosa de NaOH e determinação da concentração de α -CT, usando o método de Lowry.	37

Figura 2.2	Sistema usado na desidratação da solução de micela reversa contendo α -CT, usando o método de equilíbrio da fase vapor da solução micelar com o LiCl umedecido, a 30°C.....	38
Figura 2.3	Curva de calibração para p-nitroanilina em solução de micela reversa de AOT, $\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm, R = 0,99928.....	40
Figura 3.1	Curvas de calibração das proteínas BSA (♦) e α -CT (■) em sistema aquoso; α -CT em micela reversa de AOT/heptano (▲) e α -CT em micela reversa de SbPC/heptano (●).....	45
Figura 3.2	Diagrama esquemático da interferência dos surfactantes, CTAB, C ₁₂ E ₄ e SbPC no método de Lowry.....	46
Figura 3.3	Variação da absorvância em função do tempo de agitação da solução de micela reversa de AOT (♦), e SbPC (■) na extração da α -CT. $\lambda = 750$ nm; [AOT] = 200 mM; $W_o = 10$ e [α -CT] = 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Referência: fase aquosa de NaCl a 0,85% na ausência de α -CT.....	47
Figura 3.4	Processo dinâmico ocorrido durante a dessolubilização da proteína. (a) difusão da micela cheia para a região interfacial. (b) coalescência e mistura do conteúdo das gotas micelares cheias de proteínas e as vazias. (c) coalescência e mistura do conteúdo de duas micelas vazias. (d) coalescência ou formação de micelas vazias na interface das duas fases. (e) coalescência da micela cheia com a interface, e (f) expulsão da proteína para fora da interface do surfactante.....	49
Figura 3.5	Efeito do pH da solução tampão de glicina usada na preparação da solução aquosa de α -CT injetada na solução de AOT/heptano (■) e de SbPC/heptano (■) na transferência da α -CT. Medidas de absorvância a 750 nm; [AOT] = 0,2 M, tempo de agitação = 1 min.; [SbPC] = 0,2 M, tempo de agitação = 10 min.; $W_o = 10$, em heptano contendo [α -CT] = 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Referência: fase aquosa na ausência de α -CT.....	52
Figura 3.6	Efeito do tempo de desidratação da micela reversa de AOT 0,2 M/ heptano contendo solução aquosa tamponada (glicina) 0,1M/NaOH) de α -CT em diferentes pH, (pH 7,0 (♦); pH 7,7 (■); pH 8,2 (▲); pH 9,0 (●); pH 9,8 (◇) e pH 11,2()) na concentração de H ₂ O.....	57
Figura 3.7	Variação da concentração de α -CT em função do tempo de desidratação determinada em pH 8,2 a 30 °C pelos métodos direto (■) e de transferência reversa (♦).....	59
Figura 3.8	Perfil da desidratação da micela reversa de AOT através da fase vapor a 30°C com LiCl umedecido (concentração de água (♦); concentração de α -CT (■)). Composição inicial da micela reversa em heptano: [AOT] = 0,2 M, $W_o = 10$, [α -CT] = $3,51 \times 10^{-6}$ M e pH = 7,0 da solução aquosa de α -CT injetada na solução.....	60
Figura 3.9	Variação da velocidade de hidrólise do GPNA em função da concentração do substrato, catalisada pela α -CT, em sistema de micela reversa de AOT 0,2 M /heptano, $W_o = 10$, [α -CT] _{final} = $3,51 \times 10^{-6}$ M, à 30°C.....	63

- Figura 3.10 Gráfico da dupla recíproca para a reação de hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT em sistema micelar de AOT 0,2 M /heptano, $W_o = 10$, $[\alpha\text{-CT}]_{\text{final}} = 3,51 \times 10^{-6}$ M, tampão glicina (pH = 8,2), à 30°C. 64
- Figura 3.11 Influência do pH da solução aquosa tamponada de α -CT (tampão glicina 0,1M) injetada na solução de AOT/heptano, na constante de velocidade catalítica (k_{cat}) da reação de hidrólise do GPNA à 30°C. $[\text{AOT}] = 0,2$ M, $\alpha\text{-CT}]_{\text{final}} = 3,51 \times 10^{-6}$ M, $[\text{GPNA}]_{\text{final}} = 3,24 \times 10^{-6}$ M..... 67
- Figura 3.12 Grau de atividade da α -CT na reação de hidrólise de GPNA em função do tempo de desidratação da micela reversa de AOT/heptano contendo α -CT com diferentes pH. $[\text{AOT}] = 0,2$ M, W_o inicial =10, $[\alpha\text{-CT}]_{\text{final}} = 3,51 \times 10^{-6}$ M, $[\text{GPNA}]_{\text{final}} = 3,24 \times 10^{-4}$ M. 75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Classificação de acordo com a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica.....	2
Tabela 1.2	Valores de k_{cat} e K_M para algumas enzimas.....	8
Tabela 1.3	Parâmetros cinéticos da hidrólise do N-trans-cinamoilimidazol catalisada pela α -CT, em microemulsão de AOT. Temperatura: $(25,3 \pm 0,4)^\circ\text{C}$	29
Tabela 2.1	Concentrações da enzima, BSA, usadas na obtenção da curva de calibração em meio aquoso.....	36
Tabela 2.2	Concentrações de p-nitroanilina e GPNA, usadas na obtenção da curva de calibração em meio de micela reversa de AOT 0,2 M, $W_0 = 10$	44
Tabela 2.3	Concentrações finais de GPNA na solução micelar de AOT 0,2 M em heptano com $W_0 = 10$, usado na reação de hidrólise para determinar a $V_{m\acute{a}x}$ e K_M	46
Tabela 3.1	Valores de absorvância em função da concentração das proteínas BSA e α -CT em meio aquoso e α -CT em micela reversa de AOT.....	46
Tabela 3.2	Medidas de absorvância a 750 nm, da fase aquosa receptora com os reagentes de Lowry, após a transferência reversa do conteúdo interno (sem α -CT) da micela reversa de SbPC. A velocidade e o tempo de centrifugação usados para separação das fases foram 4000 rpm durante 25 min.....	53
Tabela 3.3	Concentração de água presente na micela reversa de AOT 0,2 M em função de W_0 na ausência de α -CT.....	58
Tabela 3.4.	Concentração de H_2O da solução micelar de AOT 0,2 M em heptano, em função do tempo de desidratação, na ausência de α -CT.	58
Tabela 3.5	Concentração de H_2O no sistema micelar de AOT 0,2 M/heptano contendo solução tamponada (glicina/NaOH) de α -CT em diferentes pH em função do tempo de desidratação, a 30°C	59
Tabela 3.6	Concentração de proteína no sistema micelar de AOT 0,2 M/heptano contendo solução tamponada (glicina/NaOH) de α -CT em diferentes pH, em função do tempo de desidratação.	61
Tabela 3.7	Medidas cinéticas para reação de hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT em sistema de micela reversa de AOT 0,2 M / heptano, a 30°C	72
Tabela 3.8	Influência do pH da solução aquosa de α -CT nos parâmetros cinéticos (constante cinética e catalítica) durante a reação de hidrólise do GPNA em solução micelar de AOT/heptano a 30°C	75
Tabela 3.9	Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 7,0 (tampão glicina 0,1 M).	77

Tabela 3.10	Parâmetros de atividade da reação de hidrólise de GPNA catalisada por α -CT em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 7,7 (tampão glicina 0,1 M).	78
Tabela 3.11	Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 8,2 (tampão glicina 0,1 M).	79
Tabela 3.12	Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 9,0 (tampão glicina 0,1 M).	80
Tabela 3.13	Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 9,8 (tampão glicina 0,1 M).	81
Tabela 3.14	Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 11,2 (tampão glicina 0,1 M).	82
Tabela 3.15	Constantes de velocidade catalítica obtidas a partir das reações de hidrólise do GPNA catalisadas pela α -CT em soluções micelares AOT 0,1 M antes e após 48 horas de desidratação e depois de reidratadas.	84
Tabela 3.16	Grau de conversão em produto p-nitroanilina, função das soluções micelares de AOT 0,2 M contendo α -CT em diferentes pH antes e após 48 horas de desidratação e depois de reidratadas.	86

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α -CT	= α -quimiotripsina;
BSA	= soro albumina bovina;
AOT	= di-2-etilhexil-sulfosuccinato de sódio;
SbPC	= lecitina de soja – fosfatidilcolina;
C ₁₂ E ₄	= tetraetilenoglicolmono-n-dodeciléter;
CTAB	= brometo de cetiltrimetilamônio;
GPNA	= n-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida;
ATP	= trifosfato de adenosina;
SDS	= dodecilsulfato de sódio;
EC	= comissão de enzimas;
BHL	= Balanço Hidrófilo-Lipolítico;
ATME	= N-acetilriptofano metil éster;
m.r.	= micela reversa;
CV Lipase	= Lipase de <i>Chromobacterium viscosum</i>
W_0	= razão entre a molaridade da água e a molaridade do surfactante;
E	= enzima;
S	= substrato;
ES	= complexo enzima-substrato;
EP	= complexo enzima-produto;
P	= produto;
pK _a	= constante de dissociação;
pI	= ponto isoeletrico;
ΔH_{cat}	= variação da entalpia;
ΔS_{cat}	= variação da entropia;
k	= constante de velocidade;
k _{cat}	= constante catalítica;
k _{cin}	= constante cinética;
K _M	= constante de Michaelis;
V	= velocidade;
V _{máx}	= velocidade máxima de catálise;
PM	= peso molecular.

RESUMO

A transferência reversa de α -quimiotripsina (α -CT) foi estudada em sistemas de micelas reversas com vários surfactantes para a fase aquosa receptora de NaOH contendo 2,5% de etanol. Observou-se que o pH da solução aquosa de α -CT (tampão glicina 0,1 M) injetada na solução de AOT e de SbPC influenciou no processo de transferência, sendo que em pH 7,7 obteve-se valores mais elevados. O tempo de agitação necessário para que ocorresse a transferência da proteína da fase micelar para a fase aquosa também foi avaliado. Verificou-se que o método de Lowry foi eficiente para a determinação do teor protéico na fase aquosa após a transferência.

Na segunda etapa do trabalho, estudou-se a desidratação da solução de micela reversa de AOT/heptano contendo α -CT, usando o método do equilíbrio da fase vapor da solução micelar com LiCl umedecido em um sistema hermeticamente fechado. Após 48 horas quase toda água do interior da micela foi retirada.

A partir dos dados cinéticos da reação de hidrólise do N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida - GPNA em micela reversa de AOT catalisada pela α -CT foram determinadas a constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Esta reação obedece a cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração de GPNA de 0,056 à $1,110 \times 10^{-5}$ M. Os valores da K_M e da $V_{m\acute{a}x}$ obtidos foram $6,83 \times 10^{-5}$ M e $3,68 \times 10^{-4}$ M s⁻¹, respectivamente.

Estudou-se a influência da razão molar (W_0) e o pH na hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT durante a desidratação da micela reversa de AOT / heptano. A constante catalítica (k_{cat}) e o grau de conversão diminuíram com a redução do teor de água ($\sim 0,002$ mg μL^{-1}) após desidratação por 48h. O pH da solução aquosa de α -CT mostrou ser extremamente importante na atividade enzimática. A enzima mostrou maior atividade em pH 9,0 e 9,8. Em pH 11,2 a atividade da α -CT foi muito baixa, e após a reidratação não observou-se atividade enzimática, provavelmente ocorreu uma inativação da enzima. Resultados análogos foram obtidos em pH 9,8. Nos demais valores de pH (7,7; 8,2 e 9,0), a enzima recuperou sua atividade após a reidratação da solução micelar. Estes resultados foram obtidos através da determinação das k_{cat} e % de conversão.

Os resultados mostraram que as soluções de micelas reversas contendo α -CT em estado "dormente" podem ser mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 21 dias, com a imediata recuperação da atividade após a reidratação.

ABSTRACT

α -Chymotrypsin (α -CT) back transfer was studied in reversed micellar systems with various surfactants to an NaOH (0,1M) aqueous phase with 2.5%(v/v) ethanol. It was observed that the pH of the α -CT aqueous solution (0.1 M glycine buffer) influences the back transfer process, and that pH 7.7 whereas higher values were obtained. The stirring time needed for the back transfer from micellar to aqueous phase, was also studied. Lowry's methodology was efficient for the protein determination in aqueous phase, after the transference.

In the second part of this work, the dehydration of reversed micellar solution of AOT – heptane with α -CT was studied, using the equilibrium method of LiCl vapor phase in a closed system. After 48 hours, almost all water was removed from the micelle interior.

The Michaelis constant (K_M) and the maximum rate (V_{max}) were obtained from kinetic data for the hydrolysis of N-glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide (GPNA) in the presence of AOT reversed micelle catalysed by AOT. This reaction obeyed Michaelis-Menten kinetics in the range of GPNA of 0.056 - 1.110 x 10⁻⁵ M. Values for K_M and V_{max} were 6.83 x 10⁻⁵ M and 3.68 x 10⁻⁴ M s⁻¹, respectively.

The influence of molar ratio (W_o) and pH in the hydrolysis of GPNA catalysed by α -CT, was also studied during the dehydration of AOT/heptane reverse micelle.

Values for catalytic constants (k_{cat}) and conversion degree, drastically decreased as water concentration decreased (up to ~ 0.002 mg μ L⁻¹) after 48 hours dehydration. The pH of α -CT aqueous solution was extremely important in enzymatic activity. At pH 11.2 the α -CT activity was very low, and after the dehydration process no activity was observed. Similar results were obtained at pH 9.8. For other pH values (7.7; 8.2 and 9.0), the enzyme regenerated its activity after rehydration of reverse micellar solution. These results were evaluated by the k_{cat} and % conversion determinations.

The results showed that reversed micellar systems containing α -CT in a "dormant" state can be kept at room temperature by at least 21 days with the α -CT activity immediately recuperation regenerated on rehydration.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENZIMAS

1.1.1 Definição e classificação

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos *in vivo*, envolvendo reações com substratos naturais e não naturais *in vitro*.¹⁻⁴ As enzimas são geralmente de natureza protéica, altamente específicas e apresentam grande poder catalítico. As enzimas protéicas são do tipo globulares.¹

Quimicamente, proteínas são polímeros de alto peso molecular formados por monômeros ou unidades fundamentais conhecidas por aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas (—NHCO—).

As amidas resultantes das reações entre os grupos amina e carboxílico dos aminoácidos são chamados de peptídeos. Conforme o número de resíduos de aminoácidos por molécula, dois, três, três a dez e mais de dez, recebem o nome de dipeptídeo, tripeptídeo, oligopeptídeo e polipeptídeo, respectivamente.^{5,6}

As enzimas vem sendo usadas por vários séculos, apesar de sua verdadeira natureza ter-se tornada conhecida apenas recentemente. Elas, cada vez mais, apresentam grande importância na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos e na indústria.^{7,8}

Devido à falta de consistência na nomenclatura e ao rápido crescimento da lista de enzimas, tornou-se necessário um modo sistemático de nomenclatura e classificação. Uma Comissão foi indicada pela União Internacional de Bioquímica (IUB), e seus relatórios, publicados em 1964 e atualizados em 1972, 1978, 1984 e 1992, formam a base do sistema aceito atualmente.⁷

A Comissão de Enzimas dividiu-as em seis classes principais de acordo com as reações catalisadas como mostrado na **Tabela 1.1**.⁸

Tabela 1.1 Classificação de acordo com a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica

Classes de Enzimas	Tipo de reação
Oxidoredutases	Catalisam reações de oxiredução envolvendo oxigenação, tal como, $\text{CH} \rightarrow \text{COH}$ ou adição geral de átomos de hidrogênio equivalentes, como $\text{CH(OH)} \rightarrow \text{C=O}$ e $\text{CH} \rightarrow \text{C=C}$.
Transferases	Catalisam reações nas quais grupos são transferidos, tais como acila, açúcar, fosforila, aldeído ou cetona, grupos contendo enxofre de uma molécula para outra.
Hidrolases	Promovem a hidrólise e formação de ésteres, amidas, lactonas, epóxidos, peptídeos e outros grupos contendo funções C-N, e a hidratação de ligações C=C e epóxidos.
Liases	Catalisam adições, geralmente de HX, a duplas ligações tais como C=C, C=N e C=O e reações reversas.
Isomerasas	Catalisam a migração das duplas ligações, funções oxigenadas, racemização e rearranjos.
Ligases	São mediadoras da formação de C-O, C-S, C-N, C-C e ligações de éster de fosfato.

A cada enzima foi designado um código, consistindo de quatro números separados por pontos. O primeiro dígito do código mostra a qual classe a enzima pertence. O segundo e o terceiro dígito descrevem o tipo de reação catalisada. Não há uma regra geral, pois o significado destes dígitos é definido para cada classe principal. O quarto dígito define o substrato. A comissão designou para cada enzima um nome sistemático, além do nome trivial já existente. Este nome sistemático, se forma a partir do substrato ou substratos com o sufixo “-ase”, indicando a natureza do processo catalítico, com exceção as enzimas proteolíticas que normalmente apresentam um sufixo “-ina”, por exemplo, tripsina.^{7, 8, 9}

Para ilustrar, toma-se como exemplo a creatina-quinase (nome trivial) e que tem como nome sistemático “ATP: creatina-fosforotransferase”, baseado na reação que catalisa. Seu número de classificação é EC 2.7.3.2, onde EC representa *Enzyme Commission*, o primeiro algarismo (2) indica o nome da classe (transferases), o segundo algarismo (7) indica a reação de transferência do grupo fosforila, o terceiro dígito (3) indica

que as fosforotransferases apresentam um grupo nitrogênio como aceptor, e o último dígito (2) indica a creatina-quinase.³

As enzimas são altamente específicas, tanto para as reações catalisadas bem como para os substratos. Uma enzima geralmente catalisa uma só reação química ou um conjunto de reações intimamente relacionadas. Reações colaterais que levam ao desperdício da formação de produtos secundários raramente ocorrem. O grau de especificidade para o substrato é geralmente alto e, às vezes, absoluto.¹

1.1.2 Catálise enzimática

As enzimas multiplicam as velocidades de reação por fatores de pelo menos 10^6 . Grande parte de seu poder catalítico se deve à capacidade delas aproximarem os substratos em orientações favoráveis nos complexos enzima-substrato (ES). Os substratos ligam-se a uma região específica da enzima, chamada de centro ativo ou sítio ativo. De modo geral, são altamente seletivas em sua ligação com os substratos, e a especificidade catalítica depende em parte da natureza da ligação.^{1,5}

O centro ativo é a região na qual os substratos se ligam e contém os resíduos de aminoácidos que participam diretamente na formação e ruptura de ligações. Esses aminoácidos são chamados de grupamentos catalíticos. Apesar das enzimas diferirem muito em estrutura, especificidade e modo de catálise, os centros ativos apresentam algumas características gerais, tais como:¹

1. Ocupam uma parte relativamente pequena do volume total de uma enzima;
2. São entidades tridimensionais;
3. Os substratos ligam-se às enzimas por múltiplas atrações fracas;
4. São depressões ou fendas;
5. A especificidade da ligação depende do arranjo, definido com precisão, dos átomos no centro ativo.

Para adaptar-se ao centro ativo, o substrato deve apresentar uma forma complementar. O modelo mais ilustrativo é o de Emil Fischer da chave e fechadura, reportado em 1890, mostrando ser altamente favorável (**Figura 1.1**).^{1,5,7}

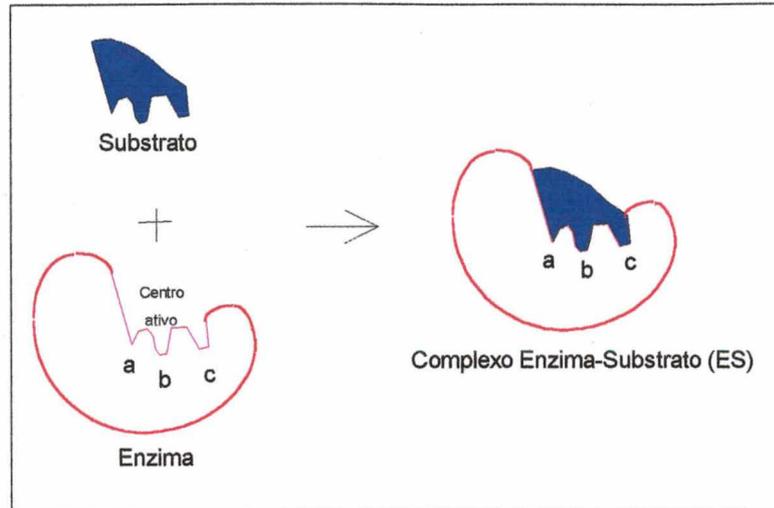


Figura 1.1 Modelo de chave e fechadura da interação de substratos com enzimas.

No entanto, é evidente que as formas dos centros ativos de algumas enzimas são altamente modificadas pela ligação do substrato, como foi postulado por Daniel E. Koshland, Jr., em 1958. Os centros ativos dessas enzimas adquirem as formas complementares a do substrato, depois de ligado. Esse processo de reconhecimento dinâmico é chamado de encaixe induzido (**Figura 1.2**).^{1, 5, 7}

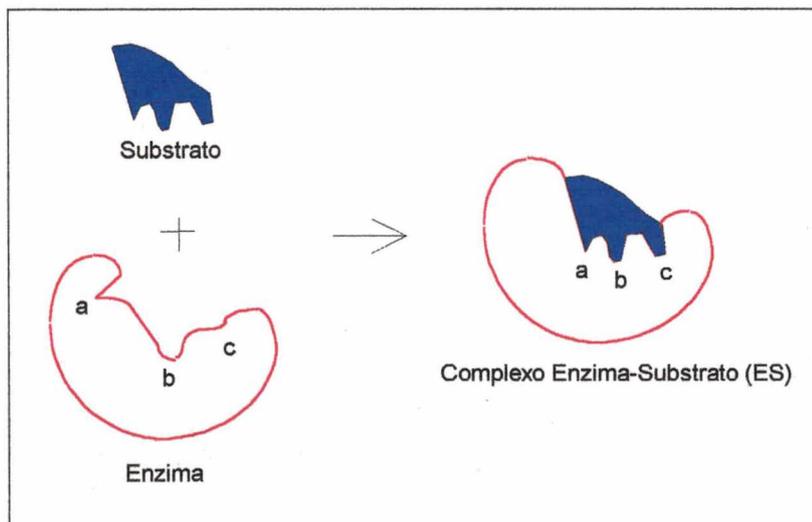


Figura 1.2 Modelo de encaixe induzido da interação de substratos com enzima.

As enzimas possuem algumas propriedades importantes como catalisadores:²

- Aceleram a velocidade das reações, em condições moderadas de reação;
- São altamente seletivas para substratos e estereoseletivas em relação ao que catalisam;
- Podem estar sujeitas à regulação, isto é, a atividade catalítica pode ser fortemente influenciada pelas concentrações de substratos, produtos ou outras espécies presentes no meio reacional;
- Catalisam as reações sobre as mesmas condições ou similares as dos organismos *in vivo*;
- Geralmente são instáveis em relação aos catalisadores produzidos pelo homem. As condições de reação tais como pH, temperatura, concentração de substrato, etc., necessitam ser controladas. Tais condições podem causar mudanças conformacionais, alterando os sítios ativos e a estrutura terciária da enzima;
- São quirais, e podem apresentar alta enantioseletividade.

As enzimas não alteram o equilíbrio das reações, mas atuam como catalisadores reduzindo a energia livre de ativação das reações químicas. Elas aceleram as reações, promovendo uma nova via, na qual o estado de transição tem uma energia mais baixa e, portanto, é mais acessível do que na reação não catalisada (**Figura 1.3**).⁵ A primeira etapa na catálise é a formação de um complexo enzima-substrato. Os substratos ligam-se às enzimas em fendas, nos centros ativos da qual a água é excluída quando ocorre a ligação. A especificidade das interações enzima-substrato surge principalmente das ligações de hidrogênio, que são direcionais e da forma do centro ativo que rejeita as moléculas que não apresentam formas suficientemente complementares.¹⁰

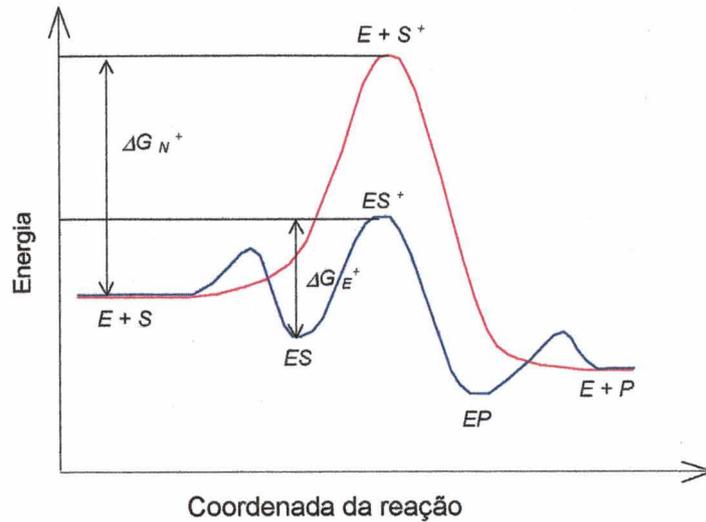


Figura 1.3 Diagrama energia, para uma reação catalisada com enzimas envolvendo um substrato simples (—), e a reação correspondente não catalisada (—). E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato; EP = complexo enzima-produto; P = produto; ΔG = energia de ativação.

Para muitas enzimas, a velocidade de catálise (V) varia com a concentração do substrato, da maneira mostrada na **Figura 1.4**.^{1,10,11} A velocidade é definida como o número de moles de produto formados por segundo. Em uma concentração fixa de enzima, V é quase linearmente proporcional à concentração de substrato quando a $[S]$ é pequena. Em concentrações elevadas de substrato, V é quase independente de $[S]$.

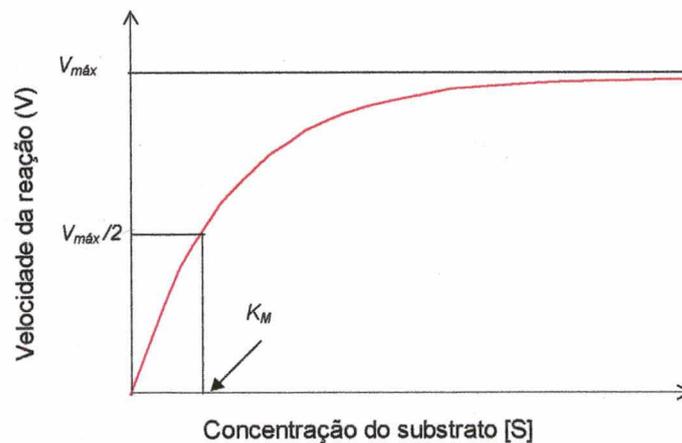
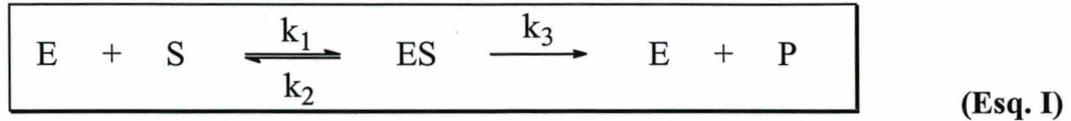


Figura 1.4 Gráfico da velocidade de reação, em função da concentração do substrato, para uma enzima que obedece à cinética de Michaelis-Menten.

Leonor Michaelis e Maud Menten, em 1913, propuseram um modelo bastante simples para explicar as propriedades cinéticas de algumas enzimas, que pode ser resumida segundo o **Esquema I**:^{1,10}



Nesta modelo, a enzima, E, combina-se com o substrato, S, formando o complexo ES com uma constante de velocidade k_1 . O complexo ES pode dissociar-se para E e S, com uma constante de velocidade k_2 , ou pode prosseguir formando produto, P, com uma constante de velocidade k_3 (**Equação 1**).

$$\boxed{V = k_3[ES]} \quad (\text{Eq.1})$$

As velocidades de formação e de decomposição de ES são dadas pelas **Equações 2** e **Equação 3**, respectivamente;

$$\boxed{\text{Velocidade de formação de ES} = k_1 [E][S]} \quad (\text{Eq.2})$$

$$\boxed{\text{Velocidade de decomposição de ES} = (k_2 + k_3)[ES]} \quad (\text{Eq.3})$$

Quando as velocidades de formação e de decomposição do complexo ES são iguais tem-se a **Equação 4**;

$$\boxed{[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 k_3) / k_1}} \quad (\text{Eq.4})$$

A **Equação 4** pode ser simplificada pela definição de uma nova constante, K_M , chamada de *constante de Michaelis* (**Equação 5**);

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (\text{Eq.5})$$

que, substituindo na **Equação 4**, obtém-se a **Equação 6**;

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (\text{Eq.6})$$

A concentração do substrato é igual a do substrato total, desde que a concentração da enzima seja muito menor que a do substrato. A concentração da enzima é igual a concentração total da enzima, $[E_T]$ menos a concentração do complexo ES (**Equação 7**).

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (\text{Eq.7})$$

Aplicando essa expressão na **Equação 6**, tem-se a **Equação 8**.

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES])[S]}{K_M} \quad (\text{Eq.8})$$

Após a resolução desta, obtém-se a **Equação 9**.

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Eq.9})$$

A velocidade máxima, $V_{\text{máx}}$, é atingida quando os centros da enzima estão saturados com o substrato, isto é, quando $[S]$ é muito maior do que K_M , de modo que $[S]/([S] + K_M) \sim 1$. Portanto,

$$V_{\text{máx}} = k_3 [E_T] \quad (\text{Eq.10})$$

Aplicando a **Equação 10** na **Equação 9**, chega-se à equação da velocidade de formação de produto de Michaelis – Menten;

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Eq.11})$$

onde V_{\max} é a velocidade quando a enzima está completamente saturada com o substrato, e K_M é a constante de Michaelis, que é a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é a metade da máxima conforme mostrado na **Figura 1.4** da página 6.

É conveniente transformar a equação da velocidade de Michaelis-Menten em uma que forneça um gráfico de linha reta. Isto pode ser feito tomando-se a recíproca da **Equação 11**, que resulta na **Equação 12**.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \quad (\text{Eq.12})$$

A velocidade máxima, V_{\max} , é igual ao produto de k_3 pela concentração total da enzima. A constante cinética k_3 ou k_{cat} , chamada de número de rotação ou rotatividade (turnover number), é o número de moléculas de substrato transformadas em produto por unidade de tempo, em um só centro catalítico, quando a enzima está totalmente saturada com o substrato. Na **Tabela 1.2** estão listados alguns valores de k_{cat} e K_M de algumas enzimas.¹¹

Tabela 1.2 Valores de k_{cat} e K_M para algumas enzimas.

Enzima	Função	k_{cat} ^(a)	K_M ^(b)
Acetilcolinesterase	Regenera a acetilcolina na transmissão de impulsos nervosos	$1,4 \times 10^4$	$9,5 \times 10^{-5}$
Anidrase carbônica	Catalisa a hidratação de CO_2	$1,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-2}$
Catalase	Catalisa a conversão de H_2O_2	$1,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-2}$
Quimiotripsina	Enzima proteolítica	$1,9 \times 10^2$	$6,6 \times 10^{-4}$

(a) As unidades para k_{cat} são (moles de substrato) (moles de enzima)⁻¹ segundos⁻¹; (b) As unidades para K_M são moles litros⁻¹.

O valor de K_M depende de cada substrato em particular e, também das condições reacionais, tais como pH, temperatura e força iônica.

1.1.3 Serina proteases

Dentro da classe das hidrolases encontram-se as serinas proteases que constituem um dos grupos mais difundidos de enzimas proteolíticas, e são caracterizadas por apresentarem um resíduo de serina reativo. As enzimas proteolíticas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de outras proteínas. As serinas proteases tripsina, quimiotripsina e elastase sintetizadas pelo pâncreas, formam um grupo de enzimas intimamente ligadas, são cineticamente muito similares entre si. Elas hidrolisam peptídios e substratos sintéticos do tipo éster e apresentam um pH ótimo, em torno de 8, para pH mais baixos ocorre uma diminuição da atividade. Nos três casos, ocorre a formação de um intermediário acil-enzima, e durante a reação a parte carboxílica do substrato esterifica a hidroxila da serina reativa da enzima. A principal diferença entre as três é a especificidade.^{5, 12}

1.1.4 Quimiotripsina

A quimiotripsina como uma enzima proteolítica, pertence à classe das serina-proteases e apresenta o seguinte número de classificação EC 3.4.21.1,⁹ o último dígito se

refere às formas α e β da quimiotripsina. Ela é constituída por três cadeias polipeptídicas conectadas por duas pontes de dissulfeto intercadeias, com massa molecular de 25 kDa. A quimiotripsina é sintetizada como um precursor inativo com uma só cadeia chamado quimiotripsinogênio, que consiste de uma cadeia polipeptídica de 245 resíduos de aminoácidos.^{1,13}

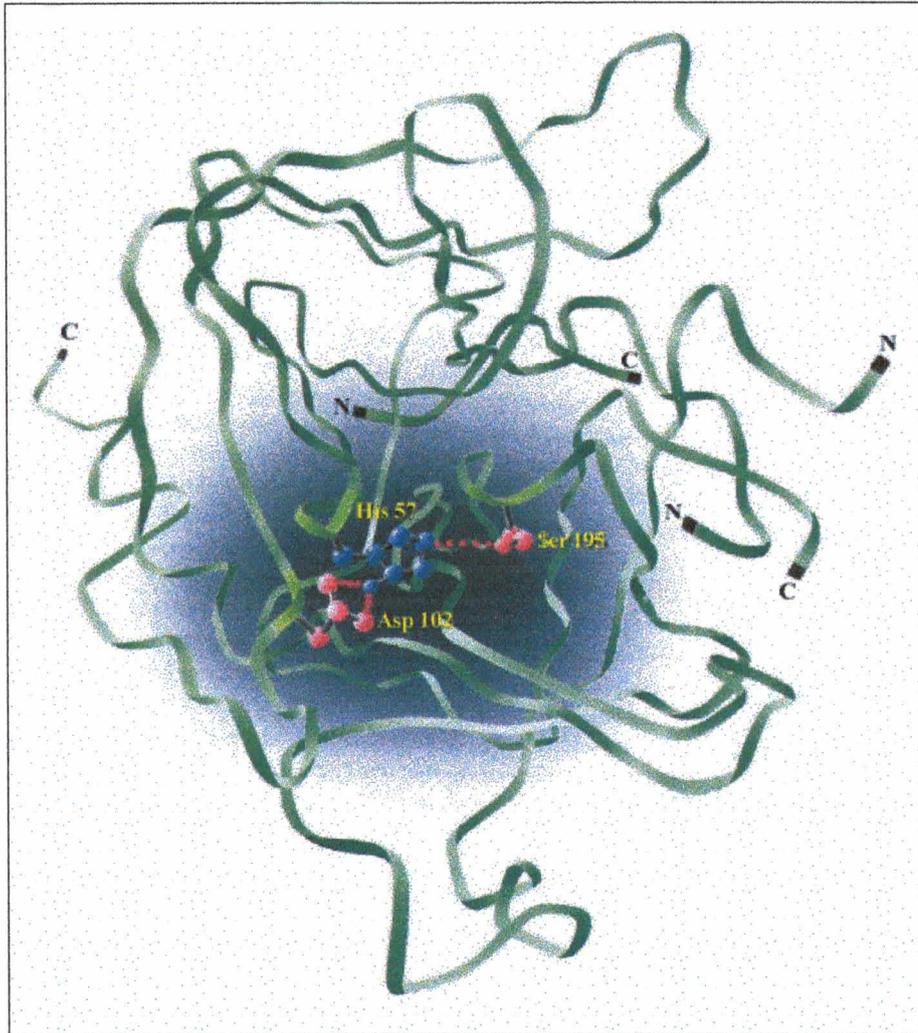


Figura 1.5 Estrutura tridimensional da α -quimiotripsina, mostrando os três resíduos de aminoácidos cataliticamente importantes, Ser 195 (serina 195), His 57 (histidina 57) e Asp 102 (aspartato 102).¹¹

A estrutura tridimensional da α -quimiotripsina foi determinada por cristalografia de raio-X. em 1967.¹⁴ A molécula é um elipsóide compacto com as dimensões $51 \times 40 \times 40$ Å. Ela contém várias regiões de folha pregueada β antiparalela e pouca α -hélice. Todos os grupamentos carregados estão na superfície da molécula, exceto os três que exercem uma função importante na catálise, serina 195, histidina 57 e aspartato102. (**Figura 1.5**)¹¹.

A quimiotripsina exerce uma função biológica importante que é a hidrólise de proteínas no intestino delgado. A clivagem de ligações peptídicas é seletiva, ocorrendo somente no lado carboxílico de cadeias laterais aromáticas de tirosina, triptofano e fenilalanina, e de grandes radicais hidrofóbicos como a metionina. A quimiotripsina também hidrolisa ligações éster. Sistemas modelo baseados na hidrólise de ésteres são freqüentemente usados para o estudo de reações de hidrólise de peptídios.^{1,2,14}

O substrato, acetato de p-nitrofenila, tem sido usado como modelo em estudos cinéticos na hidrólise de peptídios. Na primeira etapa ocorre a combinação do acetato de p-nitrofenila com a quimiotripsina, formando um complexo enzima-substrato. A seguir a ligação éster é clivada desse substrato. Um dos produtos, o p-nitrofenol, é então liberado da enzima, enquanto o grupamento acetil do substrato fica ligado por covalência. A água ataca o complexo acetil-enzima, liberando o íon acetato e regenerando a enzima, conforme mostrado na **Figura 1.6**.¹

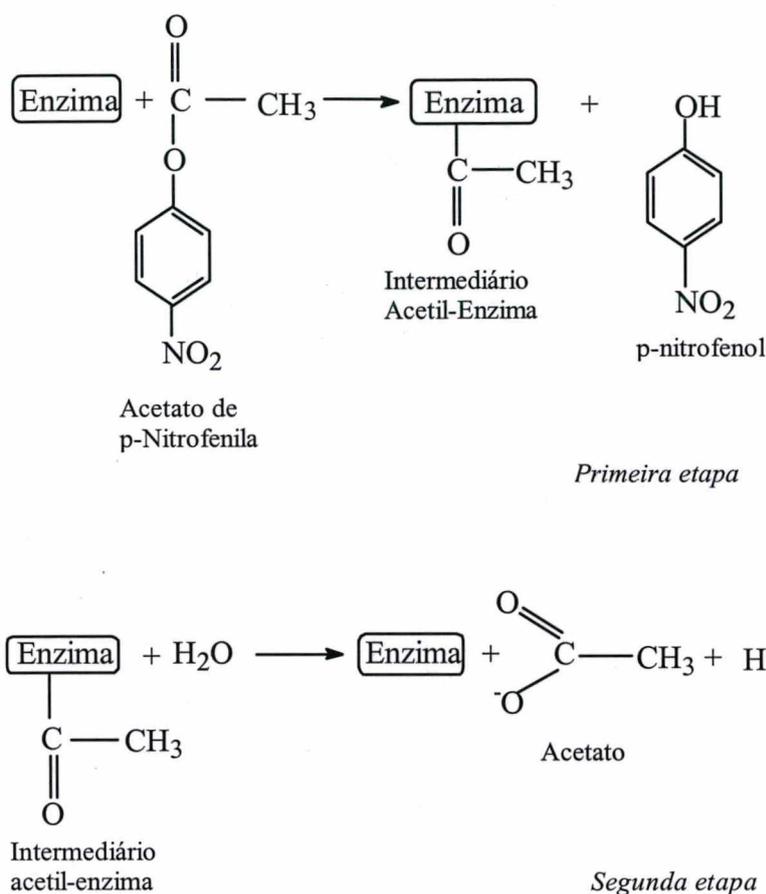


Figura 1.6 Hidrólise do acetato p-nitrofenila catalisada pela quimiotripsina.

Na primeira etapa, chamada de acilação, ocorre inicialmente uma produção rápida de p-nitrofenol que corresponde à formação de um intermediário covalente acetil-enzima, no qual o componente carboxílico do substrato é esterificado com a hidroxila da serina 195. A propriedade nucleofílica do -OH da serina é aumentada pela histidina 57, que aceita um próton da serina, quando esta ataca o carbono carbonílico do substrato. A histidina resultante com carga positiva é estabilizada pela interação eletrostática com a carga negativa do aspartato 102.^{1,5,7,14} Na segunda etapa, chamada desacilação, ocorre a hidrólise do intermediário acetil-enzima, e esta é muito mais lenta que a primeira, ou seja é a reversa, com H₂O substituindo o componente amínico.

Estudos cristalográficos de complexos com substratos análogos permitiram caracterizar a conformação da tríade catalítica formada pela serina, histidina e aspartato (**Figura 1.7**).⁵

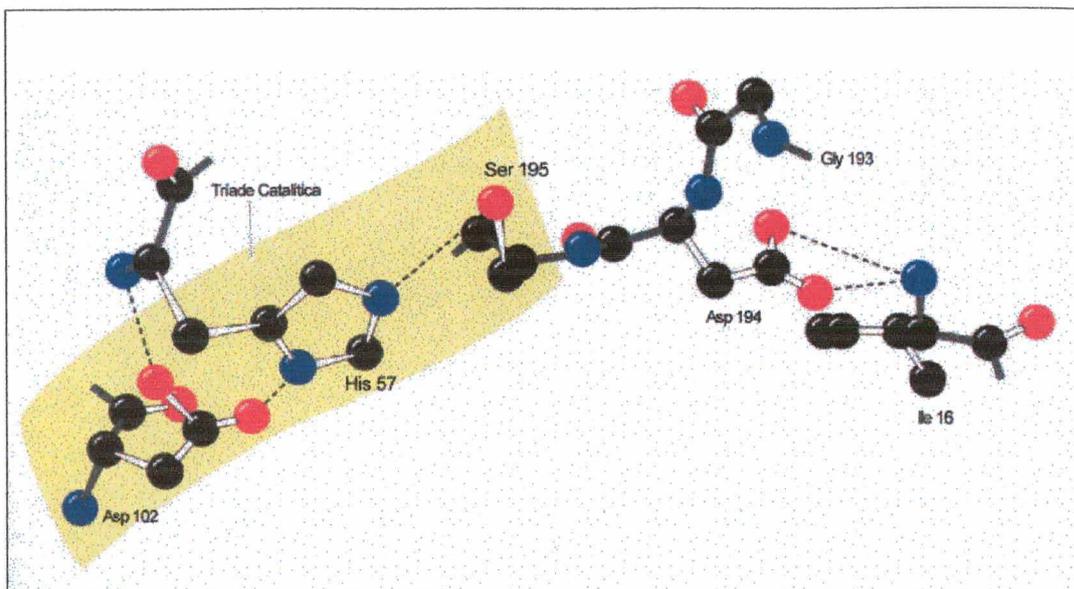
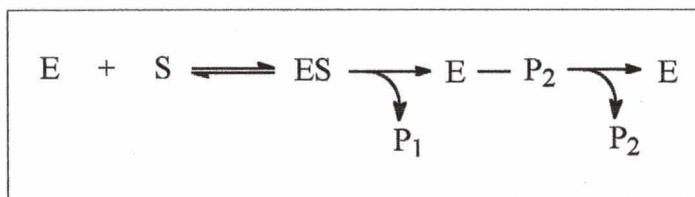


Figura 1.7 Conformação da tríade catalítica serina-histidina-aspartato na quimiotripsina.⁵

O mecanismo catalítico da quimiotripsina pode ser representado pelo **Esquema 2**, no qual P_1 é o componente amina (ou álcool) do substrato, $E-P_2$ é o intermediário covalente, acetil-enzima, e P_2 é o componente ácido do substrato.



(Esq. II)

1.2 ENZIMÁTICA EM MEIO ORGÂNICO

Enzimas em meio aquoso foram extensivamente utilizadas em processos catalíticos, tanto na área tecnológica como científica por vários anos.^{15,16} Porém, seu uso tornou-se limitado, pelo fato de muitos substratos serem pouco solúveis em água, necessitando de grande volume reacional e procedimentos de separação mais complicados.

O uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas superou este problema, e o desenvolvimento de novos métodos permitiu que várias reações pudessem se tornar viáveis.^{15,17-24} A adição de uma quantidade moderada de solvente orgânico, é uma forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar possível a reação. Tanto solventes miscíveis e os imiscíveis em água podem ser usados, sendo que no caso de solventes imiscíveis ocorre a formação de um sistema de duas fases. As enzimas e outras substâncias hidrofílicas estão presentes na fase aquosa, enquanto os substratos e produtos hidrofóbicos, estão na fase orgânica. Para que a bioconversão possa ocorrer, é necessário que o substrato seja transferido para a fase aquosa onde encontra-se a enzima. Após a reação, os produtos, quando hidrofóbicos, são completamente transferidos para a fase orgânica (**Figura 1.8**).¹⁶

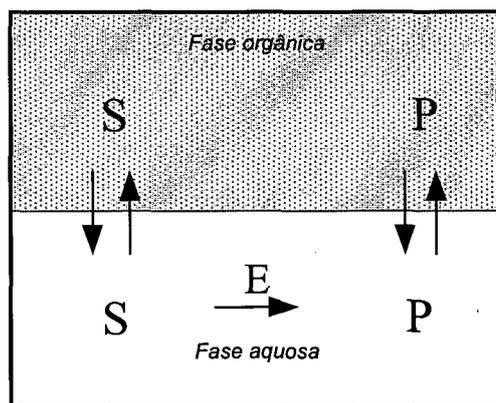


Figura 1.8 Apresentação esquemática da conversão enzimática em sistema de duas fases. S = Substrato, P = Produto, E = Enzima.

O uso da biocatálise em meio orgânico apresenta uma série de vantagens. Algumas destas foram apresentadas por Kvittinger,²⁰ conforme mostrado a seguir:

- Aumento da solubilidade de substratos e produtos hidrofóbicos;
- Aumento da estabilidade da biocatálise;
- Possibilidade de realizar reações sintéticas;
- Redução de reações colaterais não desejáveis causadas pela água;
- Facilidade de interagir com outras etapas químicas.

1.2.1 Métodos usados para catálise enzimática em meio orgânico

Existe uma série de métodos que foram desenvolvidos, que utilizam a catálise enzimática em meio orgânico. Estes métodos podem ser divididos em dois grandes grupos.¹⁶

A. Preparações de enzimas sólidas. Dentro deste grupo tem-se:

1. Enzimas liofilizadas em pó ou em cristais.²⁵
2. Enzimas imobilizadas ou suportadas. Nesta metodologia normalmente não é necessário que haja a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte. Uma das formas de imobilizar enzimas para uso em meio orgânico, é inicialmente solubilizar em meio aquoso e misturar ao suporte, e em seguida remover a água. Devido a grande aplicabilidade, existe uma variedade muito grande de suportes sólidos utilizados, tais como:
 - a) suportes inorgânicos: terra de diatomácea calcinada,²⁶ sílica gel ou alumina²⁷ e crisotila,^{28,29}
 - b) polímeros sintéticos: polieteno e polipropeno,²⁷ poliestireno,^{22,30} monometoxipolietileno glicol,³¹
 - c) misturas de alginato de cálcio e silicone,³²
 - d) suportes polissacarídeos: quitina.³³

B. Preparações de enzimas solubilizadas. Neste grupo tem-se:

1. Enzimas solúveis modificadas covalentemente em meio orgânico. Elas podem ser covalentemente modificadas para tornarem-se solúveis em meio orgânico.
 - a) modificações com polietileno glicol,^{34,35}
 - b) modificações com poliestireno,³⁶
 - c) modificações com poliacrilatos,³⁷
 - d) outros métodos com modificações covalentes. Vários grupos hidrofóbicos foram usados para tornar as enzimas mais susceptíveis para catálise em

meio orgânico. Por exemplo: dinitrofluorobenzeno, cloreto de palmitoil, acetaldeído, octaldeído e etc.³⁷⁻⁴⁰

2. Complexos não covalentes, solúveis em meio orgânico.
 - a) complexos enzima-surfactante. Enzimas podem ser dissolvidas em meio orgânico usando surfactantes como agentes solubilizantes, tais como: glutamato de didodecil glicosila⁴¹ e glutamato de dioleil ribitila,⁴²
 - b) complexos enzima-polímero. Alguns polímeros foram usados para formar complexos, tornando-as solúveis, como por exemplo: etilcelulose,⁴³ poli(etilenoimina) alquilado,⁴⁴
 - c) surfactante recobrando nanogranulos.^{16,45}
3. Enzimas em microemulsão. Outra forma de usar enzimas em meio orgânico é dissolvê-las previamente em uma quantidade pequena de água e depois solubilizá-las em microemulsões. Inúmeros são os trabalhos publicados usando este sistema.^{17,23,46-56}
4. Enzimas em organo-gel. Este sistema é formado pela solubilização de gelatina em microemulsões do tipo água/óleo, até obter um gel transparente, cuja rigidez é determinada pela quantidade de gelatina adicionada.¹⁵ Os grupos dos professores Robinson (UK)^{15,57-61} e Nascimento (UFSC)^{15,58,62-69} tem estudado extensivamente o uso deste sistema para imobilizar enzimas e utilizá-lo na catálise enzimática em meio orgânico.

Em todos sistemas biocatalíticos contendo solventes, a atividade catalítica e a estabilidade da enzima é influenciada pela natureza destes solventes. A polaridade do solvente é extremamente importante. Uma diminuição da constante dielétrica do meio, leva a um aumento da interação eletrostática entre os resíduos carregados da enzima, o que pode levar a uma diminuição de sua flexibilidade, acompanhada pela redução da atividade catalítica. Por outro lado, a alta polaridade do sítio ativo da enzima, tem sido sugerido como um fator importante para o aumento da atividade catalítica. A mudança na constante dielétrica também altera o valor do pK para todos os resíduos tituláveis na superfície da proteína. Tais mudanças, no sítio ativo ou perto dele, podem mudar a ligação e/ou a conversão dos substratos. Se a mudança da constante dielétrica for muito drástica, esta pode afetar a estrutura tridimensional da enzima.

A presença de um solvente orgânico sempre constitui um risco para a inativação da enzima. A maneira de como ocorre a interação dos solventes orgânicos com a molécula da enzima, e a influência que estes exercem sobre sua estabilidade não está bem clara. Quando solventes miscíveis em água são adicionados em concentrações moderadas, não são observados efeitos negativos para enzima. Entretanto, quando grandes quantidades são necessárias para dissolver o substrato, isto pode levar à inativação da mesma. O grau de inativação depende do solvente usado e para cada solvente a velocidade da inativação pode ocorrer abruptamente com a diminuição da concentração de água abaixo de um certo valor.^{16,70}

A tendência dos solventes de inativarem as enzimas, não depende unicamente da hidrofobicidade. Outras características físico-químicas são importantes, tais como: a habilidade de solvatação e a geometria molecular.⁷¹

Para a preparação de enzimas sólidas normalmente pode-se usar uma grande variedade de solventes, o que permite a otimização da escolha em relação à atividade e estabilidade. No entanto, a escolha do solvente em sistemas que usam enzimas solubilizadas em meio orgânico é muitas vezes mais restrita. Enzimas modificadas covalentemente com polietileno glicol mostram boa solubilidade, principalmente em hidrocarbonetos aromáticos e clorados. Hidrocarbonetos aromáticos são também bons solventes para a formação de complexos enzima-polímero. Para a obtenção de microemulsões são usados uma variedade muito grande de solventes. No entanto, os hidrocarbonetos são os solventes orgânicos mais usados para preparação de microemulsões contendo enzimas.¹⁶

O conteúdo de água é outro fator que pode influenciar nas reações enzimáticas em meio orgânico. A água provavelmente ativa a enzima pelo aumento da flexibilidade interna. A adição de água acima do conteúdo ótimo, pode causar uma diminuição na atividade enzimática. Contudo, ela também pode atuar como substrato em reações enzimáticas, especialmente em reações como as hidrolíticas, que resulta em reações laterais e com baixo rendimento de produto.

Em sistemas de microemulsão do tipo água/óleo, contendo micelas reversas, a razão molar entre a água e o surfactante é muitas vezes usado como uma medida para quantificar a água. Esta razão determina o tamanho das micelas, que por sua vez governa a atividade catalítica da enzima. Normalmente a atividade máxima é obtida quando o tamanho das micelas é igual ao tamanho da molécula de enzima.¹⁶

1.2.2 Enzimas em microemulsão

O termo microemulsão foi definido por Danielsson e Lindmann como um sistema de fases simples de água, óleo (solvente orgânico) e surfactante, que forma uma solução líquida opticamente isotrópica e termodinamicamente estável. Esta definição, porém, não é aceita universalmente, e muitos pesquisadores preferem usar o termo microemulsão como gotículas muito pequenas em um meio, desde que o seu tamanho seja da ordem de nanômetros (nm). Os solventes orgânicos mais usados nestes sistemas são os hidrocarbonetos.^{58,59}

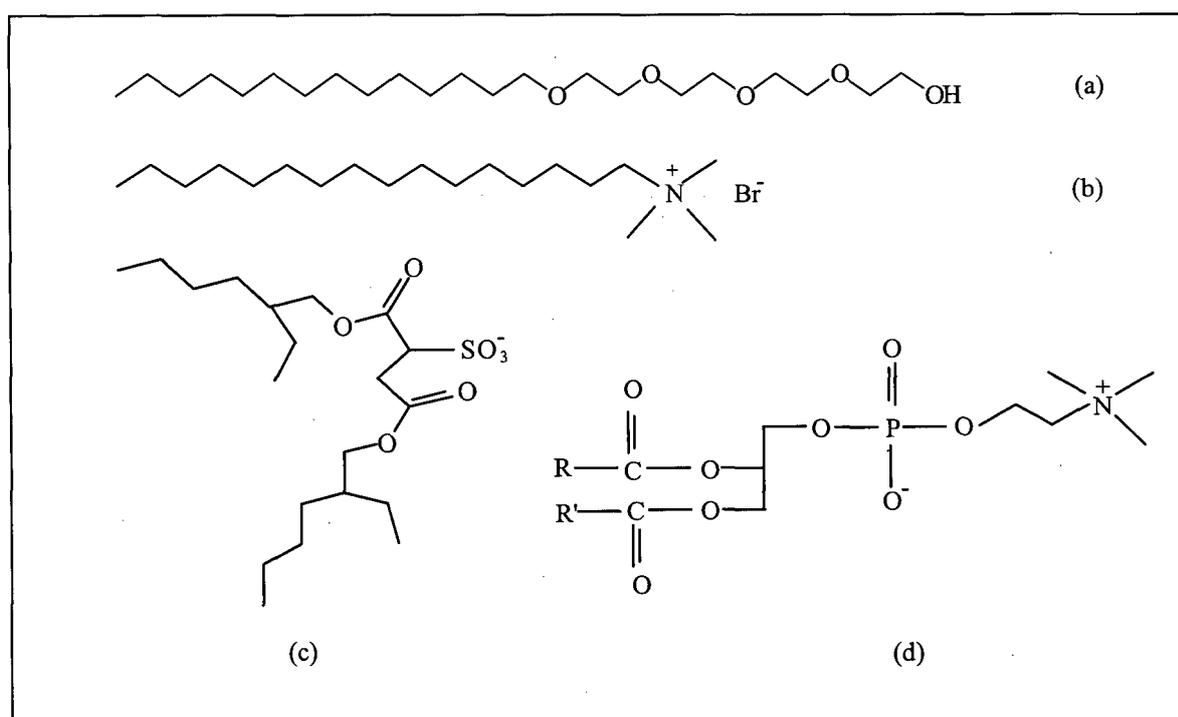


Figura 1.9 Fórmulas estruturais de surfactantes neutro, catiônicos, aniônicos e anfótero. (a) $C_{12}E_4$ (tetraetilenoglicolmono-n-dodeciléter); (b) CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio); (c) AOT (di-2-etilhexil-sulfosuccinato de sódio) e (d) SbPC (lecitina de soja contendo a fosfatidilcolina).

Surfactantes são também chamados de agentes tensoativos. Apresentam na estrutura molecular uma região hidrofóbica ou cauda, que é uma longa cadeia de hidrocarbonetos variando de 8 a 18 átomos de carbono, e uma região hidrofílica ou cabeça, que é polar ou iônica. As moléculas de surfactante são em geral de natureza anfifílica, isto é, interagem com a água e com moléculas apolares. De acordo com a natureza da região

hidrofílica, um surfactante pode ser classificado como aniônico, catiônico, neutro e anfótero (**Figura 1.9**).

Cosurfactantes como, álcoois, ácidos graxos e monoglicerídeos, podem ser usados para ajustar o BHL (Balanço Hidrofílico-Lipofílico) de surfactantes iônicos.⁷²

As microemulsões podem ser divididas em dois tipos: microemulsão do tipo óleo em água (o/a) e microemulsão do tipo água em óleo (a/o).

Na escala microscópica, microemulsões são estruturas formadas por microgotas aquosas ou oleosas estabilizadas por uma monocamada de surfactante na interface (**Figura 1.10**).⁵⁹

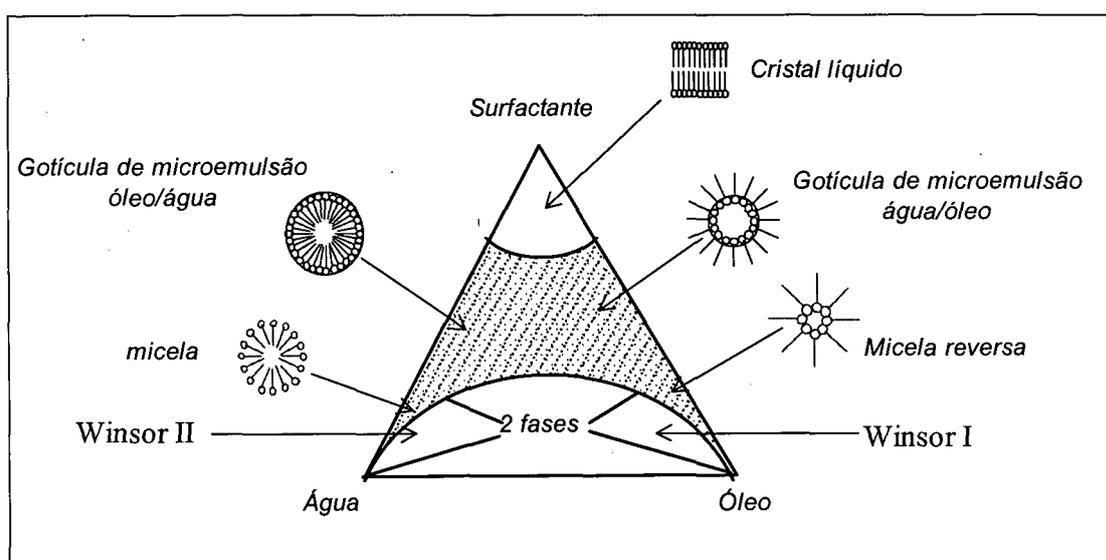


Figura 1.10 Diagrama de fases para sistemas água/óleo/surfactante. A região escura representa o domínio da microemulsão.⁵⁹

Quando as microgotas em sistemas água/óleo são muito pequenas, são chamadas de micelas reversas. Nas microgotas aquosas, enzimas podem ser solubilizadas com alta retenção de atividade e especificidade catalítica. Numerosos estudos de catálise enzimática tem sido realizados em microemulsão, predominantemente em sistemas contendo micelas reversas.^{49,59}

1.2.3 Micela reversa

O termo micela reversa, normalmente é usado para definir pequenos agregados,

que são formados a partir de um sistema do tipo água/óleo (**Figura 1.11**), com razão molar da água e surfactante menor ou igual a 15. Esta razão é geralmente definida em termos do parâmetro W_o ou R , como a razão entre a molaridade da água e a do surfactante, isto é, $W_o = [\text{H}_2\text{O}] / [\text{S}]$, onde S é o surfactante. Os agregados são gotículas muito pequenas esféricas (raio = 1-10 nm), envolvidas pelo surfactante na interface.^{73,59}

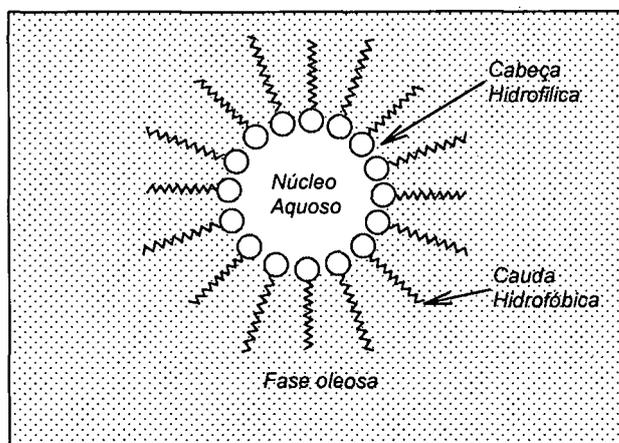


Figura 1.11 Representação esquemática da micela reversa.

Enzimas podem ser solubilizadas em sistemas de micela reversa mantendo sua atividade catalítica.⁷³⁻⁷⁶

1.2.4 Solubilização de enzimas em soluções micelares

A literatura cita três técnicas mais usadas para a solubilização de enzimas em soluções micelares: o método de transferência,^{77,78,79,80,81,82} o método de injeção^{51,83,49,84, 85} e o método de proteínas insolúveis em água ou de transferência de estado sólido,^{86,87} (**Figura 1.12**).⁸⁸

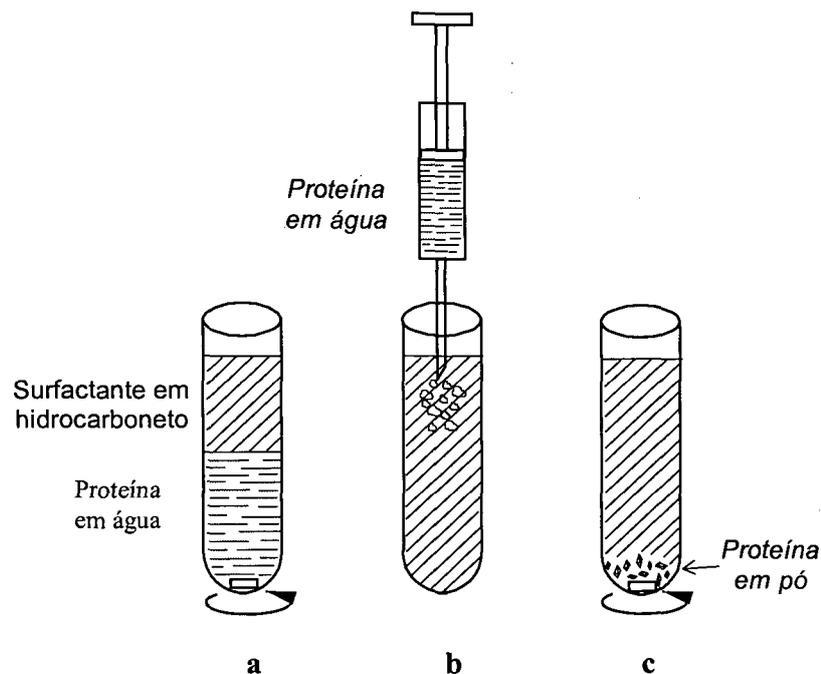


Figura 1.12 Três métodos utilizados para solubilização de proteínas em micelas reversas: a) método de transferência; b) método de injeção; c) método para proteínas insolúveis em água.

No processo de transferência se requer a formação do sistema Winsor II, que consiste de um sistema de duas fases, a fase aquosa e a orgânica contendo o surfactante. Espécies hidrofílicas como aminoácidos e proteínas que são facilmente solubilizadas em meio aquoso são transferidas para dentro da fase orgânica com o surfactante. Durante este processo de transferência, conhecida na literatura como “forward transfer” ou transferência direta (Figura 1.13)⁷⁸, a molécula de enzima presente na fase aquosa sai por difusão para interface devido ao aumento da hidrofobicidade.^{78,86} Na interface, a enzima é encapsulada com uma camada de molécula de surfactante formando assim a micela reversa preenchida com a enzima. Este método também é usado para transferir proteínas contidas na micela reversa para uma segunda fase aquosa ou “fase aquosa receptora”. Este processo é conhecido na literatura como “back transfer” ou transferência reversa.

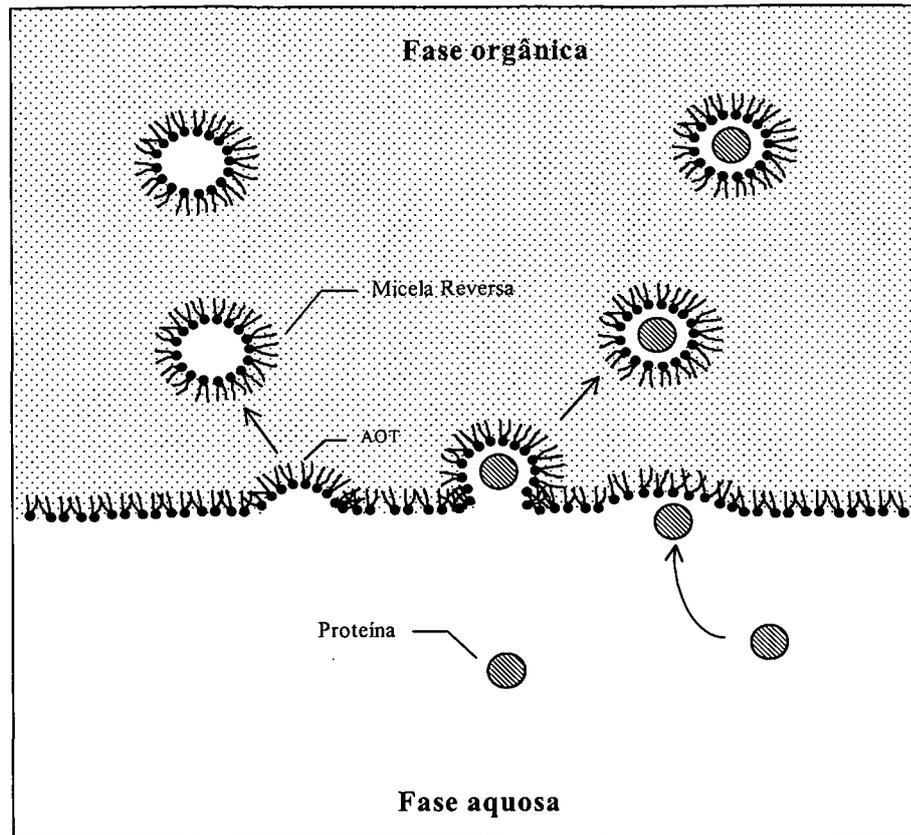


Figura 1.13 Representação esquemática do processo de transferência direta de proteínas da fase aquosa para a fase orgânica com surfactante - Método de Transferência.

A solubilidade de enzimas no sistema micelar depende do pH, força iônica, tipos de íons presente na fase aquosa, surfactante, cosurfactante, solvente orgânico, temperatura e propriedades da enzima.^{77,88,89}

No método de injeção, uma quantidade conhecida de enzima é solubilizada primeiramente em meio aquoso, e então microvolumes dessa solução são injetados na solução de surfactante em meio orgânico. A concentração de enzima, e a concentração de água, W_o , são facilmente manipuladas.

O terceiro método (**Figura 1.12c**), o de transferência de estado sólido, é usado para solubilizar proteínas sólidas diretamente na solução micelar. A proteína em pó é suspensa na solução micelar que contém uma certa quantidade de água, e através da agitação contínua e fraca a enzima é levada para dentro da micela reversa.^{73,86,89} Proteínas na forma de pó quando suspensas em solução micelar orientam-se para dentro da micela

reversa, devido à sua afinidade com a água e também devido às interações eletrostáticas das biomoléculas e o grupo cabeça do surfactante.^{73,86}

1.2.5 Fatores que influenciam na transferência ou extração de compostos biologicamente ativos

A solubilização de compostos biologicamente ativos, tais como proteínas e enzimas, em micela reversa, pode ser manipulada variando o pH, força iônica, surfactante, cosurfactante, solvente orgânico, pressão e temperatura. Muitos trabalhos tem focado seus estudos na interação eletrostática entre proteína e surfactante, através da variação do pH e/ou força iônica. O pH e a força iônica também são dois fatores importantes na extração reversa da proteína da microemulsão água/óleo para uma fase aquosa receptora.^{81,90}

Para surfactantes aniônicos como AOT (di-2-etilhexil-sulfosuccinato de sódio), proteínas são transferidas aumentando o pH, pois quando, carregada negativamente, é repelida pela cabeça do surfactante (negativo). A transferência reversa da proteína do sistema micelar para uma fase aquosa, pode ser realizada através do aumento da força iônica, para evitar as interações com o grupo cabeça do surfactante.⁹⁰

De modo geral, a transferência de proteína da gotícula da micela reversa para uma fase aquosa receptora é manipulada através da mudança de pH em relação ao ponto isoelétrico* (pI) da enzima. Quando o pH da fase aquosa for maior que o pI da enzima, a mesma estará carregada por um sistema de cargas negativas. Em pH menor que o pI, a enzima estará carregada positivamente. Na presença de surfactantes aniônicos, onde o grupo cabeça é carregado negativamente, a enzima carregada por um sistema de cargas negativas é facilmente expelida do sistema micelar, enquanto que se for carregada positivamente esta interage com a interface da micela reversa, dificultando a sua saída das gotículas (**Figura 1.14**).

* pI = ponto isoelétrico, que é definido como o pH em que o número de cargas positivas e negativas na molécula são iguais¹

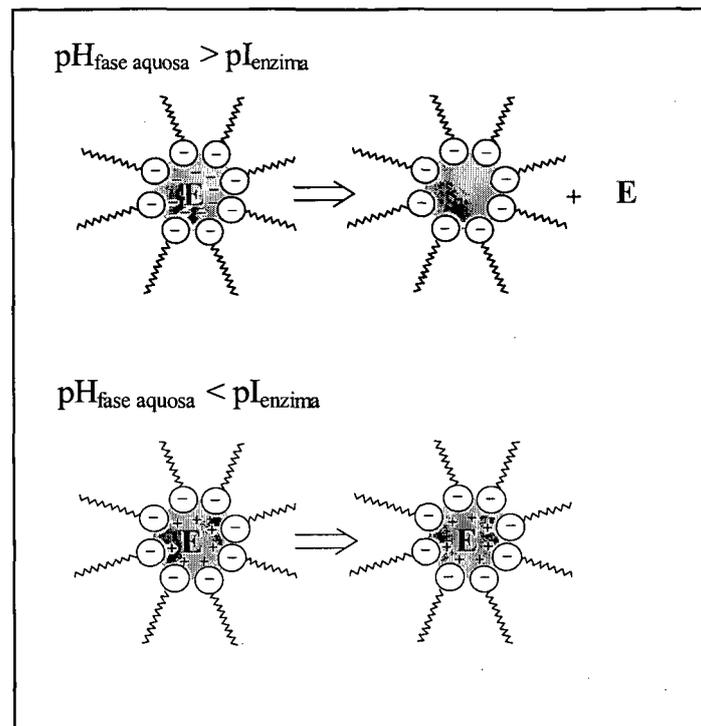


Figura 1.14 Representação esquemática da extração de enzimas de micelas reversas formadas por um surfactante aniônico para uma fase aquosa receptora, manipulando o pH em relação ao pI da enzima.

Quando a força iônica da fases aquosa do sistema micelar de AOT é aumentada, ocorre uma proteção da carga do grupo cabeça do surfactante que, por sua vez, inibe a interação entre a proteína solubilizada e a interface das gotículas de micela reversa.⁹⁰

A adição de alcanos como o 1-butanol, tem sido usada para facilitar a transferência da α -CT da microemulsão do tipo água/óleo. O 1-butanol se aproxima da interface, e em grandes quantidades pode romper as interações hidrofóbicas existentes entre a proteína e o surfactante, levando a liberação da proteína. Álcoois são conhecidos por reduzir as interações hidrofóbicas entre proteínas e superfícies hidrofóbicas. O uso de cosurfactantes, como Rewopal HV5 ($C_5H_{19} - C_6H_4 - O - (C_2H_4 - O)_5 - H$) na solução micelar, aumenta a transferência de enzima (α -amilase) da fase aquosa para a micela reversa e o conteúdo de água na fase orgânica. O Rewopal possui uma superfície ativa, formada pelo grupo cabeça pentaetoxilato. O conteúdo de água aumenta, com o número de etoxilatos. O efeito da densidade da carga na interface da micela reversa pode ser outro fator que facilita a transferência da enzima.^{87,91} A adição de cosurfactantes (octil glicosídeo, lecitina e lisolecitina), também aumenta a transferência direta de proteínas para dentro da micela reversa, através da associação com o sítio de ligação da proteína.⁹²

Outra técnica usada na transferência de proteína, é a adição de um segundo solvente orgânico por exemplo, acetato de etila e etanol que desestabiliza a micela reversa e libera a proteína solubilizada para o sistema micelar.⁹³

Phillips e col.⁹⁴ descreveram um método de extração de proteínas, onde a solução micelar foi pressurizada com etileno com objetivo de converter a fração de água micelar para o hidrato clatrato, que é uma estrutura rígida de água, onde a água fica extremamente organizada ao redor do etileno. A perda da água da micela leva à precipitação da proteína em forma sólida. Neste caso, não é requerido um ajuste de pH e ou força iônica. Hidrato de clatrato, ou gás de hidrato como também são chamados, são inclusões cristalinas de gás e água, formadas quando a água está em contato com um gás sob condições termodinâmicas apropriadas de temperatura e pressão. A molécula de gás se encaixa dentro da cavidade do hidrato, e estabiliza a estrutura cristalina através da interação de Van der Waals com a molécula receptora de água.⁸³

A temperatura é outro fator que pode influenciar na transferência ou extração reversa de proteínas para uma fase aquosa receptora. Dekker e col.⁹⁵ aumentaram a temperatura da solução micelar (surfactante não iônico), e observaram a formação de uma fase mais concentrada de água e proteína, facilitando a extração.

Leser e col. em 1993⁷⁹ usaram sílica gel para extração de enzimas de sistemas micelares. A sílica gel foi colocada em contato com a solução de micela reversa onde a água, a proteína e o surfactante foram adsorvidos nas partículas de sílica. A recuperação final da proteína é obtida lavando as partículas de sílica com uma solução aquosa. O processo de retirar a enzima da sílica é dependente do pH e da força iônica da solução aquosa. Neste processo tem-se a desvantagem de ficar retida na sílica uma grande quantidade de surfactante.

O procedimento de desidratação em si mesmo, poderá servir para aumentar a força iônica no centro da gotícula, e conseqüentemente poderá ocorrer uma mudança moderada do pH e em sua volta. O citocromo c, a α -quimiotripsina e a α -amilase são proteínas que foram recuperadas através do ajuste de pH e /ou força iônica.^{59,90}

Gupta e col. estudaram a precipitação de proteínas e amino ácidos (α -quimiotripsina, citocromo c e triptofano) através da desidratação da microemulsão água/óleo usando peneira molecular.⁹⁰

Carlile e col.⁹⁶, estudaram o efeito da concentração de água (W_0) na atividade enzimática e também na extração da enzima desidratando o sistema micelar de AOT

contendo lipase de *Chromobacterium viscosum* (CV lipase) usando peneira molecular e fase vapor de LiCl. Eles observaram que em concentrações muito baixas de água ($W_o < 1$) a CV lipase perde a atividade permanecendo em estado “dormente”, e após a reidratação, a enzima recupera a atividade. No entanto não foi observado a formação de precipitado branco, conforme observado por Gupta e col.⁹⁰ Isto sugere que a CV lipase pode ser absorvida pela peneira molecular junto com o surfactante AOT. A obtenção destes sistemas micelares desidratados ($W_o < 1$), onde a enzima permanece praticamente sem atividade, pode ser tecnologicamente muito interessante na obtenção de aromas de compostos instáveis. O sistema micelar contendo a enzima pode ser reidratado com adição seletiva de água para reativar a enzima.⁹⁶

O termo enzimas “dormentes” foi utilizado pelo Prof. B.H. Robinson da School of Chemical Sciences da University of East Anglia, Norwich, UK (Reino Unido), devido à possibilidade de reativar a enzima com nova adição de água.⁹⁶

1.2.6 Propriedades cinéticas da α -quimiotripsina (α -CT) em sistemas micelares

Estudos de fluorescência e dicroísmo circular tem mostrado que as enzimas ficam retidas dentro da parte aquosa da microemulsão do tipo água/óleo.

Nos estudos realizados por Fletcher e col.⁴⁹ e por Barbaric e Luisi⁵¹ foi observado que as enzimas em sistemas micelares mantêm sua atividade catalítica, permitindo assim transformações de substratos lipofílicos, os quais são muito importantes do ponto de vista tecnológico.

Enzimas quando solubilizadas dentro das gotículas com um pequeno volume de água do sistema micelar, ficam protegidas devido à camada de surfactante que a recobre, impedindo a sua desnaturação pelo solvente orgânico, e permitindo assim novas possibilidades sintéticas.⁹⁷

Há várias questões concernentes à atividade enzimática e o meio no qual a enzima fica retida (centro da micela reversa). Barbaric e Luisi mostraram em seus estudos que as enzimas em solução micelar de hidrocarbonetos, sob certas condições, podem apresentar um número de renovação (k_{cat}) um pouco mais elevado que na solução aquosa. Outra questão de interesse geral se refere à natureza da mudança estrutural induzida na proteína

quando confinada na parte aquosa da micela reversa. Mudanças de conformação na cadeia principal podem ocorrer sem prejudicar a atividade enzimática.⁴⁹

Estudos realizados com a α -quimiotripsina (α -CT) em micela reversa, variando-se o tipo de substrato (de diferentes cargas e polaridade) e o surfactante (aniônico, catiônico e não iônico) tem sido realizados para avaliar a atividade enzimática. A ação catalítica da α -CT em microemulsão do tipo água/óleo tem sido estudada detalhadamente por Fletcher e col^{49,50,51} (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 Parâmetros cinéticos da hidrólise do N-trans-cinamoilimidazol catalisada pela α -CT, em microemulsão de AOT. Temperatura: $(25,3 \pm 0,4)^\circ\text{C}$.^(a)

W_0	$k_{\text{cat}} (10^{-3} \text{ s}^{-1})$	$K_M (10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3})$
5,6	20 ± 4	3200 ± 800
11,1	$12,5 \pm 2$	700 ± 150
27,8	10 ± 1	150 ± 30
água	$8,5 \pm 1$	2 ± 1

(a) Dados da referência 49

Neste estudo, eles concluíram que:

- Os valores da constante catalítica, k_{cat} , em microemulsão são similares aos medidos em sistemas aquosos ocorrendo uma ligeira variação da mesma com a concentração de água (W_0). Aumentando-se a concentração da água no sistema de microemulsão, os valores da k_{cat} aproximam-se aos valores do sistema aquoso.
- A maior variação foi observada na constante de Michaelis (K_M) pois os valores de K_M em sistemas de microemulsão são muito maiores que no sistema aquoso. É importante notar que em todos os sistemas micelares estudados por Fletcher e col., os valores de K_M foram muito maiores do que em sistemas aquosos

A constante de Michaelis teve um aumento na ordem de 100 vezes para N-trans-cinamoilimidazol em microemulsão de AOT. Aumentos similares foram observados para reação de hidrólise do N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GPNA) e N-acetiltryptofano metil éster (ATME), catalisadas pela α -CT. Em microemulsão de brometo de

hexadeciltrimetilamônio (CTAB) o aumento na K_M foi aproximadamente de 500 a 1000 vezes para ATME. Para a microemulsão formada por dodecil sulfato de sódio (SDS) contendo pentanol como co-surfactante, a K_M teve um aumento de 1000 vezes para o GPNA. Em microemulsão com o surfactantes não iônico éter dodecil glicol tetraetileno ($C_{12}E_4$), o aumento na K_M foi de 100 vezes maior para o GPNA. Em todas as microemulsões estudadas, o valor de K_M foi ligeiramente influenciado pela concentração de água (W_o). Para W_o menores, a constante de Michaelis tende a aumentar. O valor de K_M em sistema micelar se refere à concentração de substrato relativa ao volume da pseudo-fase aquosa no qual o substrato se localiza, K_M é expresso em mol/dm³ de água.

Estas medidas mostram que é mais difícil para a enzima formar um complexo com o substrato na microemulsão do que no sistema aquoso. Entretanto, a velocidade total de reação, é similar em ambos os sistemas devido ao aumento da concentração, uma vez que enzima e o substrato, estão localizados na parte aquosa da micela reversa.⁸¹

Os valores elevados de K_M em sistemas micelares, poderiam estar relacionados com a conformação que a enzima assume dentro da micela reversa, mudando a afinidade pelo substrato. Porém, esta explicação não é totalmente aceita, devido as seguintes razões, os valores de k_{cat} no sistema micelar mudam muito pouco em relação ao sistema aquoso; e poucas mudanças foram observadas nos parâmetros de ativação: ΔH_{cat} e ΔS_{cat} .⁴⁹ Nas medidas espectrofotométricas realizadas por Barbaric e Luisi⁵¹ e por Menger e Yamada,⁹⁸ foram observadas mudanças mínimas na estrutura secundária da enzima em sistema micelar de AOT, e a estrutura terciária não foi afetada.

Uma outra possibilidade é que a mudança no valor de K_M se deve ao substrato não estar uniformemente distribuído por toda pseudo-fase aquosa. Isso pode ser, porque o substrato prefere as gotículas vazias, ao invés das gotículas com a enzima, ou ainda o substrato e a enzima podem ocupar diferentes posições dentro da gotícula.

Outra explicação para o aumento do valor de K_M para sistemas micelares é dada por Martinek e col., que sugerem que isto se deve ao surgimento das interações eletrostáticas entre os substratos carregados e a camada de surfactante também carregada, que envolve a gotícula de água.⁹⁹

Fletcher e col.⁴⁹ mostraram em seus estudos que o aumento no valor de K_M em sistemas micelares poderia estar relacionado na interação do surfactante com a α -CT, competindo assim, com o substrato pela ligação do sítio ativo da α -CT. Eles verificaram que o valor de K_M varia de acordo com o surfactante, e constataram que as medidas de K_M

em meio aquoso são: \ll micela reversa de AOT \approx micela reversa de $C_{12}E_4$ $<$ micela reversa de CTAB \approx micela reversa de dodecilsulfato de sódio (SDS). Para apoiar esta hipótese, eles verificaram que em soluções aquosas com baixas concentrações de AOT e de $C_{12}E_4$ houve um efeito inibidor da α -CT, devido à competição do surfactante com substrato pelo sítio ativo da α -CT.

1.3 OBJETIVOS

Com base no foi anteriormente exposto, este trabalho tem os seguintes objetivos:

- Avaliar o método usado por Barros e Cabral¹⁰⁰, e por Pires e col.¹⁰¹ para a transferência reversa de proteínas em sistemas micelares, com a posterior determinação da concentração de proteína, usando diferentes surfactantes: AOT (di-2-etilhexil-sulfosuccinato de sódio), SbPC (lecitina de soja contendo a fosfatidilcolina), $C_{12}E_4$ (tetraetilenoglicolmono-n-dodeciléter) e CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). O método está baseado na transferência da enzima da micela reversa para uma segunda fase aquosa receptora, com posterior aplicação do método de Lowry,¹⁰² para a determinação da concentração protéica.
- “Imobilizar” a α -CT em sistema de micela reversa.
- Desidratar a solução de micela reversa, usando o método de equilíbrio da fase vapor da solução micelar e LiCl umedecido em sistema hermeticamente fechado. A remoção da água é acompanhada pelo método de Karl Fischer e a concentração protéica é determinada por espectrofotometria de absorção na região UV a 280nm.
- Avaliar a atividade catalítica da α -CT no sistema micelar durante o processo de desidratação, e após a reidratação do sistema micelar, através da reação de hidrólise do N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GPNA).
- Manter a enzima em estado “dormente” (sem atividade catalítica) através da desidratação, reduzindo a concentração de água até obter um $W_0 < 1$, e em seguida recuperar a atividade catalítica pela reidratação do sistema de micela reversa.
- Determinar a quantidade de enzima precipitada e recuperada durante a desidratação, em função do pH e da concentração de água (W_0).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados na parte experimental foram: heptano-UV/HPLC do Grupo Química, di-2-etilhexil-sulfosuccinato de sódio - AOT, brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB, lecitina de soja contendo 48% fosfatidilcolina - SbPC, N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida - GPNA*, α -quimiotripsina - α -CT do Pâncreas Bovino tipo II (PM = 24800) e soro albumina bovina - BSA da Sigma, tetraetilenoglicolmono-n-dodeciléter (C₁₂E₄) da Nikkol, glicina da Ajinomoto e cloreto de lítio da Vetec.

O kit para determinação de proteína pelo método de Lowry, procedimento n° 690 foi adquirido da Sigma, e é formado pelos reagentes de biureto (0,75 mmol/L de sulfato de cobre, 94 mmol/L hidróxido de sódio que também contém tartarato, iodo e carbonato) e o de Folin-Ciocalteu fenol.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrômetro UV-VIS da HEWLETT PACKARD 8452A.

A concentração de água contida no sistema micelar foi determinada através do método de Karl Fischer, com o titulador automático da Metrohm 684.

A concentração protéica no sistema micelar foi determinada pelo método usado por Aires-Barros e Cabral.¹⁰⁰ e Pires e col.¹⁰¹ com algumas modificações, e pelo método direto através das medidas de absorbância à 280 nm da solução de micela reversa contendo α -CT.

* GPNA - substrato padrão para α -CT.

2.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE MICELA REVERSA

2.2.1 Solução micelar de AOT com α -CT

A solução micelar foi preparada utilizando o método de injeção. Uma quantidade conhecida de solução aquosa de α -CT foi injetada com auxílio de microseringa na solução de AOT 0,2 M em heptano. A solução aquosa de α -CT foi preparada com tampão glicina 0,1 M em diferentes pH (a concentração inicial de α -CT na solução aquosa usada foi de $9,74 \times 10^{-4}$ M)

2.2.2 Solução micelar de AOT com GPNA

A solução micelar com o substrato GPNA foi preparada conforme descrito no item acima para α -CT. A solução aquosa de GPNA 0,01 M foi preparada com solução tampão de glicina 0,1 M em pH 9,8 e injetada na solução de AOT 0,2 M em heptano através de microseringa.

2.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Foi necessária a preparação prévia das curvas de calibração, visando quantificar a enzima presente na micela reversa durante o processo de desidratação, determinar a quantidade recuperada através deste processo, e testar o método de transferência da proteína usado por Aires-Barros e Cabral.¹⁰⁰ e Pires e col.¹⁰¹ As curvas de calibração de proteína foram preparadas em meio aquoso e de micela reversa. A quantificação da concentração protéica foi realizada através do método de Lowry usando o Kit da Sigma*.^{102,103,104} A proteína BSA foi usada como padrão para testar este método. A curva de calibração foi preparada conforme dados descritos na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 Concentrações de BSA, usadas na obtenção da curva de calibração em meio aquoso.

Tubos de ensaio n ^o	Proteína diluída (μL)	0,85% NaCl (μL)	[Proteína] (μg/mL)
1	0,0	200,0	0,0
2	50,0	150,0	25,0
3	100,0	100,0	50,0
4	150,0	50,0	75,0
5	200,0	0,0	100,0

Referência: catálogo da Sigma, procedimento n° 690.

A cada tubo foram adicionados 2,2 mL de reagente de biureto (0,75 mmol/L de sulfato de cobre, 94 mmol/L hidróxido de sódio que também contém tartarato, iodo e carbonato), agitado e mantido por 10 minutos em repouso sob temperatura ambiente (18 - 26°C). Em seguida foi adicionado 0,1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu fenol. Cada tubo foi imediatamente agitado, e mantido em repouso sob temperatura ambiente por 30 minutos. A solução foi transferida para uma cubeta e a absorbância lida a 750 nm, usando

* reagente de Biureto, reagente de Folin & Ciocalteu's Fenol e a proteína BSA - soro albumina bovina

uma solução sem enzima, como referência. A curva padrão de α -CT em solução aquosa foi preparada conforme a curva padrão de BSA, usando as mesmas concentrações.

As curvas de calibração da α -CT em meio de micela reversa foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Aires-Barros e Cabral¹⁰⁰, porém com algumas modificações que serão descritas a seguir.

Foram preparadas 5 sistemas de micelas reversas com $W_o = 10$, contendo 0,2 M de AOT em heptano com α -CT. As concentrações de α -CT do sistema micelar variaram de 0,0 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, conforme dados mostrados na **Tabela 2.1**, referente a BSA em meio aquoso.

2.4 EXTRAÇÃO DA ENZIMA

A extração da enzima contida na micela reversa para a fase aquosa (transferência reversa) foi realizada da seguinte maneira: 500 μL da micela reversa (m.r.) com a enzima foram transferidos para pequenos frascos, contendo 500 μL de NaOH, 0,10 M e com 2,5% (v/v) de etanol. O etanol foi adicionado para melhorar a extração da proteína da fase micelar para a fase aquosa de NaOH.¹⁰⁰ Os frascos com as duas fases foram agitados em agitador do tipo Vortex e centrifugados de 2500 a 4000 rpm por 20 e 25 minutos. Para solução micelar de SbPC foram usados 1000 μL da micela reversa para 1000 μL de solução receptora de NaOH, 0,10 M e com 2,5% (v/v) de etanol. Após a agitação do frasco contendo as duas fases, foram centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos. Tanto para a solução micelar de AOT como para a SbPC, a separação completa das duas fases ocorreu somente após os frascos permanecerem em repouso por 24 horas. A seguir, foram removidos cuidadosamente 200 μL da fase aquosa para um tubo de ensaio e adicionados os reagentes de Lowry. A absorbância da fase aquosa com enzima e os reagentes de Lowry foi lida a 750 nm (**Figura 2.1**).

A diferença deste método para o de Aires-Barros e Cabral¹⁰⁰ está na etapa de adição dos reagentes de Lowry. Aires-Barros e Cabral adicionaram os reagentes antes da separação das duas fases.

Foi realizado uma série de experimentos controle, para avaliar o tempo de agitação, no Vortex, necessário para ocorrer a transferência da proteína da fase micelar de AOT ou SbPC para a fase aquosa receptora de NaOH 0,1 M e etanol.

Outros experimentos foram realizados usando diferentes surfactantes, a fim de verificar a extensão da aplicabilidade do método usado por Aires-Barros e Cabral. Os surfactantes estudados foram:

1. Surfactante catiônico: 0,20 M de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) em clorofórmio (CHCl_3): heptano (1:1).
2. Surfactante não aniônico: 0,20 M de éter tetraetilenoglicolmono-n-dodecila (C_{12}E_4) em heptano.
3. Biosurfactante aniônico (zwitteriônico): 0,20 M de lecitina de soja contendo fosfatidilcolina (SbPC) de soja não purificada em heptano.

Uma série de cinco soluções de micela reversa foram preparadas para cada sistema, todos contendo 2,0 M de água, correspondendo a um $W_o = 10$. As concentrações e os procedimentos usados na transferência da proteína, α -CT, foram similares aqueles empregados acima para o sistema micelar de AOT.

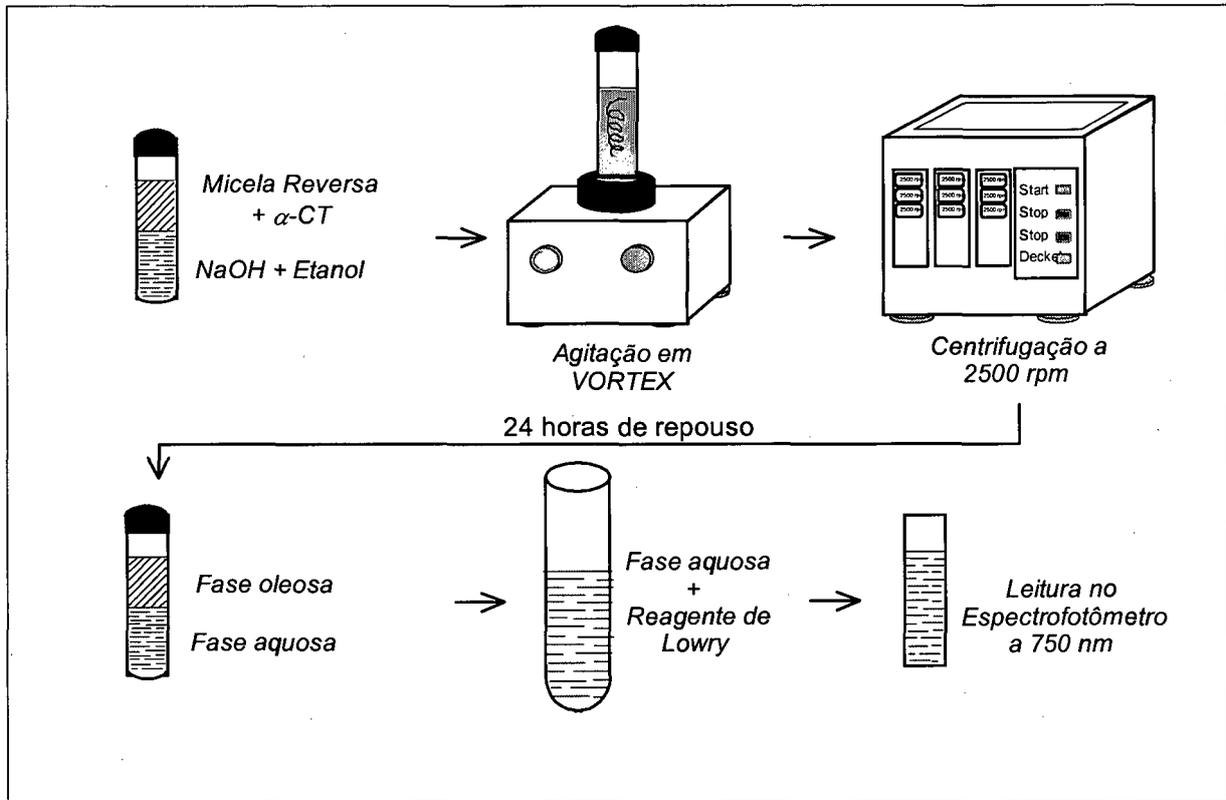


Figura 2.1 Extração da α -CT da microemulsão de AOT para a fase aquosa de NaOH e determinação da concentração de α -CT, usando o método de Lowry.

2.5 DESIDRATAÇÃO DA SOLUÇÃO DE MICELA REVERSA

Para a desidratação de microemulsões, foram preparadas soluções de micelas reversas de AOT 0,2 M em heptano, com $W_o=10$, contendo $3,51 \times 10^{-5}$ M de α -CT. A α -CT foi previamente preparada em solução aquosa tamponada com glicina 0,1 M em diferentes pH (7,0; 7,7; 8,2; 9,0; 9,8 e 11,2), e injetada com auxílio de microseringa microvolumes na solução orgânica de AOT. A desidratação foi realizada usando o sistema de equilíbrio da fase vapor da solução micelar com LiCl umedecido.

O LiCl foi colocado em frasco e umedecido com água e em outro recipiente (bécker de 50 mL) foram colocados 25 mL da solução micelar com α -CT. Em seguida, o bécker foi transferido para dentro do frasco contendo LiCl umedecido. Este frasco foi então fechado hermeticamente e mantido sob agitação magnética por 48 horas a 30°C, conforme mostrado na **Figura 2.2**.

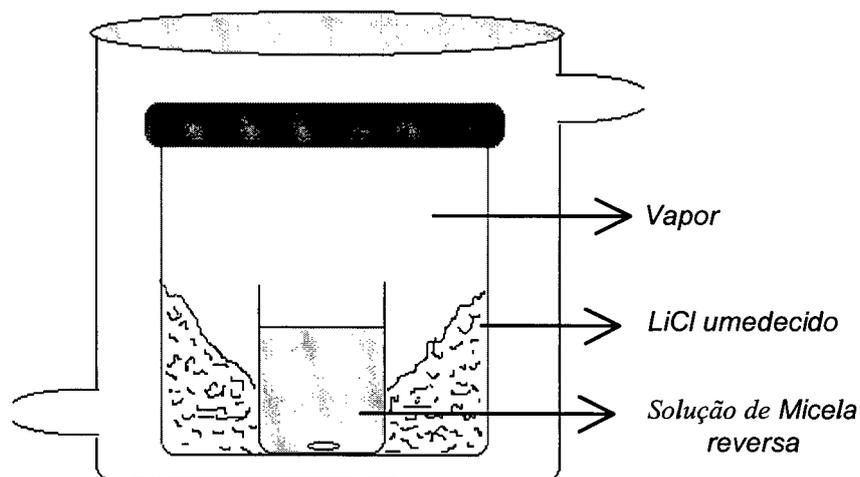


Figura 2.2 Sistema usado na desidratação da solução de micela reversa contendo α -CT, usando o método de equilíbrio da fase vapor da solução micelar com o LiCl umedecido, a 30°C.

A remoção da água foi monitorada pelo método de Karl Fischer em diferentes intervalos de tempo (0; 1;3; 7; 12; 24 e 48 horas), usando 5 μ L do meio micelar. A concentração da proteína também foi determinada durante o processo de desidratação nos

mesmos intervalos de tempo por medidas espectrofotométricas a 280 nm (método direto),⁹⁰ e pelo método de transferência reversa conforme item 2.4.

A atividade catalítica da α -CT em solução de micela reversa foi acompanhada durante a desidratação de acordo com os intervalos de tempo acima citados. A reação foi realizada dentro da própria cubeta do espectrofotômetro UV/Visível, para onde foram transferidos 1,8 mL de micela reversa com GPNA 0,01 M e 200 μ L da micela reversa com α -CT.

A reação de hidrólise enzimática do GPNA foi monitorada a 30°C através do aumento da absorbância a 360 nm, que está associada com a formação da p-nitroanilina.^{49,51} A concentração de GPNA usada na reação de hidrólise foi de $3,24 \times 10^{-4}$ M, e a concentração final de α -CT foi de $3,51 \times 10^{-6}$ M. Para determinar a concentração do produto formado (p-nitroanilina) durante a reação, foi preparada a curva de calibração da p-nitroanilina com GPNA em micela reversa de AOT, conforme **Tabela 2.2** e **Figura 2.3**.

Tabela 2.2 Concentrações de p-nitroanilina e GPNA, usadas na obtenção da curva de calibração em meio de micela reversa de AOT 0,2 M, $W_0 = 10$.

[GPNA] $\Delta 10^5$, M	[p-nitroanilina] $\Delta 10^5$, M	$A_{360 \text{ nm}}^{(a)}$
18	0	0,3310
16	2	0,5238
14	4	0,7163
12	6	0,9712
10	8	1,1995
8	10	1,4186
6	12	1,6194
4	14	1,8979
2	16	2,0481
0	18	2,2553

(a) Valor médio de seis medidas

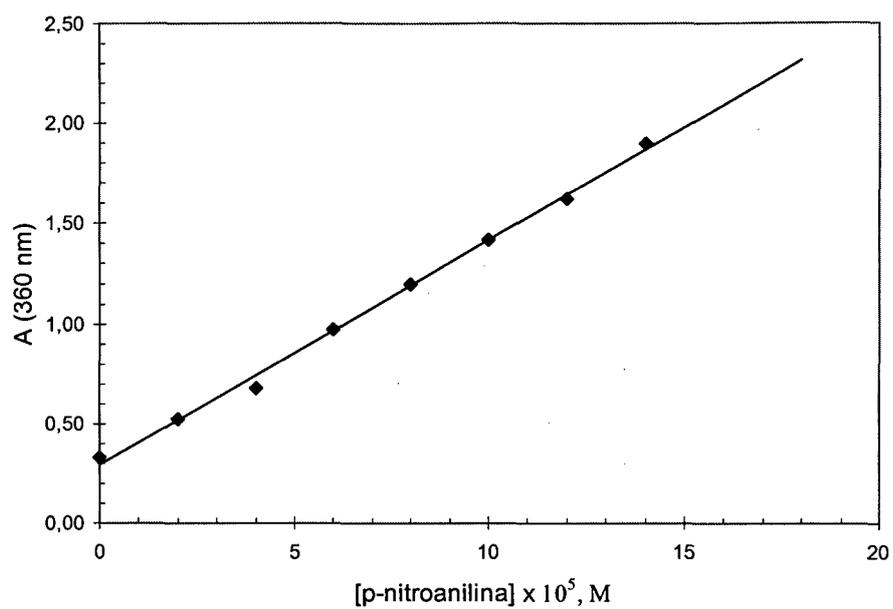


Figura 2.3 Curva de calibração para p-nitroanilina em solução de micela reversa de AOT, $\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$, $R = 0,99928$.

2.6 DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE MÁXIMA ($V_{\text{máx}}$) E A CONSTANTE DE MICHAELIS (K_M) EM SISTEMA MICELAR DE AOT

Para a determinação da velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e da constante de Michaelis (K_M), foram avaliadas as atividades catalíticas da α -CT em sistema micelar de AOT, em função da concentração do GPNA. (Tabela 2.3). A reação de hidrólise foi iniciada com a adição de 200 μL de solução micelar de AOT/heptano com $[\alpha\text{-CT}] = 3,51 \times 10^{-5}$ e $W_0 = 10$ na cubeta do espectrofotômetro, contendo 1,8 mL de solução micelar de GPNA.

Tabela 2.3 Concentrações finais de GPNA na solução micelar de AOT 0,2 M em heptano com $W_0 = 10$, usadas na reação de hidrólise para determinar a $V_{\text{máx}}$ e K_M .

Reações ^(a)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[GPNA] x 10 ⁵ , M	0,9	1,5	1,8	2,25	3,6	7,2	10,8	14,4	18,0

(a) Temperatura:, tempo de reação: 300 minutos.

A solução micelar de AOT/heptano contendo enzima e com $W_0 = 10$ foi preparada injetando microvolumes da solução aquosa de α -CT* (tamponada com glicina 0,1 M com pH 8,2 na solução de AOT/heptano).

Foi também realizada a reação controle, onde foram adicionados na cubeta a 30°C, 2,0 mL de solução micelar de AOT 0,2 M em heptano contendo GPNA 0,01 M. Após 5 horas, não foi detectado a formação do produto de hidrólise (p-nitroanilina).

* pH ótimo da α -CT em meio aquoso e m.r. é de aproximadamente 8

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram estudadas:

1. A extração da α -CT da micela reversa de AOT e SbPC para uma fase aquosa receptora de NaOH com posterior quantificação do teor protéico através do método de Lowry usado por Aires-Barros e Cabral¹⁰⁰, com algumas modificações conforme descrito na parte experimental. Este estudo teve como objetivo a determinação da concentração protéica para aplicação na segunda etapa do trabalho.
2. Desidratação da micela reversa de AOT com enzima (α -CT) através do equilíbrio da fase vapor da solução micelar com LiCl. Determinação do teor protéico e a concentração de água durante a desidratação. Avaliação da atividade da α -CT após a reidratação do sistema micelar contendo enzima.
3. Atividade da α -CT, antes e depois da desidratação da solução micelar contendo α -CT, através da reação de hidrólise do GPNA.

3.1 EXTRAÇÃO DA α -CT DA MICELA REVERSA DE AOT E SbPC PARA UMA FASE AQUOSA BÁSICA RECEPTORA

Inicialmente foram preparadas curvas de calibração das proteínas BSA e α -CT, tanto em meio aquoso como em meio de micela reversa, com objetivo de avaliar o método de transferência reversa de proteínas, usado de acordo com o procedimento descrito por Aires-Barros e Cabral¹⁰⁰ e Pires e col.¹⁰¹

3.1.1 Curvas de calibração

As curvas de calibração foram obtidas através do método de transferência reversa da proteína contida na micela reversa para a uma fase aquosa receptora de NaOH 0,1 M, (sistema Winsor II) conforme usado por Aires-Barros e Cabral¹⁰⁰ e Pires e col.¹⁰¹ e modificado de acordo com o item 2.4, segundo parágrafo, página 36. As proteínas BSA e α -CT foram inicialmente quantificadas em meio aquoso.

Após terem sido traçadas as curvas de calibração da BSA e da α -CT em meio aquoso de NaCl a 0,85%, realizou-se a etapa de transferência da α -CT contida dentro da micela reversa de AOT e também de SbPC para a fase aquosa receptora de NaOH 0,1 M com 2,5 % de etanol. A α -CT foi previamente solubilizada em solução aquosa de NaCl a 0,85% e injetada na solução de surfactante em meio orgânico. Os resultados obtidos são mostrados na **Tabela 3.1** e **Figura 3.1**.

Tabela 3.1 Valores de absorbância em função da concentração das proteínas BSA e α -CT em meio aquoso e α -CT em micela reversa de AOT.

[Proteína] ($\mu\text{g/mL}$)	$A_{750\text{ nm}}^{(a)}$ BSA	$A_{750\text{ nm}}^{(a)}$ α -CT _{aqu.} ^(b)	$A_{750\text{ nm}}^{(a)}$ α -CT _{m.r. AOT} ^(c)	$A_{750\text{ nm}}^{(a)}$ α -CT _{m.r. SbPC} ^(d)
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12,5	0,0423	0,0416	0,0401	0,0548
25,0	0,0738	0,0755	0,0706	0,0998
32,5	0,1038	0,1049	0,0910	--
50,0	0,1254	0,1354	0,1232	0,1386
62,5	0,1623	0,1703	0,1485	0,1789
75,0	0,2003	0,2024	0,1796	0,2289
87,5	0,2218	0,2307	0,2047	0,2478
100,0	0,2565	0,2660	0,2379	0,2831

(a) Valores médios de três medidas; (b) α -CT em solução aquosa; (c) α -CT em sistema de micela reversa de AOT; (d) α -CT em sistema de micela reversa de SbPC.

Na **Figura 3.1** pode-se observar que a transferência da enzima, foi eficiente em sistema de micela reversa de AOT para uma fase aquosa receptora de NaOH 0,1 M. Os valores absolutos de absorbância foram levemente menores daqueles obtidos com BSA e α -CT em meio aquoso. A curva de calibração obtida para α -CT em sistema micelar de SbPC (α -CT_{m.r.SbPC}) após a transferência reversa, mostra valores de absorbância mais elevados do que no sistema aquoso e no sistema micelar de AOT (α -CT_{m.r.AOT}). Estes valores mostram que provavelmente ocorreu a transferência do surfactante SbPC para a fase aquosa receptora, juntamente com a enzima, interferindo assim, com os reagentes de Lowry durante a quantificação da concentração protéica por este método.

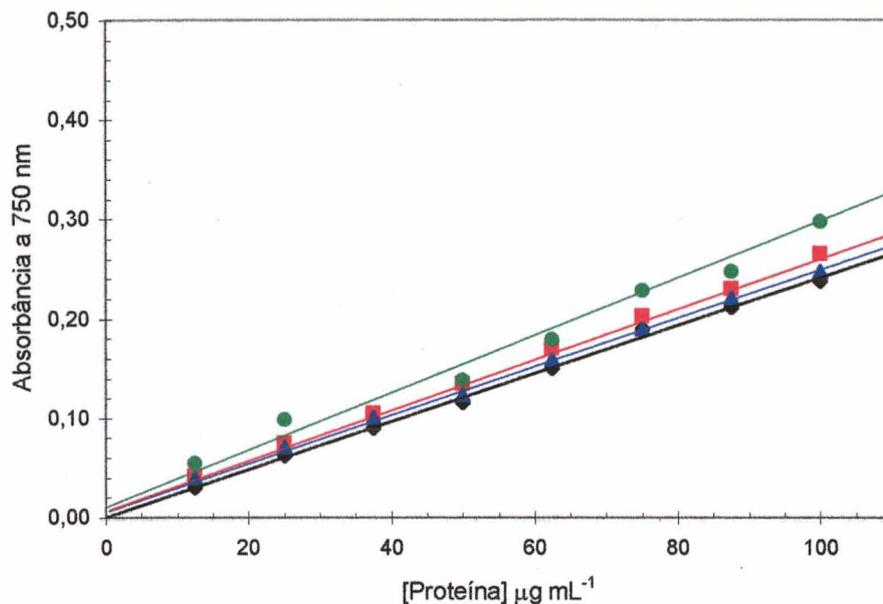


Figura 3.1 Curvas de calibração das proteínas BSA (◆) e α -CT (■) em sistema aquoso; α -CT em micela reversa de AOT/heptano (▲) e α -CT em micela reversa de SbPC/heptano (●).

Outros surfactantes, CTAB e $C_{12}E_4$ foram utilizados na preparação de micelas reversas, nas mesmas concentrações de AOT e SbPC (0,2M), contendo α -CT. Durante o processo de transferência da α -CT das soluções de micela reversa de CTAB (surfactante catiônico) e de $C_{12}E_4$ (surfactante não iônico) para a fase aquosa básica receptora, não ocorreu a separação das duas fases após agitação e centrifugação, como observado com os surfactantes AOT e SbPC. Estes resultados mostraram que o método usado por Barros e Cabral¹⁰⁵, e por Pires e col.¹⁰⁶ para a transferência reversa de proteínas em sistemas micelares com a posterior determinação da concentração de α -CT, não se aplicou para estes surfactantes.

Foram preparadas soluções controle com água, contendo de 0,025 - 0,200 M dos surfactantes, CTAB, $C_{12}E_4$ e SbPC, a fim de estabelecer a influência sobre os reagentes de Lowry. Após a adição dos reagentes de Lowry na solução aquosa de CTAB, observou-se a formação de um precipitado amarelo. Com a adição dos reagentes de Lowry na solução de $C_{12}E_4$ houve a formação de uma camada sobrenadante levemente amarelada e com o meio turvo, enquanto que, na solução com o SbPC ocorreu o desenvolvimento de uma coloração

levemente azulada, mostrando que estes surfactantes interferem com os reagentes de Lowry (Figura 3.2).

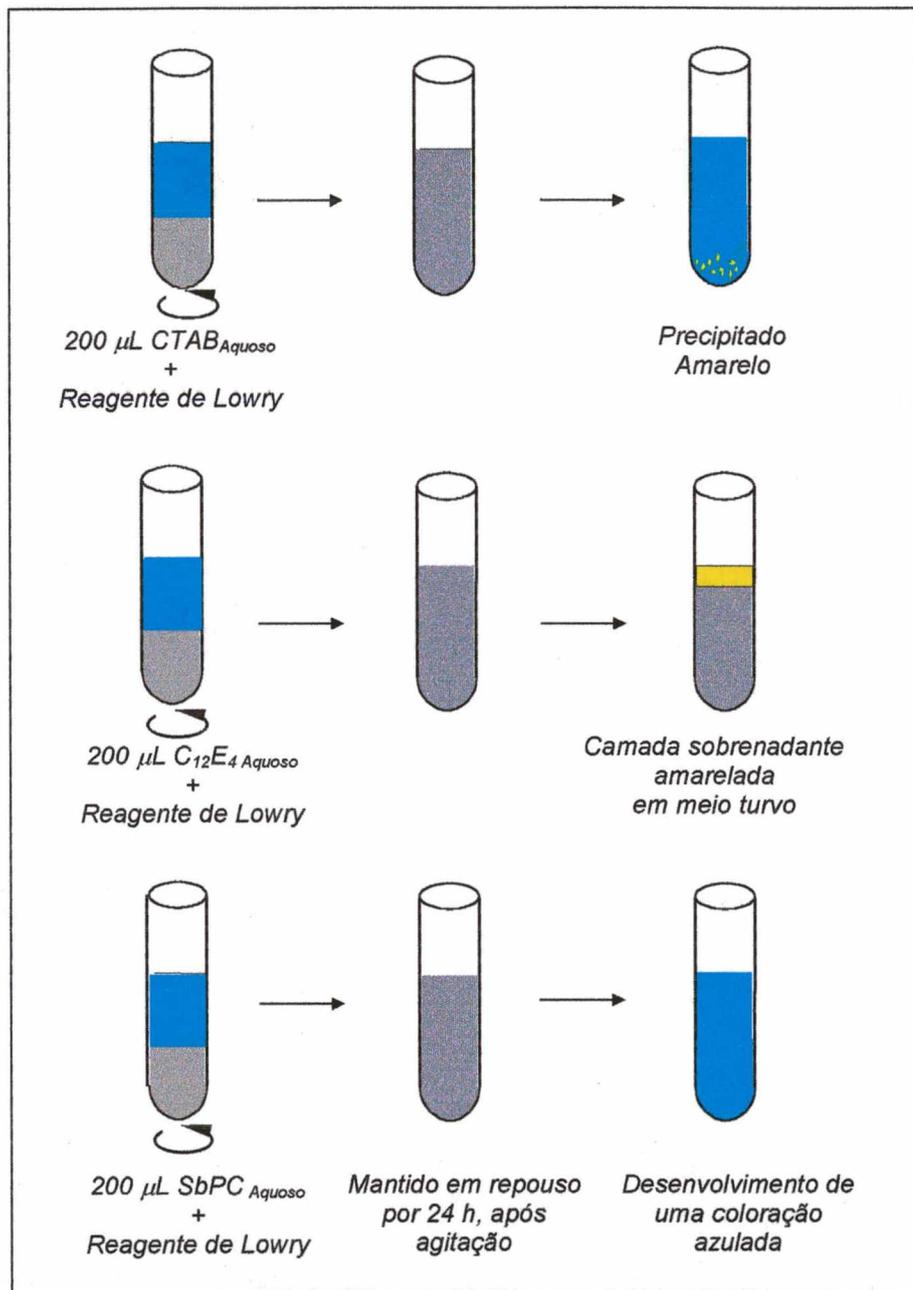


Figura 3.2 Diagrama esquemático da interferência dos surfactantes, CTAB, $C_{12}E_4$ e SbPC no método de Lowry.

3.1.2 Efeito do tempo de agitação na transferência reversa da enzima

Foram realizados uma série de experimentos controle com soluções de micela reversa de AOT 0,2 M em heptano, e em micela reversa de SbPC 0,2 M em heptano e $W_o = 10$ contendo $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de α -CT em meio aquoso de NaCl a 0,85%. Este estudo foi realizado afim de avaliar o tempo de agitação necessário para que houvesse a transferência completa da α -CT da fase micelar para a fase aquosa receptora de NaOH 0,1 M, com 2,5% de etanol. Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 3.3**.

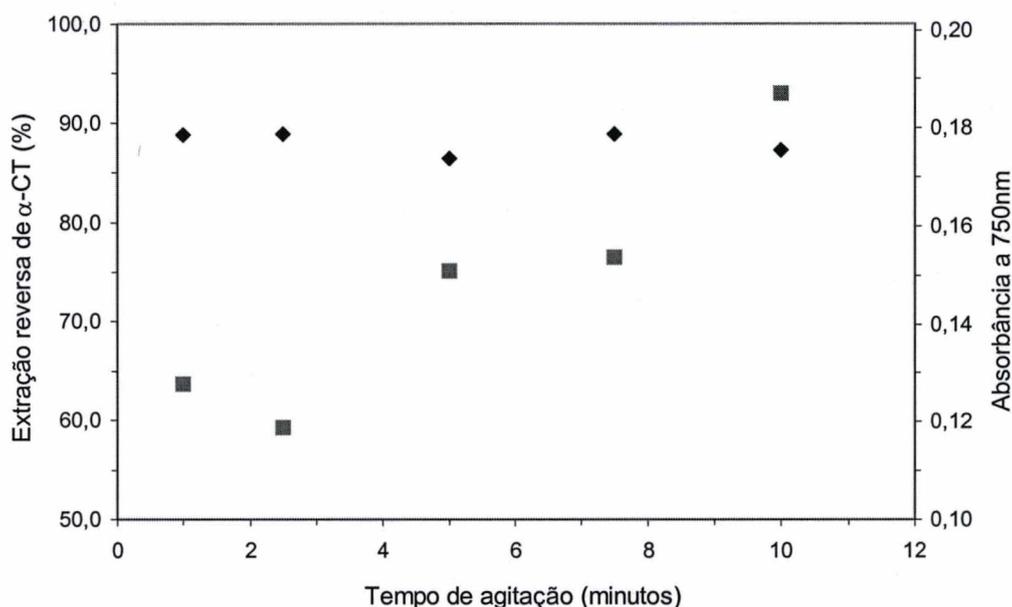


Figura 3.3 Variação da absorbância em função do tempo de agitação da solução de micela reversa de AOT (♦), e SbPC (■) na extração da α -CT. $\lambda = 750 \text{ nm}$; $[\text{AOT}] = 200 \text{ mM}$; $W_o = 10$ e $[\alpha\text{-CT}] = 75 \mu\text{g mL}^{-1}$. Referência: fase aquosa de NaCl a 0,85% na ausência de α -CT.

Pelo gráfico mostrado na **Figura 3.3**, pode-se observar que o tempo de agitação não influencia na transferência da α -CT da micela reversa de AOT em heptano para a fase aquosa receptora. A transferência reversa da proteína foi eficiente, e o tempo de agitação de 1 minuto é suficiente para que a enzima seja transferida para a fase aquosa receptora (88,9%). Os valores das absorbâncias obtidos neste experimento estão de acordo com os da curva de calibração de α -CT_{m,r} (**Figura 3.1**).

O tempo de agitação necessário para a transferência da α -CT da micela reversa de SbPC para a fase aquosa receptora de NaOH também foi estudado. De maneira análoga, a quantificação da concentração de proteína foi avaliada por medidas de absorvância em 750 nm. Na **Figura 3.3** pode ser observado que é necessário 9 -10 minutos de agitação para que a enzima seja transferida de maneira eficiente da micela reversa de SbPC para a fase aquosa receptora de NaOH 0,1 M, sendo de 93%.

Dungan e col. em 1991¹⁰⁷ e Dekker e col. em 1990,⁷⁸ propuseram um mecanismo para explicar o processo de transferência reversa de proteína. O processo é dinâmico e depende da dissolução, consistindo de dois componentes que são a coalescência e a expulsão, conforme mostrado na **Figura 3.4**.

Na etapa de coalescência, as gotículas micelares colidem e coalescem (juntam-se) com a interface. Nesta etapa pode ocorrer tanto a colisão de gotículas vazias com as cheias, bem como a colisão de gotículas vazias entre si ocorrendo troca do conteúdo aquoso entre elas. Durante a agitação ocorre a completa dispersão das duas fases, e a resistência difusional que está associada com o transporte do soluto para interface é reduzida. Esta resistência está provavelmente relacionada com a coalescência da micela reversa contendo a proteína, e a interface orgânica/aquosa. Na expulsão, a micela revestida pela camada de surfactante deforma para o plano interfacial, e assim a partícula protéica se move para fora da interface do surfactante. Este processo interfacial requer a ruptura do filme orgânico formado entre a micela reversa e a fase aquosa receptora. O filme estabilizado pelas moléculas de surfactante precisa ser aberto para criar uma conexão entre o conteúdo aquoso da micela reversa e a fase aquosa receptora.

Com os experimentos realizados por Dungan e col. fica evidenciado que a coalescência micelar é a etapa limitante no mecanismo de transferência reversa. Isto implica que a interação da proteína com a camada de surfactante apresenta um efeito grande no processo de coalescência.¹⁰⁷

O SbPC é um surfactante zwitteriônico ou anfótero. Estes são caracterizados por conterem na mesma molécula, grupos com cargas positivas e negativas.

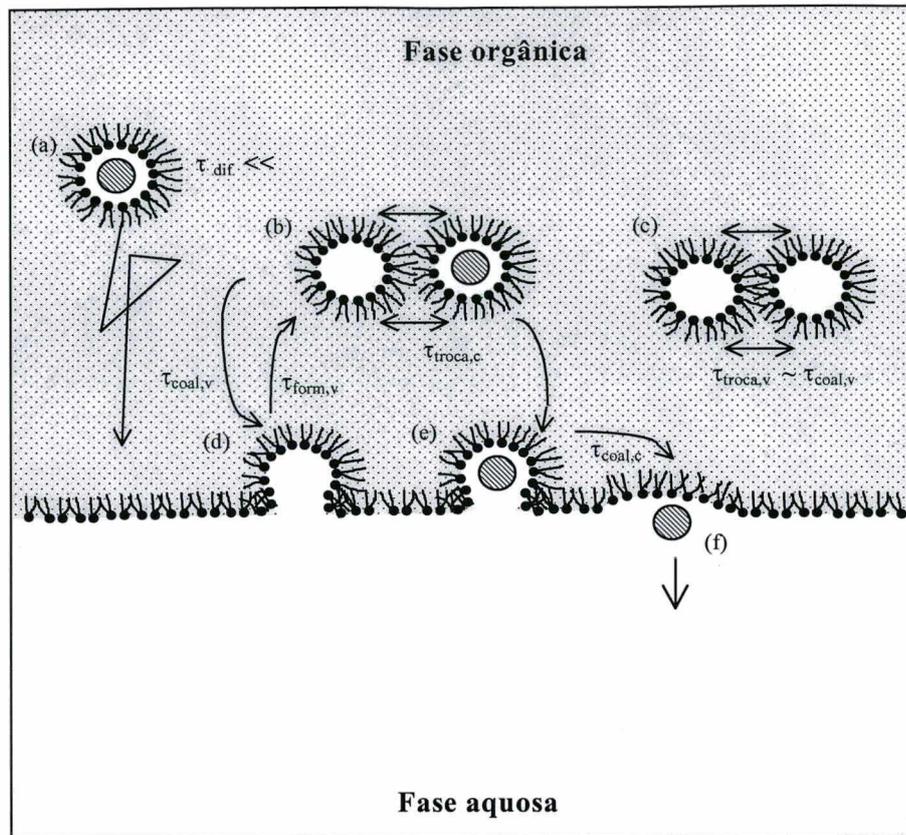


Figura 3.4 Processo dinâmico ocorrido durante a dessolubilização da proteína. (a) difusão da micela cheia para a região interfacial. (b) coalescência e mistura do conteúdo das gotas micelares cheias de proteínas e as vazias. (c) coalescência e mistura dos conteúdos de duas micelas vazias. (d) coalescência ou formação de micelas vazias na interface das duas fases. (e) coalescência da micela cheia com a interface, e (f) expulsão da proteína para fora da interface do surfactante.

Assim, durante a agitação da solução de micela reversa formadas com SbPC contendo α -CT e a solução aquosa receptora de NaOH, ocorre a dispersão das duas fases fazendo com que haja uma provável mudança no pH da solução aquosa da micela reversa. Como a fase aquosa receptora é fortemente básica, o pH da fase aquosa interna da micela reversa aumenta. Se este pH for maior que o pI da α -CT (8,2), esta estará carregada por um sistema de cargas negativas. Quando em contato com o surfactante anfótero, a sua expulsão para a fase aquosa receptora pode ser dificultada devido à presença de cargas positivas. Ao contrário, verificou-se que ao utilizar AOT, um surfactante aniônico, a α -CT carregada negativamente é facilmente expelida para fora da micela reversa.

3.1.3 Estabilidade da micela reversa SbPC em função do tempo de estocagem

Através do estudo apresentado anteriormente (item 3.1.2), verificou-se que os resultados da transferência da α -CT do sistema micelar de SbPC para o sistema aquoso obtidos em diferentes intervalos de tempos, não foram reprodutivos. Devido à falta de reprodutibilidade, foi monitorado a influência do tempo de estocagem da solução micelar de SbPC. Assim, soluções micelares de SbPC sem α -CT foram estocadas à temperatura ambiente durante 10 dias antes de realizar o processo de transferência. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com as soluções micelares preparadas recentemente. As quantidades de NaOH 0,1 M e de micela reversa usadas no processo de transferência, foram também estudadas. Os dados obtidos são mostrados na **Tabela 3.2**. O tempo e a velocidade de rotação foram alterados, conforme descritos no item 2.4 da parte experimental.

Tabela 3.2 Medidas de absorvância a 750 nm, da fase aquosa receptora com os reagentes de Lowry, após a transferência reversa do conteúdo interno (sem α -CT) da micela reversa de SbPC. A velocidade e o tempo de centrifugação usados para separação das fases foram 4000 rpm durante 25 min.

0,1M NaOH (μ L)	etanol (μ L)	m.r. _{SbPC} ^(a) (μ L)	m.r. _{SbPC-10dias} ^(b) (μ L)	m.r. _{AOT} ^(c) (μ L)	A ₇₅₀ (nm)
500	12,5	500	-----	-----	(d)
500	12,5	-----	-----	500	0,038
500	12,5	-----	500	-----	0,300
1000	25,0	500	-----	-----	0,083
1000	25,0	-----	500	-----	0,170
1000	25,0	1000	-----	-----	0,086

(a) Micela reversa de SbPC 0,2 M, $W_0=10$ sem α -CT, preparada no mesmo dia em que foi realizada a separação das fases; (b) A mesma micela reversa com 10 dias de estocagem em geladeira; (c) Micela reversa de AOT 0,2 M, $W_0=10$ sem α -CT; (d) Separação das fases incompleta.

Soluções de micela reversa de SbPC preparadas recentemente ao serem submetidas ao processo de transferência, apresentam comportamento diferenciado daquelas com 10 dias de preparação. Comparando os valores das absorvâncias das micelas reversas, recentemente preparada e a de 10 dias, observa-se um valor maior para a micela reversa preparada a mais tempo. A medida que o tempo de estocagem aumenta, a micela perde a estabilidade, ocorrendo uma provável transferência do surfactante para a fase aquosa receptora, interferindo com os reagentes de Lowry e aumentando os valores das absorvâncias e mostrando desta forma que a separação das fases deve ser realizada logo após a sua preparação. O valor da absorvância da micela reversa preparada com AOT foi menor que a de SbPC, mostrando assim, que também ocorreu uma provável transferência deste surfactante (AOT) para a fase aquosa. Com as relações 1000:1000 μL e 1000:500 μL de NaOH : micela reversa ocorreu pouca transferência de SbPC para a fase aquosa receptora de NaOH (**Tabela 3.2**).

3.1.4 Estudo do efeito do pH da fase aquosa de α -CT no processo de transferência reversa

Foi estudado o efeito do pH da solução aquosa de α -CT (tamponada com solução de glicina 0,1 M) injetada na solução de surfactante/heptano, no processo de transferência reversa de α -CT das soluções micelares (AOT e SbPC) para a solução aquosa receptora (NaOH 0,1 M + 2,5% de etanol), à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$).

Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 3.5**. Observa-se que a percentagem de transferência da enzima para a fase aquosa receptora de NaOH 0,1 M é influenciada pelo pH da fase aquosa de α -CT injetada na micela reversa, tanto com o surfactante aniônico (AOT) como para o zwitteriônico (SbPC).

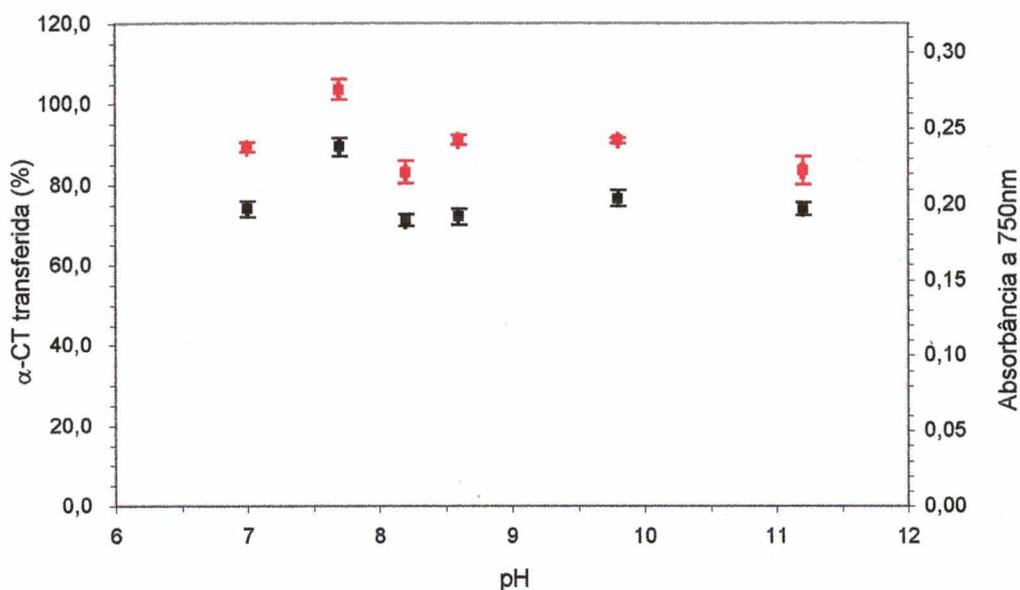


Figura 3.5 Efeito do pH da solução tampão, usada na preparação da solução aquosa de α -CT (■) e de SbPC (■) injetada na solução de AOT/heptano, na transferência da α -CT. [AOT] = 0,2 M, tempo de agitação = 1 min.; [SbPC] = 0,2 M, tempo de agitação = 10 min.; $W_0 = 10$, [α -CT] = 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. $\lambda_{\text{máx}} = 750$ nm; Referência: fase aquosa na ausência de α -CT. Valores de 3 medidas.

Na faixa de pH estudada, observou-se um valor máximo de α -CT transferida da solução micelar de AOT para a fase aquosa receptora de NaOH, em pH 7,7. Nestas condições, foram transferidas 87% da enzima. Neste valor de pH, para a solução micelar de SbPC observou-se uma porcentagem de transferência de α -CT de 105,5%. Este indica que houve além da transferência da enzima, também a do SbPC para a fase aquosa receptora.

Aires-Barros e Cabral¹⁰⁰ estudaram o efeito do pH na extração reversa da lipase B de *Chromobacterium viscosum* da solução micelar de AOT para a fase aquosa receptora (K_2HPO_4 0,05 M com KCl 0,05M) em diferentes valores de pH. Não ocorreu a extração em pH abaixo do ponto isoelétrico, indicando que as interações eletrostáticas entre a enzima e o surfactante são predominantes neste processo. Em valores de pH mais elevados, a transferência reversa da lipase B aumentou, alcançando um valor máximo de 85% em pH 9,0 com adição de etanol. Sem adição de etanol não ocorreu a transferência. Isto sugere que, além das interações electrostáticas entre a proteína e surfactante, outros

fatores podem estar envolvidos, tais como as interações hidrofóbicas entre a proteína e a cauda hidrofóbica do surfactante e/ou solvente. Tais interações são extremamente importantes na solubilização e recuperação de proteínas.¹⁰⁰ O etanol, provavelmente desestabiliza as microgotas, favorecendo a coalescência e extração.

Dungan e col. em 1991¹⁰⁷, mostraram que a variação do pH da fase aquosa da micela reversa apresenta um maior efeito na transferência reversa do que o pH da fase aquosa receptora.

O pH da fase aquosa da micela reversa pode afetar a interação da proteína com a camada de surfactante durante a etapa de coalescência. Uma vez que a etapa de coalescência tenha ocorrido, a fase aquosa receptora pode entrar em contato com a proteína e afetar a segunda etapa que é a expulsão, influenciando diretamente na carga da proteína. Assim, a alteração do pH da micela reversa afeta a etapa de coalescência mais diretamente, enquanto o pH da fase aquosa receptora influencia no tempo requerido para a extração da proteína da região interfacial.

É importante observar que a influência do pH da fase aquosa receptora não está totalmente ausente no processo de coalescência. A água da fase aquosa pode ser levada para dentro da fase micelar, com a formação de novas gotículas. Estas gotículas colidem uma com as outras, como também com as contendo a proteína, e posteriormente o conteúdo interno aquoso é trocado entre elas. Estas trocas aquosas no interior das gotículas contendo a proteína podem alterar suas cargas. Desta forma o pH da fase aquosa receptora pode afetar indiretamente no processo de coalescência.¹⁰⁷

3.2 DESIDRATAÇÃO DA MICELA REVERSA DE AOT CONTENDO α -CT, ATRAVÉS DO MÉTODO DE EQUILÍBRIO DA FASE VAPOR DA SOLUÇÃO MICELAR COM LiCl UMEDECIDO

O sistema de micela reversa de AOT com α -CT foi submetido à desidratação com o objetivo de manter a enzima em estado “dormente”, isto é, sem atividade ou com uma atividade reduzida, e tornando-a novamente ativa após a adição de água.

3.2.1 Determinação da concentração de água

Para acompanhar a perda da água durante o processo de desidratação, foi necessário testar previamente o método de titulação de Karl Fischer. Assim, para estas determinações foram preparadas soluções de micela reversa de AOT com diferentes valores de W_0 na ausência de α -CT. Os valores da **Tabela 3.3** mostram que o método de Karl Fischer é eficiente para quantificar o conteúdo de H_2O presente em solução de micela reversa. Os resultados experimentais foram mais elevados quando comparados com os volumes de água adicionados durante a preparação das soluções micelares. Estes valores mais elevados, podem estar associados à presença de água nos outros reagentes usados na preparação da micela reversa, como heptano e AOT, embora o heptano tenha sido previamente purificado.

Tabela 3.3 Concentração de água presente na micela reversa de AOT 0,2 M em função de W_0 na ausência de α -CT.

W_0	Solução de Karl Fischer (mL) ^(a)	[H ₂ O] _{exp.} ^(b) (mg/ μ L)	[H ₂ O] _{adic.} ^(c) (mg/ μ L)
0	0,012 \pm 0,008	0,007	0,000
2	0,027 \pm 0,006	0,016	0,0072
4	0,037 \pm 0,006	0,022	0,0144
6	0,046 \pm 0,006	0,027	0,0216
7	0,053 \pm 0,004	0,031	0,0252
8	0,057 \pm 0,004	0,033	0,0288
10	0,067 \pm 0,004	0,040	0,0360

(a) Volume da solução Karl Fischer gasto na titulação de água. Valores médios de cinco medidas; (b) Concentração de água obtida a partir da titulação da solução de micela reversa com a solução Karl Fischer; (c) Concentração de água adicionada na solução de micela reversa.

Inicialmente desidratou-se a solução de micela reversa, na ausência de enzima α -CT, e verificou-se o decaimento do conteúdo de água durante o processo. (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 Concentração de H₂O da solução micelar de AOT 0,2 M em heptano, em função do tempo de desidratação, na ausência de α -CT.

Tempo de desidratação (h)	KF (mL) ^(a)	H ₂ O (mg/ μ L)
0	0,0655 \pm 0,004	0,039
1	0,0605 \pm 0,004	0,036
3	0,0515 \pm 0,004	0,031
7	0,0410 \pm 0,006	0,024
12	0,0207 \pm 0,006	0,012
24	0,0140 \pm 0,008	0,008
48	0,0080 \pm 0,008	0,005

(a) Volume gasto de solução Karl Fischer na titulação de água. Valores médios de cinco medidas

A solução de micela reversa de AOT 0,2 M em heptano, $W_{0=}$ 10, com α -CT foi preparada injetando uma solução de enzima ($[\alpha\text{-CT}]_{\text{final}} = 3,51 \times 10^{-5}$ M), tamponada com glicina 0,1 M / NaOH em diferentes pH na micela reversa e desidratada até níveis muito baixos de água ($0,005\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$), conforme mostrado na parte experimental.

Na **Tabela 3.5**, são mostradas as concentrações de água obtidas durante o processo de desidratação da micela reversa em diferentes pH da solução aquosa de α -CT injetada na micela reversa. Os dados mostram que o método de desidratação através do equilíbrio da fase vapor da solução micelar com LiCl umedecido em um sistema hermeticamente fechado, permite obter o conteúdo de H_2O precisamente na solução de micela reversa com α -CT em diferentes pH, durante o processo de desidratação.

Tabela 3.5 Concentração de H_2O no sistema micelar de AOT 0,2 M/heptano contendo solução tamponada (glicina 0,1 M/NaOH) de α -CT em diferentes pH em função do tempo de desidratação, a 30°C .

tempo (h)	[H_2O] mg/ μL					
	pH 7,0	pH 7,7	pH 8,2	pH 9,0	pH 9,8	pH 11,2
0	0,040	0,039	0,039	0,041	0,038	0,038
1	0,035	0,033	0,034	0,036	0,036	0,037
3	0,032	0,026	0,031	0,034	0,030	0,031
7	0,024	0,022	0,021	0,024	0,021	0,020
12	0,020	0,013	0,015	0,009	0,009	0,008
24	0,007	0,006	0,010	0,006	0,006	0,006
48	0,003	0,002	0,004	0,003	0,002	0,003

A **Figura 3.6** permite uma melhor visualização do decaimento da concentração de água da micela reversa durante o processo de desidratação. Nas primeiras 12 horas, a diminuição da concentração de água é maior. Em $\text{pH} >$ que o pI, a desidratação é mais rápida e provavelmente isto se deve ao fato que nesta faixa de pH o número de cargas negativas na superfície da α -CT é grande e a solvatação é menor. Portanto, as moléculas

de água estão mais fracamente ligadas a sua superfície. Após este tempo, a diminuição é mais lenta.

A água contida na micela reversa é removida pela fase vapor de LiCl até alcançar o equilíbrio mútuo entre as duas fases (micela reversa e a solução saturada de LiCl). No trabalho de Carlile e col.,⁹⁶ foi observado o mesmo perfil de decaimento, usando o método de desidratação através do equilíbrio da fase vapor da solução micelar com LiCl umedecido, bem como o da peneira molecular (tipo 4A^o - tamanho das partículas = 10 μm) como agente dessecante.

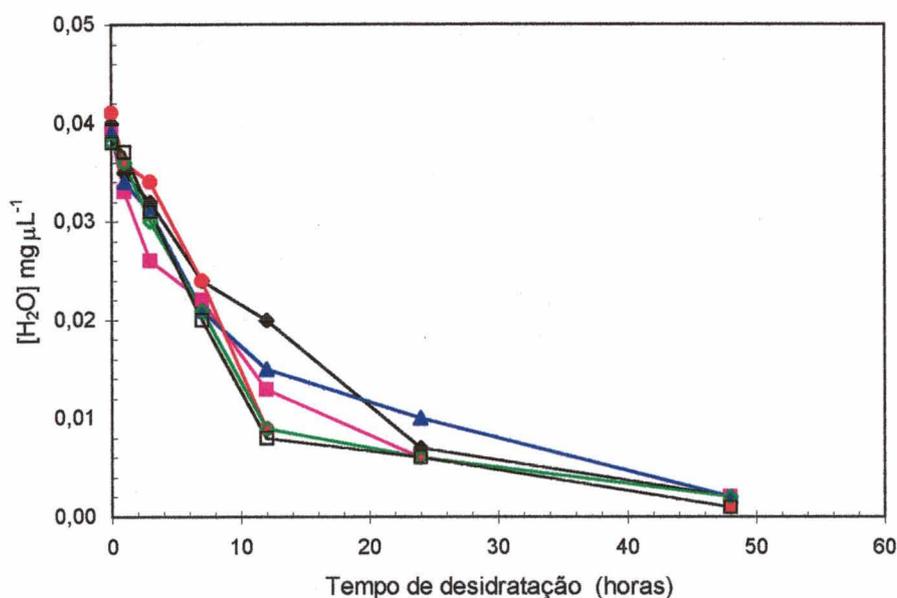


Figura 3.6 Efeito do tempo de desidratação da micela reversa de AOT 0,2 M/ heptano contendo solução aquosa tamponada (glicina 0,1M/NaOH) de α -CT em diferentes pH, (pH 7,0 (◆); pH 7,7 (■); pH 8,2 (▲); pH 9,0 (●); pH 9,8 (◇) e pH 11,2(□)).

A concentração de enzima (α -CT) na solução de micela reversa foi determinada por medidas de absorvância a 280 nm. Os resultados obtidos, indicam que ocorreu um aumento da concentração protéica com a diminuição da concentração de água durante o processo de desidratação (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 Concentração de proteína no sistema micelar de AOT 0,2 M/heptano contendo solução tamponada (glicina/NaOH) de α -CT em diferentes pH, em função do tempo de desidratação.

tempo (h)	[α -CT] 10^5 M					
	pH 7,0	pH 7,7	pH 8,2	pH 9,0	pH 9,8	pH 11,2
0	3,19	3,21	3,40	3,20	4,08	4,68
1	3,23	3,17	3,40	3,19	4,09	4,44
3	3,26	3,21	3,44	3,31	4,11	4,46
7	3,38	3,29	3,49	3,32	4,22	4,57
12	3,42	3,34	3,50	3,45	4,30	4,65
24	3,45	3,41	3,66	3,64	4,61	5,03
48	3,72	3,68	3,79	3,78	4,63	5,07

Em pH 9,8 e em 11,2 os valores da concentração protéica foram maiores que nos demais pH estudados, e isto pode estar relacionado com a dificuldade de formar soluções micelares totalmente transparentes nestes valores de pH. Durante o processo de desidratação os valores da concentração de α -CT também foram maiores, e isto é explicado devido à formação do precipitado protéico, que deixa a solução micelar opaca.

Inicialmente, pretendia-se usar o método de transferência reversa da proteína para uma fase aquosa receptora de NaOH 0,1 M com 2,5% de etanol, com posterior aplicação do método de Lowry para a sua quantificação conforme mostrado na parte experimental (Item 2.4) página 36.

Porém, durante o processo de desidratação observou-se que, usando o método de transferência ocorre uma oscilação muito grande na concentração protéica, enquanto que, com o método direto o aumento é linear e proporcional á concentração de água. Na **Figura**

3.7, observa-se que a variação da concentração protéica em função do tempo de desidratação, obtidos pelos métodos diretos e de transferência reversa, não apresentam o mesmo comportamento. Os experimentos foram realizados em duplicata

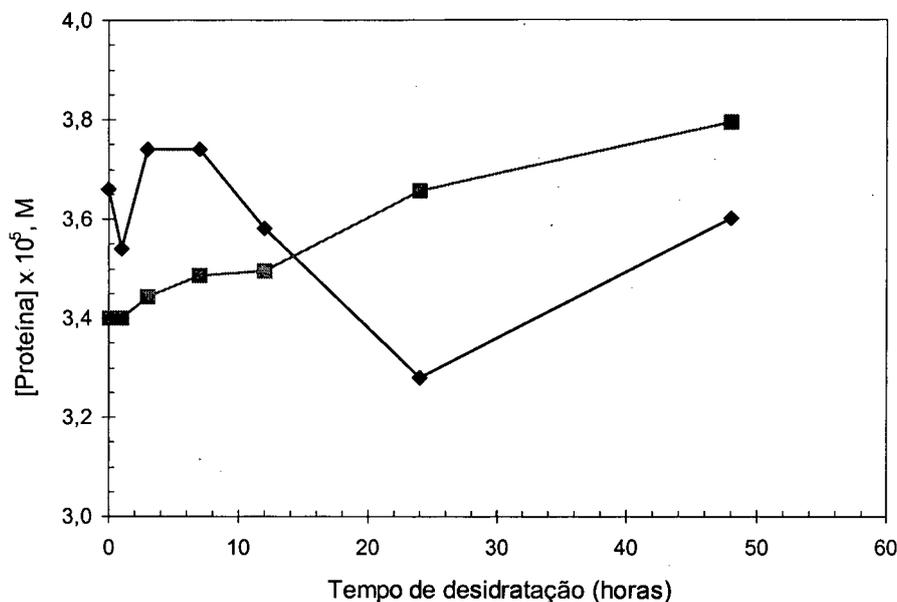


Figura 3.7 Variação da concentração de α -CT em função do tempo de desidratação determinada em pH 8,2 a 30 °C pelos métodos direto (■) e de transferência reversa (◆).

A oscilação na concentração observada no gráfico pelo método de transferência deve-se provavelmente à mudanças na força iônica da fase aquosa do sistema micelar durante o processo de desidratação, interferindo assim na transferência da enzima do sistema micelar para a fase aquosa receptora de NaOH (**Figura 3.7**).

Na **Figura 3.8** pode-se acompanhar o perfil da desidratação da solução de micela reversa de AOT/heptano com α -CT (pH 7,0) em função do tempo de desidratação, pelo método direto. Observa-se que ocorre uma diminuição na concentração de água e um pequeno aumento na concentração protéica. Ao retirar a água do interior da micela reversa, o volume total da solução micelar diminui levemente, e conseqüentemente a concentração protéica aumenta.

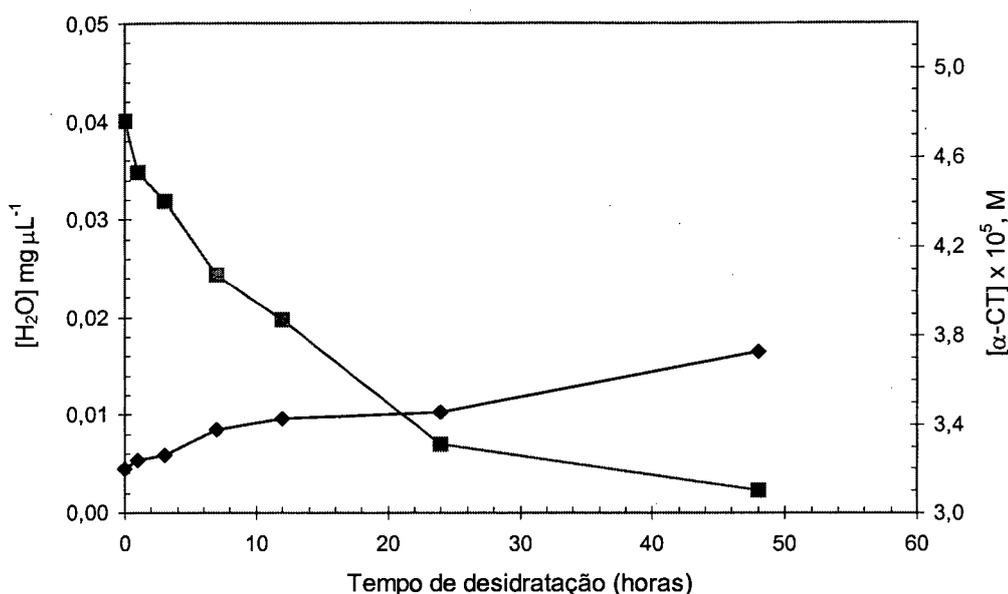


Figura 3.8 Perfil da desidratação da micela reversa de AOT através da fase vapor a 30°C com LiCl umedecido (concentração de água (♦); concentração de α-CT (■)). Composição inicial da micela reversa em heptano: [AOT] = 0,2 M, $W_0 = 10$, $[\alpha\text{-CT}] = 3,51 \times 10^{-6}$ M e pH = 7,0 da solução aquosa de α-CT.

O mesmo perfil foi observado para os demais pH estudados. Carlile e col. observaram um comportamento semelhante, durante o processo de desidratação do sistema micelar de AOT/ heptano contendo a CV lipase.⁹⁶ Eles verificaram a influência do agente dessecante (peneira molecular e fase vapor de LiCl) durante a desidratação. Observou-se que o método da fase vapor de LiCl é um sistema “limpo”, isto é, é específico somente para água enquanto que ao usar peneira molecular, embora mais rápido, esta absorve uma quantidade significativa de AOT e de proteína.

Gupta e col. observaram a formação de um precipitado branco, durante o processo de desidratação da solução de micela reversa de AOT com as proteínas α-CT, citocromo-c e o aminoácido triptofano, usando peneira molecular. Porém Carlile e col. não observaram o mesmo, apesar de terem sido usadas concentrações de CV lipase 30 vezes maior. Isto sugere que a CV lipase, como o AOT foram adsorvidos pelas partículas da peneira molecular que ficam dispersos na solução. Eles minimizaram este problema, lavando previamente a peneira molecular com um solvente anidro volátil e com secagem

antes do uso. Eles também não observaram a formação de precipitado durante o processo de desidratação da solução micelar, usando o método da fase vapor de LiCl.⁹⁶

Neste trabalho foi observado a presença de um precipitado protéico branco nos sistemas de micela reversa preparadas com as soluções tamponadas de α -CT ($3,51 \times 10^{-5}$ M) em pH 9,8 e 11,2. Em pH 9,8 foi observado a formação do precipitado protéico após 7 horas, e em pH 11,2 após 3 horas. O precipitado formado provavelmente se deve ao pH da solução de α -CT injetada na solução de AOT/heptano. Em pH acima do ponto isoelétrico da α -CT*, esta estará carregada de cargas negativas. Na presença de surfactante aniônico (AOT), onde o grupo cabeça é carregado negativamente, a α -CT pode ser expelida da micela reversa, na forma de precipitado branco. A formação deste precipitado provavelmente é proveniente da desnaturação alcalina da enzima.

O precipitado formado durante a desidratação da solução de micela reversa de AOT com α -CT foi separado por centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos. A concentração da proteína foi determinada na solução sobrenadante por absorvância a 280 nm.

A percentagem de precipitado (%R) formado foi quantificada como sendo a quantidade de α -CT recuperada (Equação 13).

$$\%R = \frac{[\alpha - CT]_i - [\alpha - CT]_f}{[\alpha - CT]_i} \quad (\text{Eq. 13})$$

onde i e f indicam concentração inicial e final, respectivamente.

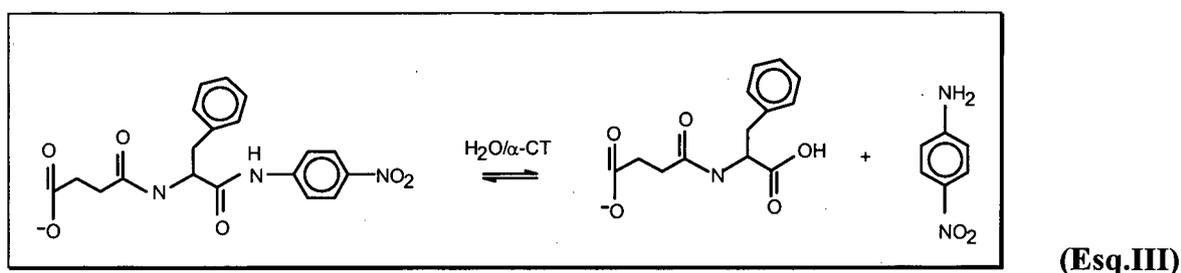
A percentagem de α -CT recuperada, para solução micelar preparada com tampão glicina pH 9,8 foi de 18,6%, e em pH 11,2 foi de 29,5%.

No trabalho de Carlile e col.⁹⁶ não foram realizados estudos da variação do pH da solução aquosa de CV lipase injetada na solução AOT/heptano. Não foi mencionado o pH da solução de CV lipase usada.

* A enzima α -CT tem o ponto isoelétrico em pH 8,2.⁸¹

3.3 ESTUDOS DA ATIVIDADE DA α -CT - MEDIDAS CINÉTICAS

Neste trabalho, estudou-se a reação de hidrólise do N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida -GPNA catalisada pela α -quimiotripsina em sistemas de micela reversa de AOT em heptano a 30°C (**Esquema III**).



Os princípios gerais da cinética de reações químicas se aplicam às reações catalisadas por enzimas, porém com um aspecto distinto, que é a saturação com o substrato.

Inicialmente, estudou-se o efeito da concentração do substrato, GPNA, na constante de velocidade de hidrólise com concentração fixa de α -CT ($3,51 \times 10^{-6}$ M).

A **Figura 3.9** mostra o efeito da concentração do substrato (GPNA) na velocidade da reação de hidrólise catalisada pela α -CT. Para concentrações baixas de substrato, a velocidade de reação (V) é proporcional à sua concentração. Nestas condições, a reação é de primeira ordem com relação ao substrato. Porém, à medida que se aumenta a concentração, observa-se um menor aumento na velocidade da reação, não sendo mais proporcional à concentração do substrato. Nestas condições a reação é de ordem mista. A medida que aumenta a concentração do substrato, a velocidade é praticamente independente, tendendo a um valor constante. Nessa faixa de concentração de substrato, a reação é essencialmente de ordem zero.^{1,3}

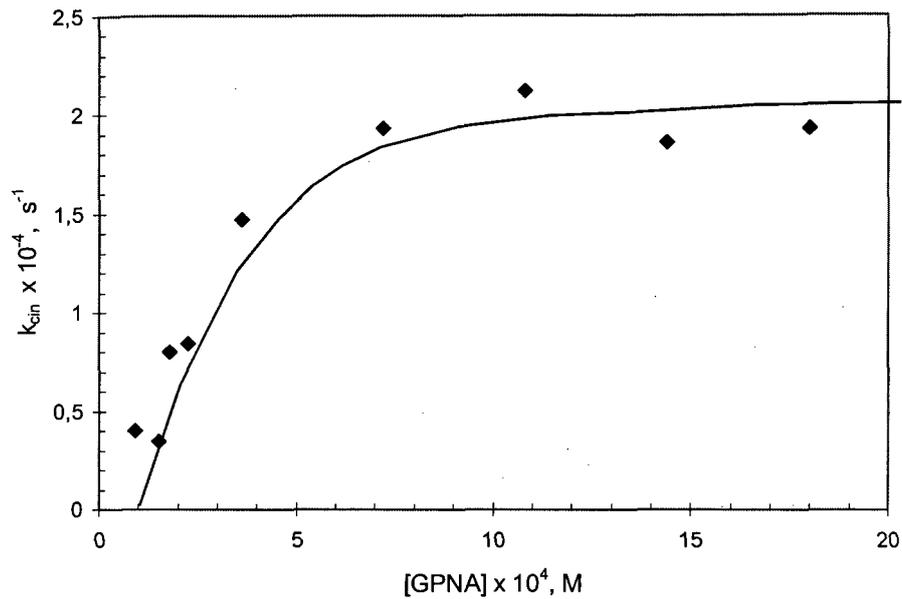


Figura 3.9 Variação da velocidade de hidrólise do GPNA em função da concentração do substrato, catalisada pela α -CT, em sistema de micela reversa de AOT 0,2 M /heptano, $W_0 = 10$, $[\alpha\text{-CT}]_{\text{final}} = 3,51 \times 10^{-6}$ M, à 30°C.

Neste estudo, o objetivo principal foi determinar K_M , k_{cat} e $V_{\text{máx}}$ para as reações de hidrólise do GPNA catalisadas pela α -CT em micela reversa de AOT. Os dados foram avaliados de acordo com o modelo proposto por Michaelis-Menten, uma vez que a reação segue este modelo cinético¹ (**Esquema I**, página 6 e **equações 11 e 12** página 9)

A **Figura 3.10** mostra o gráfico de $1/V$ versus $1/[S]$, para a reação de hidrólise do GPNA, neste sistema.

Em concentrações muito baixas de substrato, quando $[S]$ é muito menor que K_M , $V = [S]V_{\text{máx}} / K_M$; isto é, a velocidade é diretamente proporcional à concentração de substrato. Em altas concentrações de substrato, quando $[S]$ é muito maior do que K_M , $V = V_{\text{máx}}$; isto é, a velocidade é máxima, independentemente da concentração do substrato. Quando $[S] = K_M$, então $V = V_{\text{máx}} / 2$. Portanto, K_M é igual à concentração do substrato na qual a velocidade da reação é a metade de seu valor máximo.

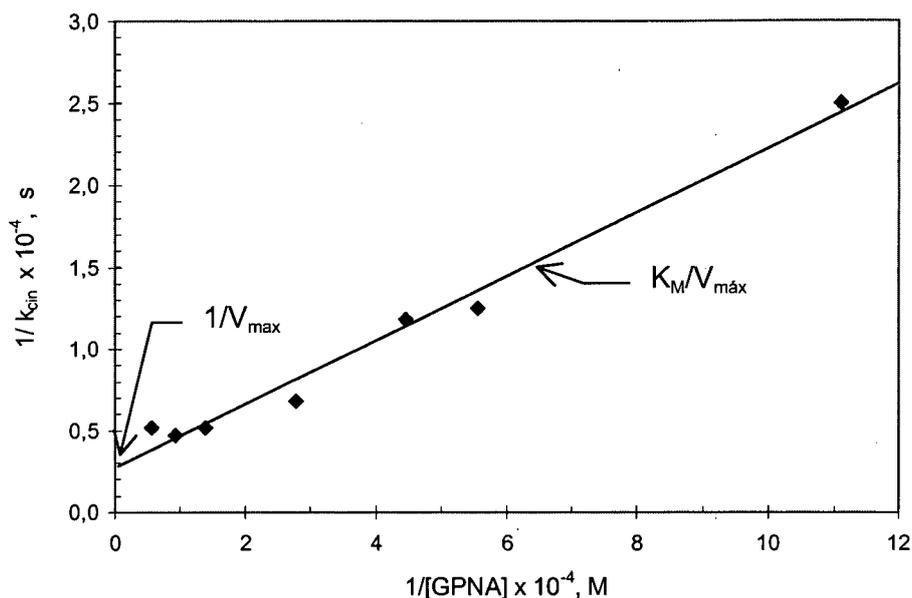


Figura 3.10 Gráfico da dupla recíproca para a reação de hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT em sistema micelar de AOT 0,2 M /heptano, $W_o = 10$, $[\alpha\text{-CT}]_{\text{final}} = 3,51 \times 10^{-6}$ M, tampão glicina (pH = 8,2), à 30°C.

O valor da constante de Michaelis, K_M , foi de $6,83 \times 10^{-5}$ M e a $V_{\text{máx}}$ de $3,68 \times 10^{-4}$ M s^{-1} . A $V_{\text{máx}}$ revela o número de renovação ou rotatividade (**Equação 14**).¹¹

$$V_{\text{máx}} = k_{\text{cat}} = n^{\circ} \text{ de renovação} \quad (\text{Eq.14})$$

O número de renovação, é o número de moles de substrato que reage para formar o produto por mol de enzima por unidade de tempo. A constante catalítica está relacionada com a concentração total de enzima $[E]_T$, de acordo com a **Equação 15**.

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_T} \quad (\text{Eq. 15})$$

Desta forma, a constante catalítica (k_{cat}) obtida foi de $1,05 \times 10^2$ s^{-1} .

Os resultados das medidas cinéticas obtidos para a reação de hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT, estão sumarizados na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7 Medidas cinéticas^(a) para reação de hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT em sistema de micela reversa de AOT 0,2 M / heptano, a 30°C.

Sistema	$V_{\text{máx}}$ (M s ⁻¹)	K_M (M) ^(b)	k_{cat} (s ⁻¹)
micela reversa ^(c)	$3,68 \times 10^{-4}$	$6,83 \times 10^{-5}$ ($2,22 \times 10^{-3}$) ^(d)	$1,05 \times 10^2$

(a) Determinado pelo gráfico da dupla recíproca da concentração de GPNA ($0,9 - 18,0 \times 10^{-5}$ M) e da constante cinética; (b) O valor de K_M calculado se refere à concentração do substrato em todo sistema micelar; (c) Micela reversa de AOT 0,2 M / heptano contendo α -CT ($3,51 \times 10^{-6}$ M), pH = 8,2 (tampão glicina 0,1 M) com $W_o = 10$; (d) O valor de K_M calculado se refere à concentração do substrato na pseudo-fase aquosa da micela reversa.

3.4 ESTUDOS CINÉTICOS DA α -CT EM SISTEMA DE MICELA REVERSA DE AOT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGUA (W_o) DA MICELA REVERSA, E DO pH DA SOLUÇÃO AQUOSA

Há um grande número de exemplos na literatura que tem estudado o comportamento de reações de hidrólise catalisada pela α -CT.^{49,50,51,84 e 98}. A grande maioria deles, estudaram a variação da concentração de água (W_o) na solução micelar e do pH na solução aquosa tamponada de α -CT injetada neste sistema.

Neste trabalho, foram realizados estudos cinéticos para acompanhar o comportamento da α -CT em solução de micela reversa durante o processo de desidratação da solução micelar, através da reação de hidrólise do GPNA, conforme já mencionado. Este estudo foi realizado, variando o pH da solução aquosa tamponada de α -CT injetada na micela reversa.

Para aumentar a concentração da enzima dentro das gotículas, sem aumentar a concentração da solução enzimática a ser injetada, pode-se trabalhar com W_o maior e depois remover a água seletivamente da solução micelar até obter o W_o desejado. A solução de micela reversa foi preparada injetando um determinado volume da solução aquosa de α -CT diretamente na solução de surfactante e óleo, obtendo uma solução micelar com $W_o = 10$, e desidratada através da fase vapor de LiCl até obter um $W_o < 1$.

Durante o processo de desidratação da solução micelar de AOT com α -CT, foram determinadas algumas propriedades cinéticas tais como constante cinética (k_{cin}), constante catalítica (k_{cat}), e a percentagem de conversão.

3.4.1 Influência do pH nos parâmetros cinéticos: constante cinética (k_{cin}) e constante catalítica (k_{cat})

A constante catalítica ou número de renovação da α -CT foi obtida a partir da constante cinética da reação de hidrólise do GPNA ($3,24 \times 10^{-4}$ M) em micela reversa de 0,2 M de AOT/heptano catalisada pela α -CT ($3,51 \times 10^{-6}$ M) em função do pH da solução

aquosa α -CT, injetada na solução de surfactante/heptano. No gráfico da **Figura 3.11**, pode-se observar que a constante de velocidade catalítica aumenta com o aumento do pH da solução de α -CT, até pH 9,8. Em pH mais elevado (11,2), e nas mesmas condições experimentais, não foi observada a reação de hidrólise. Conforme discutido anteriormente, nestas condições de pH, provavelmente ocorre a desnaturação da enzima.

No pH abaixo do $pI = 8,2$ a enzima tem maior número de cargas positivas e portanto, mais fortemente “ancorada” na superfície da micela reversa. Provavelmente esta “falta de liberdade” seja responsável pela redução do seu número de renovação, k_{cat} .

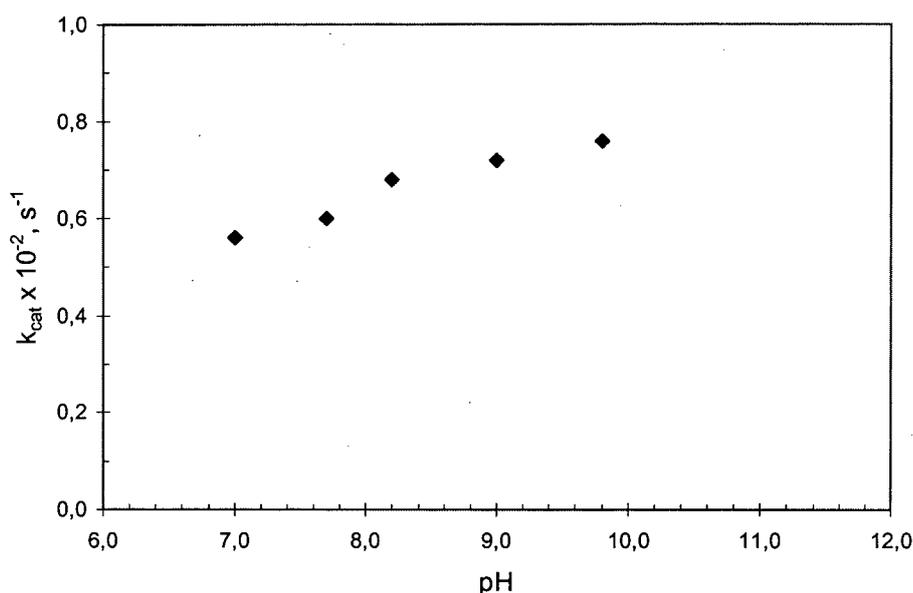


Figura 3.11 Influência do pH da solução aquosa tamponada de α -CT (tampão glicina 0,1M) injetada na solução de AOT/heptano, na constante de velocidade catalítica (k_{cat}) da reação de hidrólise do GPNA à 30°C. $[AOT] = 0,2$ M, $[\alpha\text{-CT}]_{final} = 3,51 \times 10^{-6}$ M, $[GPNA]_{final} = 3,24 \times 10^{-6}$ M.

No trabalho de Bello e col.⁵², eles verificaram a influência do pH do meio, na hidrólise de N-benzoil-L-tirosina etil éster em meio aquoso catalisada pela α -CT, e observaram que a constante catalítica aumenta com o aumento do pH. A faixa de pH estudada foi de 4,0 a 9,0. Este aumento da constante catalítica foi atribuído ao resíduo da histidina-57 que apresenta uma importante participação no processo catalítico com pK_a aparente em torno de 7,0.^{52,51}

O grau de conversão foi determinado a partir da curva de calibração da p-nitroanilina, preparada inicialmente (**Figura 2.3**). Observou-se que ele varia com o pH da solução aquosa de α -CT, sendo máximo em pH 9,0 (34,4 %). Entretanto, a constante de velocidade catalítica da enzima foi maior em pH 9,8 (**Tabela 3.8**).

Tabela 3.8 Influência do pH da solução aquosa de α -CT nos parâmetros cinéticos (constante cinética e catalítica) durante a reação de hidrólise do GPNA em solução micelar de AOT/heptano a 30°C.

pH	$k_{cin}^{(a)}$ $10^4 s^{-1}$	k_{cat} $10^{-2} s^{-1}$	% de Atividade	% de Conversão ^(b)
7,0	1,97	0,56	59,34	28,6
7,7	2,12	0,60	63,86	25,4
8,2	2,39	0,68	71,99	30,0
9,0	2,54	0,72	76,51	34,4
9,8	2,66	0,76	80,12	21,2
11,2	0,23	0,06	6,84	19,7

(a) Tempo de reação da hidrólise do GPNA: 3 horas; (b) A % de conversão aos produtos foi calculada após 12 horas de reação.

3.4.2 Influência da concentração de água nos parâmetros cinéticos

A atividade da α -CT na reação de hidrólise do GPNA foi medida em sistema de micela reversa de AOT/heptano a 30°C, em função do W_0 a partir da desidratação da solução de micela reversa de AOT contendo α -CT.

A atividade da enzima em função da concentração de água, foi determinada para diferentes pH*. Na **Tabela 3.9** pode-se observar que após 3 horas de desidratação da solução de micela reversa de AOT contendo α -CT em pH 7,0 ocorreu um aumento na

* Os pH da solução aquosa tamponada de α -CT (tampão glicina 0,1 M) usados nos experimentos foram de 7,0; 7,7; 8,2; 9,0; 9,8 e 11,2.

constante velocidade catalítica de $0,56 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ para $1,16 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$. Neste tempo de desidratação, a concentração de água diminuiu de $0,040 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ para $0,032 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$. Após a retirada de praticamente toda água, $[\text{H}_2\text{O}] = 0,003$ ($W_0 < 0,5$) a enzima ainda continuou ativa com 23,1% de conversão do GPNA

Tabela 3.9 Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA^(a) em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 7,0 (tampão glicina 0,1 M).

Tempo ^(b) (horas)	$[\text{H}_2\text{O}]^{(c)}$ $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$	$k_{\text{cin}} 10^{-4}$ (s^{-1})	$k_{\text{cat}} 10^{-2}$ (s^{-1})	% de Conversão ^(d)
0	0,040	1,97	0,56	28,6
1	0,035	1,81	0,52	29,1
3	0,032	4,07	1,16	24,2
7	0,024	1,86	0,53	23,3
12	0,020	2,03	0,58	22,5
24	0,007	(e)	(e)	(e)
48	0,003	1,56	0,44	23,1

(a) Condições da reação: tempo de três horas, $[\text{GPNA}]_{\text{final}}^{\#} = 3,24 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\alpha\text{-CT}]_{\text{final}}^{\#} = 3,51 \times 10^{-6} \text{ M}$; (b) Tempo de desidratação; (c) Valores médios de 5 medidas; (d) A % de conversão ao produto foi calculada após 12 horas de reação; (e) Medidas não realizadas.

Os resultados da atividade da α -CT em pH 7,7 são mostrados na **Tabela 3.10**. Pode-se observar uma maior atividade após 7 horas de desidratação quando a concentração de água foi reduzida para $0,022 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$. A constante de velocidade catalítica da α -CT diminuiu significativamente após 48 horas de desidratação ($0,15 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$), quando a micela reversa praticamente não apresentava mais água ($[\text{H}_2\text{O}] = 0,002 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$). O grau de hidrólise do GPNA também diminuiu após 48 horas de desidratação (10,2%).

[#] Concentrações usadas nas reações de hidrólise.

Tabela 3.10 Parâmetros de atividade da reação de hidrólise de GPNA^(a) catalisada por α -CT em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 7,7 (tampão glicina 0,1 M).

Tempo ^(b) (horas)	[H ₂ O] ^(c) mg μ L ⁻¹	k _{cin} 10 ⁻⁴ (s ⁻¹)	k _{cat} 10 ⁻² (s ⁻¹)	% de Conversão ^(d)
0	0,039	2,12	0,60	25,4
1	0,033	1,86	0,53	28,4
3	0,026	(e)	(e)	(e)
7	0,022	3,45	0,98	11,5
12	0,013	2,09	0,60	13,9
24	0,006	2,02	0,58	14,7
48	0,002	0,52	0,15	10,2

(a) Condições da reação: tempo de 3 horas, [GPNA]_{final} = $3,24 \times 10^{-4}$ M, [α -CT]_{final} = $3,51 \times 10^{-6}$ M; (b) Tempo de desidratação; (c) Valores médios de 5 medidas; (d) A % de conversão ao produto foi calculada após 12 horas de reação; (e) Medidas não realizadas.

Na reação de hidrólise do GPNA catalisada por α -CT em pH 8,2, foi observado um aumento na constante catalítica após 7 e 12 horas de desidratação da micela reversa sendo estes valores de $1,35 \times 10^2$ s⁻¹ e $2,02 \times 10^2$ s⁻¹, respectivamente ([H₂O]_{7 horas} = 0,021 mg μ L⁻¹ e [H₂O]_{12 horas} = 0,015 mg μ L⁻¹). Após 24 horas de desidratação, ([H₂O] = 0,010 mol μ L⁻¹), a constante catalítica da enzima diminuiu significativamente ($0,05 \times 10^2$ s⁻¹), acompanhada de uma redução no grau de hidrólise do GPNA (8,18%) (Tabela 3.11).

Tabela 3.11 Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA^(a) em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 8,2 (tampão glicina 0,1 M).

Tempo ^(b) (horas)	[H ₂ O] ^(c) mg μ L ⁻¹	k_{cin} 10 ⁻⁴ (s ⁻¹)	k_{cat} 10 ⁻² (s ⁻¹)	% de Conversão ^(d)
0	0,039	2,39	0,68	30,0
1	0,034	2,57	0,73	25,9
3	0,031	2,35	0,67	24,8
7	0,021	4,73	1,35	14,3
12	0,015	7,07	2,02	10,4
24	0,010	1,70	0,05	8,2
48	0,004	0,62	0,18	7,8

(a) Condições da reação: tempo de 3 horas, $[GPNA]_{final} = 3,24 \times 10^{-4}$ M, $[\alpha\text{-CT}]_{final} = 3,51 \times 10^{-6}$ M; (b) Tempo de desidratação; (c) Valores médios de 5 medidas; (d) A % de conversão ao produto foi calculada após 12 horas de reação.

Observa-se na **Tabela 3.12**, que em pH 9,0 a constante de velocidade catalítica da reação de hidrólise do GPNA catalisada por α -CT foi mais elevada ($0,90 \times 10^2$ s⁻¹) quando a concentração de água na micela reversa foi reduzida para 0,024 mg μ L⁻¹ após 7 horas de desidratação ($W_o \sim 6,7$). Após 24 horas de desidratação, quando a concentração de água diminuiu significativamente (0,006 mg μ L⁻¹), a constante catalítica diminuiu para $0,05 \times 10^2$ s⁻¹, acompanhada de uma diminuição no grau de hidrólise do GPNA para formar o produto, p-nitroanilina (9,93%).

Tabela 3.12 Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA^(a) em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 9,0 (tampão glicina 0,1 M).

Tempo ^(b) (horas)	[H ₂ O] ^(c) mg μ L ⁻¹	k_{cin} 10 ⁻⁴ (s ⁻¹)	k_{cat} 10 ⁻² (s ⁻¹)	% de Conversão ^(d)
0	0,041	2,54	0,72	34,4
1	0,036	2,14	0,61	33,8
3	0,034	2,28	0,65	29,7
7	0,024	3,15	0,90	16,8
12	0,009	2,12	0,60	14,4
24	0,006	1,84	0,05	9,9
48	0,003	0,65	0,19	9,9

(a) Condições da reação: tempo de 3 horas, $[GPNA]_{final} = 3,24 \times 10^{-4}$ M, $[\alpha\text{-CT}]_{final} = 3,51 \times 10^{-6}$ M; (b) Tempo de desidratação; (c) Valores médios de 5 medidas; (d) A % de conversão ao produto foi calculada após 12 horas de reação.

Em pH 9,8 foi observado uma maior atividade ($k_{cat} = 2,40 \times 10^2$ s⁻¹) quando a concentração de água foi reduzida para 0,021 mg μ L⁻¹ ($W_o \sim 5,8$), no final de 7 horas de desidratação. Com 12 horas de desidratação da solução micelar contendo α -CT, foi verificado a formação de um precipitado protéico branco que aumentava a medida que a água estava sendo retirada do sistema micelar. A constante de velocidade de hidrólise do GPNA foi diminuindo, sendo que após 24 horas de desidratação a reação não foi mais observada (Tabela 3.13).

Tabela 3.13 Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA^(a) em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 9,8 (tampão glicina 0,1 M).

Tempo ^(b) (horas)	[H ₂ O] ^(c) mg μ L ⁻¹	$k_{cin} 10^{-4}$ (s ⁻¹)	$k_{cat} 10^{-2}$ (s ⁻¹)	% de Conversão ^(d)
0	0,038	2,66	0,76	21,2
1	0,036	2,01	0,57	24,3
3	0,030	1,22	0,35	18,13
7	0,021	8,42	2,40	14,4
12	0,009	2,75	0,78	9,1
24	0,006	(e)	(e)	(e)
48	0,002	(e)	(e)	(e)

(a) Condições da reação: tempo de 3 horas, $[GPNA]_{final} = 3,24 \times 10^{-4}$ M, $[\alpha\text{-CT}]_{final} = 3,51 \times 10^{-6}$ M; (b) Tempo de desidratação; (c) Valores médios de 5 medidas; (d) A % de conversão ao produto foi calculada após 12 horas de reação; (e) Não houve reação.

A atividade da α -CT em pH 11,2 foi muito menor que nos demais pH estudados. Após 3 horas de desidratação e com a concentração de água levemente reduzida para 0,031 mg μ L⁻¹ houve a formação do precipitado protéico branco, e a partir de deste tempo, não foi mais verificado a reação de hidrólise do GPNA. Este resultado mostra que mesmo na presença de água, a reação de hidrólise não mais ocorreu, e é possível supor que a enzima precipitada não se encontra em estado “dormente”, e sim está inativada. Isto pode ser comprovado após a reidratação do sistema micelar contendo α -CT, que será apresentado a seguir (Tabela 3.14).

Tabela 3.14 Parâmetros de atividade da α -CT na hidrólise de GPNA^(a) em sistema de micela reversa de AOT, em função da concentração de água. O pH da solução aquosa tamponada de α -CT foi de 11,2 (tampão glicina 0,1 M).

Tempo ^(b) (horas)	[H ₂ O] ^(c) mg μ L ⁻¹	$k_{cin} 10^{-4}$ (s ⁻¹)	$k_{cat} 10^{-2}$ (s ⁻¹)	% de Conversão ^(d)
0	0,038	0,23	0,06	19,7
1	0,037	0,97	0,28	17,3
3	0,031	0,03	0,01	16,9
7	0,020	(e)	(e)	(e)
12	0,008	(e)	(e)	(e)
24	0,006	(e)	(e)	(e)
48	0,003	(e)	(e)	(e)

(a) Condições da reação: tempo de 3 horas, $[GPNA]_{final} = 3,24 \times 10^{-4}$ M, $[\alpha\text{-CT}]_{final} = 3,51 \times 10^{-6}$ M; (b) Tempo de desidratação; (c) Valores médios de 5 medidas; (d) A % de conversão ao produto foi calculada após 12 horas de reação; (e) Não houve reação.

A atividade da enzima em função do tempo de desidratação e do pH da solução micelar contendo α -CT pode ser melhor visualizado na **Figura 3.12**. A α -CT apresentou um aumento da atividade após 7 horas de desidratação, para os pH 7,7; 9,0 e 9,8. Para o pH 8,2 ocorreu um aumento na atividade após 7 e 12 horas de desidratação, quando a concentração de água foi reduzida para 0,021 e 0,015 mg μ L⁻¹. Após 24 horas de desidratação, em todos pH estudados, observou-se uma diminuição drástica da constante de velocidade catalítica de hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT, acompanhada de redução na percentagem de conversão. Este resultado demonstra que houve uma retenção da atividade, sendo que a presença de água na micela reversa é extremamente importante para que a α -CT possa catalisar a reação de hidrólise.⁹⁶

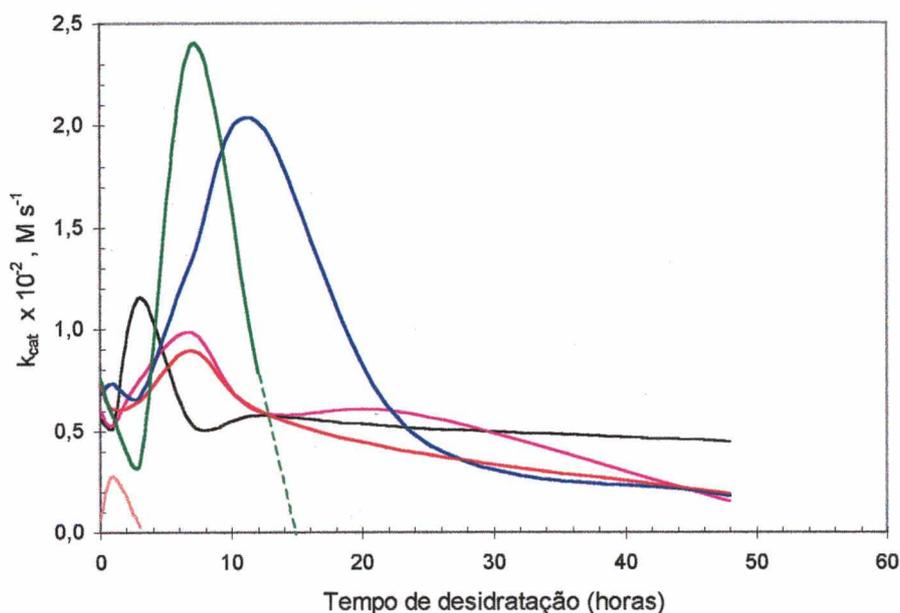


Figura 3.12 Grau de atividade da α -CT na reação de hidrólise de GPNA em função do tempo de desidratação da micela reversa de AOT/heptano com α -CT em diferentes pH. (—) pH 7,0; (—) pH 7,7; (—) pH 8,2; (—) pH 9,0; (—) pH 9,8; (—) pH 11,2. $[AOT] = 0,2 \text{ M}$, $[\alpha\text{-CT}]_{\text{final}} = 3,51 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[GPNA]_{\text{final}} = 3,24 \times 10^{-4} \text{ M}$. $W_0_{\text{inicial}} = 10$.

Para que o objetivo principal deste trabalho pudesse ser atingido, foi verificado se a enzima após a desidratação da solução de micela reversa, realmente permanece com a atividade reduzida isto é em estado “dormente”, ou se ela está inativada.

Após 48 horas de desidratação, as soluções de micela reversa foram retiradas do reator e transferidas para frascos hermeticamente fechados e estocadas em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$), durante 21 dias. Alíquotas foram retiradas no terceiro, décimo quinto e no vigésimo primeiro dia, e reidratadas com solução tampão glicina 0,1 M em seus respectivos pH, até obter novamente soluções de micela reversa com $W_0 = 10$. Estas soluções foram então usadas para efetuar a hidrólise do GPNA. Nas **Tabela 3.15** e **3.16**, são mostrados os resultados do grau de atividade e de conversão respectivamente, em função da reidratação das soluções micelares.

Tabela 3.15 Constantes de velocidade catalítica obtidas a partir das reações de hidrólise do GPNA^(a) catalisadas pela α -CT em soluções micelares AOT 0,1 M antes e após 48 horas de desidratação e depois de reidratadas.

	Constante catalítica 10^{-2} s^{-1}					
	pH 7,0	pH 7,7	pH 8,2	pH 9,0	pH 9,8	pH 11,2
Sem desidratar ($W_0 = 10$)	0,56	0,60	0,68	0,72	0,76	0,06
Desidratado _{48h} ($W_0 < 1,0$)	0,44	0,15	0,18	0,19	(e)	(e)
Reidratado 3dias ^(b)	0,36	0,31	0,41	0,52	(e)	(e)
Reidratado 15dias ^(c)	2,17	0,30	0,40	0,50	(e)	(e)
Reidratado 21dias ^(d)	0,34	0,30	0,42	0,28	(e)	(e)

(a) Condições da reação: tempo de 3 horas, $[\text{GPNA}]_{\text{final}} = 3,24 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\alpha\text{-CT}]_{\text{final}} = 3,51 \times 10^{-6} \text{ M}$;

(b) A reidratação foi realizada após a solução permanecer estocada por 3 dias em temperatura ambiente;

(c) A reidratação foi realizada após a solução permanecer estocada por 15 dias em temperatura ambiente;

(d) A reidratação foi realizada após a solução permanecer estocada por 21 dias em temperatura ambiente;

(e) Não houve reação.

Os resultados da **Tabela 3.15** mostram que as soluções de micela reversa de AOT contendo α -CT após serem desidratadas diminuíram significativamente sua atividade, nos pH estudados. Somente em pH 7,0 a diminuição não foi acentuada. Em pH 7,7 a solução micelar desidratada e estocada por 3 dias, e quando reidratada, a constante catalítica aumentou de $0,15 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ para $0,31 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$. Após manter estocada por 21 dias, a solução micelar ao ser reidratada manteve a atividade catalítica

Em pH 8,2 após 48 horas de desidratação, a constante catalítica diminuiu para $0,18 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$, e quando mantida em estoque por 3 dias e reidratada a constante aumentou para $0,41 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$. Após 21 dias estocada, a solução micelar ao ser reidratada mostrou um leve aumento no valor da constante catalítica. Para o pH 9,0 após a reidratação da solução micelar de α -CT, a atividade da enzima aumentou, passou de $0,19 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ (48 horas de desidratação), para $0,52 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ após a reidratação. Após estocagem por 21 dias, a solução micelar ao ser reidratada mostrou uma diminuição no valor da constante catalítica para $0,28 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$

Em pH 9,8 e 11,2 após a rehidratação, não houve a reação de hidrólise, o que mostra que a enzima ao precipitar foi inativada, não recuperando mais sua atividade, conforme discutido na página 61, segundo parágrafo.

Na **Tabela 3.16**, observa-se um aumento significativo no grau de hidrólise da reação de GPNA catalisada pela α -CT em todos pH estudados, após a rehidratação da micela reversa. Quanto ao tempo de estocagem, verificou-se que após 21 dias não houve diminuição significativa na constante de velocidade catalítica nos pH 7,0; 7,7 e 8,2, mostrando que a enzima permanece estável na solução de micela reversa de AOT com baixos teores de água. Isto mostra que, nestas condições a enzima se encontra em estado “dormente”.

Tabela 3.16 Grau de conversão em produto p-nitroanilina^(a), função das soluções micelares de AOT 0,2 M contendo α -CT em diferentes pH antes e após 48 horas de desidratação e depois de reidratadas.

	% de Conversão ^(b)					
	pH 7,0	pH 7,7	pH 8,2	pH 9,0	pH 9,8	pH 11,2
Sem desidratar ($W_0 = 10$)	28,6	25,4	30,0	34,4	21,2	19,7
Desidratado_{48h} ($W_0 < 1$)	23,16	10,2	7,8	9,1	(f)	(f)
Reidratado 3dias^(c)	19,8	21,9	24,2	25,0	(f)	(f)
Reidratado 15dias^(d)	24,7	21,9	24,6	22,6	(f)	(f)
Reidratado 21dias^(e)	27,47	27,5	31,3	25,3	(f)	(f)

(a) Condições da reação: tempo de 3 horas, $[GPNA]_{\text{final}} = 3,24 \times 10^{-4}$ M, $[\alpha\text{-CT}]_{\text{final}} = 3,51 \times 10^{-6}$ M;

(b) A % de conversão ao produto foi calculada após 12 horas de reação;

(c) A reidratação foi realizada após solução permanecer estocada por 3 dias em temperatura ambiente;

(d) A reidratação foi realizada após solução permanecer estocada por 15 dias em temperatura ambiente;

(e) A reidratação foi realizada após solução permanecer estocada por 21 dias em temperatura ambiente;

(f) Não houve reação.

No trabalho desenvolvido por Carlile e col. com a CV Lipase em solução de micela reversa de AOT, a atividade foi totalmente recuperada após a reidratação da solução micelar de AOT. Foi verificado que a enzima em solução de micela reversa desidratada pode permanecer estocada por 28 dias.⁹⁶

A partir dos resultados obtidos, pode-se postular que sistemas micelares são potencialmente viáveis para serem desidratados, com o objetivo de obter enzimas em estado “dormente”, com possíveis usos nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Estas poderão ser utilizadas na biogeração instantânea de aromas a partir de precursores mais estáveis na hora do consumo, especialmente quando a liberação do aroma ocorre lentamente na boca, por exemplo: gomas de mascar, produtos dentários, xaropes.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e discutidos no processo de transferência reversa de α -CT da solução de micela reversa para a fase aquosa receptora de NaOH, e em relação ao estudo da desidratação da micela reversa de AOT e o da atividade catalítica pode-se concluir que:

- O método de Lowry usado para quantificar a α -CT após a transferência da micela reversa de AOT e de SbPC para a fase aquosa de NaOH foi eficiente.
- O método de transferência reversa usado por Pires e col. com as modificações propostas neste trabalho, mostrou ser eficiente para a transferência da α -CT da micela reversa de AOT para a fase aquosa receptora de NaOH. Usando SbPC, observou-se que, além da α -CT, parte do surfactante também foi transferido para a fase aquosa. Com os surfactantes CTAB e $C_{12}E_4$, a transferência reversa da α -CT para a fase aquosa receptora não foi eficiente.
- O tempo de agitação não interferiu na transferência da α -CT da micela reversa de AOT para a fase aquosa receptora. Quando o SbPC foi usado como surfactante, o tempo de agitação influenciou neste processo.
- Verificou-se que a solução micelar com mais de 10 dias de preparação e estocada em geladeira, não era estável. Nestas condições, aumentou a quantidade de SbPC transferida junto com a enzima para a fase aquosa receptora.
- O processo de transferência reversa foi influenciado pelo pH da solução aquosa de α -CT injetada na solução orgânica de AOT e de SbPC. A mudança do pH no interior da micela reversa interfere na etapa de coalescência alterando a interação da proteína com o surfactante.
- O sistema de desidratação através do equilíbrio da fase vapor da solução micelar com o LiCl umedecido foi eficiente para retirar a água do interior da micela reversa de AOT. A concentração da água foi reduzida para $\sim 0,006 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ após 24 h de desidratação, e aproximadamente $0,003 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ após 48 h.
- O método direto (medidas de absorbância a 280 nm) foi o mais adequado para determinar o teor protéico presente na micela reversa de AOT durante a desidratação.
- Nas soluções de micelas reversas em pH 9,8 e 11,2; foram observadas a formação de um precipitado protéico branco e perda da atividade catalítica. A percentagem de

precipitado formado foi quantificada como sendo a quantidade de α -CT recuperada, sendo que os valores foram 18,6% e 29,5%, respectivamente.

- Nos estudos cinéticos, foi estudada a reação de hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT em sistema de micela reversa de AOT / heptano a 30 °C e pH 8,2. Os valores da constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) obtidos foram $6,83 \times 10^{-5}$ M e $3,68 \times 10^{-4}$ M s⁻¹, respectivamente. O valor da constante catalítica (k_{cat}) foi de $1,05 \times 10^2$ s⁻¹.
- As constantes catalíticas (k_{cat}) para a reação de hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT em sistema de micela reversa e o grau de conversão ao produto aumentaram com o aumento do pH da solução aquosa de α -CT injetada na micela reversa de AOT, até pH 9,8. Em pH 11,2 a k_{cat} diminuiu drasticamente.
- Os valores dos parâmetros de atividade (k_{cin} , k_{cat} e % de conversão) para a reação de hidrólise do GPNA catalisada pela α -CT em sistema de micela reversa nos diferentes valores de pH (7,7; 8,2; 9,8 e 11,2), foram menores com a diminuição da concentração de água durante a desidratação. Com teor de água $< 0,006$ mg μ L⁻¹, as reações foram muito lentas. Somente em pH 7,0 não foi observado uma redução significativa nos valores dos parâmetros de atividade, após a redução da água.
- Durante a reidratação do sistema de micela reversa com α -CT, foi mostrado que a enzima contida na micela reversa permaneceu em estado "dormente", sendo que, após a introdução de solução aquosa tamponada, ela recuperou sua atividade em pH 7,7; 8,2 e 9,8.
- Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a viabilidade de usar enzimas em estado "dormente" para a obtenção de aromas instáveis com possíveis aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

5. BIBLIOGRAFIA

1. STRYER, L. **Bioquímica**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992.
2. WONG, C.; WHITESIDES, M. **Tetrahedron Organic Chemistry Series**. 1^a ed. Pergamon, v.12, Enzymes in synthetic organic chemistry, 1994.
3. LEHNINGER, A. **Bioquímica: Componentes Moleculares das Células**. Edgard Blücher Ltda, 1976.
4. KLIBANOV, A.M. Asymmetric transformations catalysed by enzymes in organic solvents. **Ace. Chem. Res.**, v.23, 114, 1990.
5. VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1990.
6. MORRISON, R.; BOYD, R. **Organic chemistry**. 6th. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1992.
7. PALMER, T. **Understanding Enzymes**. 4^a ed. London: Prentice Hall-Ellis Horwood, 1995.
8. CASTRO, F. H.; ANDERSON, W. A.. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v.18, n.6, p.544-554, 1995.
9. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). **Enzyme Nomenclature**. Disponível na internet. <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme>. Março de 2000.
10. KIRBY, A. J. Enzyme mechanisms, models, and mimics. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v.35, p.707-723, 1996.
11. CAMPBELL, M. K., **Biochemistry**. 2th. USA: Saunders Publishing College, 1995.
12. FERSHT, A. **Estructura y mecanismo de las enzimas**. Espanha: Editorial Reverté, S. A., 1980.
13. HEDSTROM, L.; SZILAGYI, L.; RUTTER, W.J.. Converting trypsin and chymotrypsin: the role of surface loops. **Science**, v.255, n.5049, p.1249-1254, 1992.

14. BLOW, D. M. Structure and mechanism of chymotrypsin. **Acc. Chem. Res.**, v.9, p.145-152, 1974.
15. REES, G. D.; NASCIMENTO, M. G.; JENTA, T. R. J. Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organo-gels. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1073, p.493-501, 1991.
16. KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. **Enzymatic reactions in organic media**. 1^a ed. London: Blackie Academic & Professional, 1996.
17. FLETCHER, P. D. I.; ROBINSON, B. H. Activity of lipase in water-in-oil microemulsions. **J.Chem.Soc., Faraday Trans. I**, v.81, p.2667-2679, 1985.
18. HAERING, G. ; LUISI, P. L. Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsions. **J.Phys. Chem.**, v.90, p.5892-5895, 1986.
19. SKAGERLIND, P.; JANSSON, M. Surfactant interference on lipase catalysed reactions in microemulsions. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.54, p.277-282, 1992.
20. KVITTINGER, L. Some aspects of biocatalysis in organic solvents. **Tetrahedron**, v.50, p.8253-8274, 1994.
21. GREEN, K. D.; GILL, I. S.; KHAN, J. A. et al.. Microencapsulation of yeast cells and their use as a biocatalyst in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.**, v.49, p.535-543, 1996.
22. NOUNGRANA, T.; NORDE, W. Thermal stability and enzymatic activity of alpha-chymotrypsin adsorbed on polystyrene surfaces. **Colloids and Surfaces. b, Biointerfaces.**, v.9, n.3 e 4, p.157, 1997.
23. SHIOI, A.; KISHIMOTO, T.; HARADA, M.. Reativity of α -chymotrypsin in reversed micelles containing nonionic surfactants. **J. Chem. Eng. Jpn.**, v.30, n.6, p.1130, 1997.
24. CLICEK, H.; TUNCEL, A. Immobilization of α -chymotrypsin in thermally reversible isopropylacrylamide-hydroxyethyl-methacrylate copolymer gel. **J. Polym. Sci. Part A, Polym. chem.**, v.36, n.4, p.543, 1998.

25. CHIN, J. T.; WHEELER, S. L.; KLIBANOV, A. M. Communication to the editor on protein solubility in organic solvents. **Biotech. Bioeng.**, v.44, p.140-145, 1994.
26. CAMBOU, B.; KLIBANOV, A. M. Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalysed stereospecific transesterification in organic media. **J. Amer. Chem. Soc.**, v.106, p.2687-2692, 1984.
27. BRADY, C.; METCALFE, L.; SLABOSZEWSKI, D. et al. Lipase immobilized on a hydrophobic, microporous support for the hydrolysis of fats. **J. Amer. Oil Chem.Soc.**, v.65, p.917-921, 1988.
28. COMERLATO, M.H. **Imobilização de enzimas no suporte crisotila**. Campinas - SP, 1995. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
29. JESUS, P.C.. **Lipases imobilizadas em crisotila e organo-gel: aplicação na resolução de ácidos racêmicos**. Florianópolis -SC, 1998. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
30. RUCKENSTEIN, E.; WANG, X. Lipase immobilized on hydrophobic, porous polymer supports by concentrated emulsion polymerization and their activity in the hydrolysis of triacylglycerides. **Biotechnol. Bioeng.**, v.42, p.821-828, 1993.
31. BASRI, M.; AMPON, K.; YUNUS, W. M. et al. Immobilized of hydrophobic lipase derivatives on to organic polymer beads., **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.59, p.37-44, 1994.
32. KAWAKAMI, K.; ABE T.; YOSHIDA, T. Silicone-immobilized biocatalysts effective for bioconversions in nonaqueous media.. **Enz. Microb. Technol.**, v.14, p.371-375, 1992.
33. KISE, H.; HAYAKAWA, A.; NORITOMI, H. Enzymes reactions in aqueous-organic media. IV. Chitin- α -chymotrypsin complex as a catalyst for amino acid esterification and peptide synthesis in organic solvents. **Biotechnol. Lett.**, v.9, p.543-548, 1987.

34. MATSUSHIMA, A.; NISHIMURA, H.; ASHIHARA, Y. et al. Modification of *E. coli* aspariginase with 2,4-bis(*O*-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-S-triazine (activated PEG2); disappearance of binding ability towards anti-serum and retention of enzymic activity. **Chem. Lett.**, p.773-776, 1980.
35. LJUNGER, G.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Reactions catalysed by PEG-modified α -chymotrypsin in organic solvents. Influence of water content and degree of modification. **Biocatalysis**, v.7, p.279-288, 1993.
36. ITO, Y.; FUJII, H.; IMANISHI, Y. Catalytic peptide synthesis by trypsin modified with polystyrene in chloroform. **Biotechnol. Prog.**, v.9, p.128-130, 1993.
37. DAVEY, J.P.; PRYCE, R.J.; WILLIAMS, A. Microgels as soluble enzyme supports in organic media. **Enz. Microb. Technol.**, v.11, p.657-661, 1989.
38. SCOTT, C.D; SCOTT, T.C.; WOODWARD, C.A. Use of dinitrofluorobenzene to modify enzymes for enhanced solubilization and activity in organic solvents. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.39/40, p.279-287, 1993.
39. AMPON, K.; MEANS, G.E. Immobilization of proteins on organic polymer beads. **Biotechnol. Bioeng.**, v.32, p.689-697, 1988.
40. MURAKAMI, M.; KAWASAKI, Y.; KAWANARI, M. et al. Transesterification of oil by fatty acid-modified lipase. **J. Amer. Oi Chem. Soc.**, v.70, p.571-574, 1993.
41. OKAHATA, Y.; IJIRO, K. Preparation of a lipid-coated lipase and catalysis of glyceride ester in homogeneous organic solvents. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v.65, p.2411-2420, 1992.
42. GOTO, M.; KAMEYAMA, H.; GOTO, M. et al. Design of surfactants suitable for surfactant-coated enzymes as catalysis in organic media. **J. Chem. Eng. Jpn.**, v.26, p.109-111, 1993.
43. OTAMIRI, M.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Complex formation between chymotrypsin and ethyl cellulose as a means to solubilize the enzyme in active form in toluene. **Biocatalysis**, v.6, p.291-305, 1992.

44. VAKUROV, A.V.; GLADILIN, A.K.; LEVASHOV, A.V. et al. Dry enzyme-polymer complexes: stable organosoluble biocatalysts for nonaqueous enzymology. **Biotechnol. Lett.**, v.16, p.175-178, 1994.
45. KHMELNITSKY, Y.L.; NEVEROVA, I.N.; MOMTCHEVA, R. et al. Surface-modified polymeric nanogranules containing entrapped enzymes: a novel biocatalyst for use in organic media. **Biotechnol. Lett.**, v.3, p.275-280, 1989.
46. SVENSSON, M.; REES, G.D.; ROBINSON, B.H. et al. Phospholipid-stabilised water-in-oil microemulsions: A study of ester synthesis by *Humicola lanuginosa* lipase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.8, p.101-111, 1996.
47. REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; STEPHENSON, G.R. Macrocyclic lactone synthesis by lipases in water-in-oil microemulsions. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1257, p.239-248, 1995.
48. REES, G.D.; ROBINSON, B.H. Esterification reactions catalyzed by *chromobacterium viscosum* lipase in ctab-based microemulsion systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v.45, p.344-355, 1995.
49. FLETCHER, P.D.I.; REES, G.D.; ROBINSON, B.H. et al. Kinetic properties of α -chymotrypsin in water-in-oil microemulsion systems. **Biochim. Biophys. Acta**, v.832, p.204-214, 1985.
50. FLETCHER, P.D.I.; FREEDMAN, R.B.; MEAD, J. et al. Reactivity of α -chymotrypsin in water-in-oil microemulsions. **Colloids and Surfaces**, v.10, p.193-203, 1984.
51. BARBARIC, S.; LUISI, P.L. Micellar Solubilization of biopolymers in organic solvents. 5. Activity and conformation of α -chymotrypsin in isooctane-aot reverse micelles. **J. Am. Chem. Soc.**, v.103, p.4239-4244, 1981.
52. BELLO, J.F.; LLAMA, E.F.; DEL CAMPO, C. Structure-activity relationship in the hydrolysis of N-benzoylphenylalanine esters catalyzed by alpha-chymotrypsin. **J. Molecular Catalysis**, v.78, n.1, p.91-112, 1993.

53. SUZAWA, V.M.; KHMLNITSKY, Y.L.; GIARTO, L. et al. Suspended and immobilized chymotrypsin in organic media: structure-function relationships revealed by electron spin resonance spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, v.16, p.8435-8440, 1995.
54. JENTA, T.R.J.; BATTS, G.; ROBINSON, B.H. Kinetic studies of by *Chromobacterium viscosum* lipase in AOT water-in-oil. **Biotechnol. Bioeng.**, v.54, n.5, p.416-427, 1997.
55. CALDARARU, H.; TIMMINS, G.S.; GILBERT, B.C. Dynamics of spin-labelled α -chymotrypsin in reverse micelles of differently charged surfactants. **J. Chem Soc.: Faraday Trans.**, v.92, n.17, p.3151-3155, 1996.
56. OLDFIELD, C.; FREEDMAN, R.B.; ROBINSON, B.H.; Solubilization of α -chymotrypsin by water-in-oil microemulsions. An analytical ultracentrifugation study. **J. Chem Soc.: Faraday Trans.**, v.92, n.1, p.73-83, 1996.
57. ATKINSON, P.J.; ROBINSON, B.H.; GRIMSON, M.J. et al. Structure of microemulsion-based organo-gels. **Chem. Brit.** v.82, p.542-545, 1991.
58. REES, G.D.; JENTA, T.R.J.; NASCIMENTO, M.G. et al. Use of water-in-oil microemulsions and gelatin-containing microemulsion-based gels for lipase-catalysed ester synthesis in organic solvents. **Indian J. Chem.**, v.32B, p.30-34, 1993.
59. REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; Microemulsions and organogels: properties and novel applications. **Advanced Materials**, v.9, p.608-619, 1993.
60. REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; STEPHENSON, G.R. Preparative-scale kinetic resolutions catalysed by microbial lipases immobilised in AOT-stabilised microemulsion-based organogels: cryoenzymology as a tool for improving enantioselectivity. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1259, p.73-81, 1995.
61. JENTA, T.R.J.; BATTS, G.; REES, G.D. et al. Biocatalysis using gelatin microemulsion-based organogels containing immobilized *Chromobacterium viscosum* lipase. **Biotechnol. Bioeng.**, v.53, p.121-131, 1997.

62. AGUIAR, L.M.Z. Estudo da atividade enzimática e das propriedades físico-químicas do organo-gel através de reações catalisadas pela cv lipase. **Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, 1992.**
63. NASCIMENTO, M.G.; REZENDE, M.C.; VECCHIA, R.D. et al. Enzyme-catalysed esterifications in microemulsion-based organo gel. **Tetrahedron Lett.**, v.33, p.5891-5894, 1992.
64. AGUIAR, L.M.Z.; NASCIMENTO, M.G.; PRUDENCIO, G.E. et al. The preparation of microemulsion-based gels of n-hexane or cyclohexane for enzyme immobilization. **Química Nova**, v.16, p.414-415, 1993.
65. JESUS, P.C.; REZENDE, M.C.; NASCIMENTO, M.G. Enzymatic resolution of alcohols via lipases immobilized in microemulsion-based organo gel. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.6, p.63-66, 1995.
66. JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F. et al. Lipases imobilizadas em organo-gel e sua aplicação em síntese orgânica. **Anais do II Seminário Internacional de Tecnologia Enzimática.**, v.2, 1995.
67. LIMA, C.; SILVA, P.L.F.; NASCIMENTO, M.G. et al. The use of immobilized lipases on chrysotile for esterification reactions. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.7, n.3, p.173-175, 1996.
68. JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F. et al. Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e a sua aplicação em síntese orgânica. **Química Nova.**, v.20, p.664-672, 1997.
69. JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F. et al. Enantioselective esterification of 2-methylpentanoic acid catalysed via immobilized lipase in chrysotile and microemulsion-based gels. **Synthetic Communications**. No prelo, v.15, 1998.
70. KHMELNITSKY, Y. L.; LEVASHOV, D.; KLYACHKO, N. et al. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. **Enz. Microb. Technol.**, v.10, p.710-724, 1988.

71. KHMELNITSKY, Y. L.; MOZHAEV, V.; BELOVA, A. et al. Denaturation capacity: a new qualitative criterion for selection of organic solvents as reaction media biocatalysis. **Eur. J. Biochem.**, v.198, p.31-41, 1991.
72. KATAYAMA, H.; TAGAWA, T. KUNIEDA, H.. Polymer-oil microemulsions. **J. Colloid Interface Sci.**, v.3, n.5, p.2785, 1992.
73. LUISI, P. L.; GIOMINI, M.; PILENI, M. P. et al. Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. **Biochim. Biophys. Acta**, v.947, p.209-246, 1988.
74. HINZE, W. L.; Overview of the utilization of reversed micellar in analytical spectroscopy. **Organized Assemblies in Chemical Analysis.**, v.1, p.37-105, 1994.
75. SHIELD, J. W.; FERGUSON, H. D.; GLEASON, K. K. et al. Enzymatic reactions in reversed micelles at low solubilized water concentrations. **A.C.S. Symposium series 392**. Washington: American Chemical Society, p.90-103, 1989.
76. FLETCHER, P.D.I., The partitioning of solute between water-in-oil microemulsions and conjugates aqueous phases. **J. Chem. Soc., Faraday Trans. I**, v.82, p.2651-2664, 1986.
77. WOLBERT, R. B. G.; HILHORST, R.; VOLSKUILEN, G. et al. Protein transfer from an aqueous phase into reversed micelles – The effect of protein size and charge distribution. **Eur. J. Biochem.**, v.184, p.627-633, 1989.
78. DEKKER, M.; VAN'T RIET, K.; BIJSTERBOSCH, B. H. et al. Mass transfer rate of protein extraction with reversed micelles. **Chem. Eng. Sci.**, v.45, n.9, p. 2949-2957, 1990.
79. LESER, M. E., MRKOCI, K.; LUISI, P. L. Reverse micelles in protein separation: the use of silica of the the back-transfer process. **Biotech. Bioeng.**, v.41, p.489-492, 1993.
80. PARADKAR, V.; DORDICK, J. S. Mechanism of extraction of chymotrypsin into isooctane at very low concentrations of aerosol OT in the absence of reversed micelles. **Biotech. Bioeng.**, v.43, p.529-540, 1994.

-
81. TOWEY, T. F.; REES, G. D.; STEYLER, D. C. et al. Winsor-II microemulsion systems in bioseparations - a model reaction for extractive bioconversions. **Bioseparation**, v.4, p.139-147, 1994.
 82. NISHIKI, T.; SATO, I.; MUTO, A. et al. Mass transfer characterization in forward and back extractions of lysozyme by AOT-isooctane reverse micelles across a flat liquid-liquid interface. **Biochem. Eng. J.**, v.1, p.91-97, 1998.
 83. NGUYEN, H.; JOHN, V. T.; REED, W. F. Characteristics of protein-containing reversed micelles subjected to clathrate hydrate formation conditions. **J. Phys. Chem.**, v.95, p.1467-1471, 1991.
 84. ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE, A. P.; CHAIMOVICH, H. Stability and activity modulation of chymotrypsins in AOT reversed micelles by protein-interface interaction. Interaction of α -chymotrypsin with a negative interface leads to a cooperative breakage of salt bridge that keeps the catalytic active conformation (Ile¹⁶-Asp¹⁹⁴). **Biotech. Bioeng.**, v.59, n.3, p.360-363, 1998.
 85. KAWAI-HIRAI, R.; HIRAI, M.; IWASE, H. et al. Solvent contrast variation study of w/o AOT microemulsions using small-angle neutron scattering. **Physica B.**, v.241-243, p.984-986, 1998.
 86. HAYES, D. G. Mechanism of protein extraction from the solid state by water-in-oil microemulsions. **Biotech. Bioeng.**, v.53, n.6, p.583-593, 1997.
 87. HAYES, D. G.; MARCHIO, C. Expulsion of protein from water-in-oil microemulsions by treatment with cosurfactant. **Biotech. Bioeng.**, v.59, n.5, p.557-566, 1998.
 88. LUISI, P. L. Enzymes hosted in reverse micelles in hydrocarbon solution. **Angewandte Chemie**, v.24, n.6, p.439-528, 1985.
 89. MARCOZZI, G.; CORREA, L.; LUISI, P. L. et al. Protein extraction by reverse micelles: A study of the factors affecting the forward and backward transfer of α -chymotrypsin and its activity. **Biotech. Bioeng.**, v.38, p.1239-1246, 1991.

90. GUPTA, R. B.; HAN, C. J. JOHNSTON, K.P. Recovery of proteins and amino acids from reverse micelles by dehydration with molecular sieves. **Biotech. Bioeng.**, v.44, p.830-836, 1994.
91. HILHORST, R.;SERGEEVA, M.; HEERING, D. et al. Protein extraction from an aqueous phase into reversed micellar phase: effect of water content and reversed micellar composition. **Biotech. Bioeng.**, v.46, p. 375-387, 1995.
92. KELLEY, B. A.; WANG, D. I. C.; HATTON, A. Affinity-based reversed micellar protein extraction: I. Principles and protein-ligand systems. **Biotech. Bioeng.**, v.42, p.1199-1208, 1993.
93. WOLL, J. M.; HATTON, T. A.; YARMUSH, M. L. Bioaffinity separations using reverse micellar extraction. **Biotechnol. Prog.**, v.5, p.57, 1989.
94. PHILLIPS, J. B.; NGUYEN, H., JOHN, V. T. Protein recovery from reversed micellar solutions through contact with a pressurized gas phase. **Biotechnol. Prog.** v.7, n.43, 1991.
95. DEKKER, M.; VAN'T RIET, K.; VAN DER POL, J. J. et al. Effect of temperature on the reversed micellar extraction of enzymes. **Chem.Eng. J.**, v. 145, p. B69-B74, 1991.
96. CARLILE, K.; REES, G. D.; ROBINSON, B. H. et al. Lipase-catalysed interfacial in reverse micellar systems. Role of water and microenvironment in determining enzyme activity or dormancy. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, v.92, n.23, p.4701-4708, 1996.
97. FLETCHER, P. D.; ROBINSON, B. H.; FREEDMANN R. B. et al. Activity of lipases in water-in-oil microemulsions. **J. Chem. Soc. Faraday Tras. I.**, v.81, p. 2667-2679, 1985.
98. MENGER, F. M.; YAMADA, K. Enzyme catalysis in water pools. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 22, n.101, p.6731-6734, 1979.
99. MARTINECK, K.; LEVASHOV, A. V.; KLYACHKO, N. L. et al. **Biochim.Biophys. Acta**, v.657, p.277-294, 1981.

-
100. AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. **Biotechnol. Bioeng.**, v.38, p.1302-1307, 1991.
 101. PIRES, M. J; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S. Protein assay in reversed micelle solutions. **Biotech. Techn.**, v.7, n.4, p.293-294, 1993.
 102. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.
 103. PETERSON, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry.**, v.100, p.201-220, 1979.
 104. CATÁLAGO DA SIGMA. Micro protein determination – phenol reagent method for biologic fluids. Procedure n° 690, 1991.
 105. AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. **Biotechnol. Bioeng.**, v.38, p.1302-1307, 1991.
 106. PIRES, M. J; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S. Protein assay in reversed micelle solutions. **Biotech. Techn.**, v.7, n.4, p.293-294, 1993.
 107. DUNGAN, S. R.; BAUSCH, T.; HATTON, T. A. et al. Interfacial transport processes in the reversed micellar extraction of proteins. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 145, n. 1, p.33-50, 1991.