

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CRISTINA MAZZEU JUNQUEIRA

**PARTIÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum* EM
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

ALFENAS/ MG

2014

CRISTINA MAZZEU JUNQUEIRA

**PARTIÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum* EM
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata

ALFENAS/ MG

2014

Junqueira, Cristina Mazzeu.
Partição da Lipase de *Geotrichum candidum* em Sistemas
aquosos bifásicos / Cristina Mazzeu Junqueira, Alfenas, MG. - 2014.
77 f. -

Orientador: Luciano Sindra Virtuoso
Coorientador: Daniela Battaglia Hirata
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de
Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
Bibliografia.

1. Lipase de *Geotrichum candidum*. 2. Sistema aquoso bifásico. 3.
Partição. 4. Parâmetros termodinâmicos de transferência. 5.
Otimização. I. Virtuoso, Luciano Sindra. II. Hirata, Daniela Battaglia.
III. Título. CDD: 541

CRISTINA MAZZEU JUNQUEIRA

**PARTIÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum* EM
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Química pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração:
Físico-química.

Aprovada em: 30/04/2014

Prof^o. Dr. Luciano Sindra Virtuoso

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof^o. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Assinatura:



Prof^o. Dr. Adriano Aguiar Mendes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Assinatura:



AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao Prof^o. Dr. Luciano Sindra Virtuoso, orientador, pela dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho, pelo exemplo de vida e profissionalismo, apoio incondicional e constante presença ao longo deste trabalho que me ajudaram a me tornar uma pessoa mais forte e confiante.

A Prof^a. Dra. Daniela Battaglia Hirata pela colaboração no trabalho como co-orientadora e amiga.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial a Bernadete, pela atenção, prestatividade sempre.

Aos meus companheiros e amigos de trabalho no grupo de pesquisa de química de coloides pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*

(Chico Xavier)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estudar a partição da Lipase de *Geotrichum candidum* (LGc) em sistemas aquosos bifásicos (SAB) formados por PEG 1500 ou 4000 ou 6000 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água e por copolímero tribloco L35 1900 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água. A lipase extracelular foi produzida pelo microrganismo *Geotrichum candidum* NRRL Y - 552 por fermentação a 30,0 °C, pH 7,0 e sob agitação de 250 rpm. Os estudos de partição foram conduzidos com o sobrenadante do caldo fermentado, rico em lipase, após filtração para eliminação dos microrganismos. Estudos cinéticos e de eletroforese SDS-PAGE confirmaram a obtenção da lipase na etapa de fermentação. A influência da temperatura, pH, adição de NaCl, massa molar do polímero, hidrofobicidade do sistema e composição de mistura de PEG e do citrato de sódio sob o coeficiente de partição da lipase foram estudadas. Em todos os experimentos realizados a enzima particionou preferencialmente para a fase inferior com valores de K_{LGc} em torno de 0,05-0,6. Medidas da atividade da lipase nas fases dos SAB mostraram que houve significativa perda da atividade enzimática durante o processo. Os valores médios da atividade nas fases superior e inferior foram de 1,5 U/ml e 5,5 U/ml, respectivamente, enquanto que no caldo bruto filtrado a atividade foi de 11,75 U/ml. Parâmetros termodinâmicos do processo de transferência de material entre as fases foram obtidos usando a aproximação de Van't Hoff nos estudos de partição realizados em diferentes temperaturas. O elevado valor negativo obtido para a variação de entalpia de transferência constituem evidência da existência de fortes interações entre a LGc e o PEG, contudo, os baixos coeficientes de partição encontrado nos SAB sugerem que o processo de transferência da LGc nestes sistemas seja entropicamente dirigido. Os SAB formados pela mistura de PEG 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água em pH 7,0 foram otimizados pela metodologia de superfície resposta. As condições que maximizam a partição do LGc na fase inferior foram determinadas nas concentrações extremas de PEG e citrato de sódio dentro das faixas de concentrações estudadas.

Palavras-chave: Lipase de *Geotrichum candidum*. Sistemas aquosos bifásicos. Partição. Parâmetros termodinâmicos de transferência. Otimização.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the *Geotrichum candidum* lipase (GcL) partition in aqueous two-phase systems (ATPSs) formed by PEG 1500, 4000 or 6000 g mol⁻¹ + sodium citrate + water and by triblock copolymer L35 1900 g mol⁻¹ + sodium citrate + water. Extracellular lipase was produced by the microorganism *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 by fermentation at 30.0°C, pH 7.0, and stirring at 250rpm. Partition studies were carried out with the surfactant from the fermented, lipase rich broth, after filtration for elimination of microorganisms. Kinetic studies and SDS-PAGE electrophoresis confirmed lipase in the fermentation stage. The influence of temperature, pH, NaCl addition, polymer molar mass, hydrophobicity of the system and compounding of the PEG and sodium citrate blend under the lipase coefficient of partition were studied. In all experiments carried out, the enzyme partitioned preferentially to the lower phase with K_{GcL} values around 0.05-0.6. Measurements of the lipase activity in phases of ATPSs showed that there was relevant loss of the enzymatic activity during the process. Mean activity values in the upper and lower phases were of 1.5 U/ml and 5.5 U/ml, respectively, while activity in the raw broth was of 11.75 U/ml. Thermodynamic parameters of material transfer process between phases were obtained by using Van't Hoff's approximation in the partition studies carried out at different temperatures. The high negative value obtained for the enthalpy transfer variation point out the existence of strong interaction between the GcL and the PEG. However, the low coefficients of partition found in the ATPSs suggest that the GcL transfer process in these systems is entropically driven. The ATPSs formed by the blend PEG 1500 g mol⁻¹ + sodium citrate + water in pH 7.0 were optimized by the response surface methodology. The conditions that maximize the GcL partition in the lower phase were determined in extreme external conditions of PEG and sodium citrate within the concentration bands studied.

Keywords: *Geotrichum candidum* lipase Aqueous two-phase systems. Partition. Thermodynamic parameters of transfer. Optimization.

LISTA DE QUADROS

Figura 1.1 - Exemplos de componentes e tipos de sistema aquoso bifásico.....	16
Figura 1.2 - Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.....	17
Figura 1.3 - Estrutura tridimensional da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	23
Figura 2.1 - Experimentos de determinação da atividade da lipase após o processo de partição.....	35
Figura 2.2 - Fases coletados dos sistemas com adição do reagente de Bradford, para análise em espectrômetro.....	36
Figura 2.3 - Amostra de caldo antes e após o processo de fermentação.....	39
Figura 2.4 - Estudo de Produção e Cinética de LGc em pH 7,0 e 30,0 °C.....	40
Figura. 2.5 - Análise de SDS-PAGE da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> NRRL Y-552. A massa molecular do marcador padrão de proteína variou entre 30 e 66 kDa. Pista 1, relativa às massas molares e a pista 2, relativa à amostra.....	41
Figura 2.6 - Efeito da massa molecular de PEG sobre o coeficiente de partição da lipase em função do comprimento da linha de amarração (CLA) em sistemas formados por PEG/citrato de sódio, a 25,0 °C e pH = 7,0 (●) PEG 1500 (▲) PEG 4000 (■) PEG 6000 g mol ⁻¹	41
Figura 2.7 - Estudo de atividade da lipase em sistemas formados por PEG 1500, 4000 e 6000 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água na quinta linha de amarração a 5,0 °C e pH 7,0. Atividade da lipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.....	44
Figura 2.8 - Estudo de atividade da lipase em sistemas formados por PEG 1500, 4000 e 6000 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água na quinta linha de amarração a 5,0 °C e pH 7,0. Coeficiente enzimático (■).....	47
Figura 2.9 - Análise da atividade enzimática da lipase em sistemas com diferentes concentrações de PEG 1500 g mol ⁻¹ 18, 22, 26 e 29% m/m e citrato de sódio 16% m/m a 5,0 °C e pH 7,0. Atividade da lipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.....	48

Figura 2.10 - Análise da atividade enzimática da lipase em sistemas com diferentes concentrações de PEG 1500 g mol ⁻¹ 18, 22, 26 e 29% m/m e citrato de sódio 16% m/m a 5,0 °C e pH 7,0. Coeficiente enzimático (■).....	49
Figura 2.11 - Estudo da atividade da lipase em sistemas com variação de concentração de citrato de sódio 12, 14, 16 e 18 % m/m e PEG 1500 g mol ⁻¹ 26 % m/m a pH 7,0 e 5,0 °C. Atividade da lipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.....	49
Figura 2.12 - Estudo da atividade da lipase em sistemas com variação de concentração de citrato de sódio 12, 14, 16 e 18 % m/m e PEG 1500 g mol ⁻¹ 26 % m/m a pH 7,0 e 5,0 °C. Coeficiente enzimático (■).....	50
Figura 2.13 - Estudo da atividade da lipase em sistemas formados por PEG 1500 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água a CLA: 54,92 % m/m com a adição de NaCl a 2, 4, 6 e 8 % m/m, 5,0 °C e pH 7, 0. Atividade da lipase na (□) fase superior (■) fase inferior.....	52
Figura 2.14 - Estudo da atividade da lipase em sistemas PEG 1500 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água a CLA: 54,92 % m/m com a adição de NaCl a 2, 4, 6 e 8 % m/m, 5,0 °C e pH 7,0. Coeficiente enzimático (■).....	53
Figura 2.15 - Efeito da hidrofobicidade sobre o coeficiente de partição da lipase em função do comprimento da linha de amarração (CLA) a 25,0 °C e pH 7,0: (■) PEG 1500 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água (▲) L35 1900 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água.....	54
Figura 2.16 - Efeito do pH sobre o coeficiente de partição da lipase nos sistemas PEG(▲) 6000, (■) 4000 e (●) 1500 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água a 25,0 °C.....	55
Figura 2.17 - Estudo da atividade da lipase nos sistemas formados por PEG 1500 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água variando o pH 3, 4, 7 e 9,5 na CLA: 54,92% a 5,0 °C. Coeficiente enzimático (■).....	56
Figura 2.18 - Estudo da atividade da lipase nos sistemas formados por PEG 1500 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água variando o pH 3, 4, 7 e 9,5 na CLA: 54,92 % a 5,0 °C. Atividade da ipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.....	57
Figura 2.19 - Sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 4000 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água a 25,0 °C, com distribuição da lipase na interface.....	58

Figura 2.20 - (a) Coeficiente de partição da LGc contra CLA e (b) a transferência de energia livre $\Delta_t G_m^0$ da LGc contra CLA em SAB formado pela mistura de PEG 4000 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água a temperaturas de (■) 5,0 °C, (●) 10,0 °C, (▲) 25,0 °C, (■) 35,0 °C e (●) 45.0 °C e pH = 7,0.....	59
Figura 2.21 - Estudo da atividade da lipase nos sistemas formados por PEG 1500 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água. Com temperaturas de 5, 10, 25, 35 e 45 °C na CLA: 54,92 % e pH 7,0. Atividade da lipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.....	62
Figura 2.22 - Estudo da atividade da lipase nos sistemas formados por PEG 1500 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água. Temperaturas de 5, 10, 25, 35 e 45 °C na CLA: 54,92 % e pH 7,0. Coeficiente enzimático (■).....	63
Figura 2.23 - Diagrama de fase do sistema formado por PEG 1500 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água a 25,0 °C e pH:7,0, com dados da literatura.....	64
Figura 2.24 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para K_{LGc} em função da composição de PEG e citrato de sódio.....	66
Figura 2.25 - Valores experimentais de K_e como uma função dos valores previstos pelo modelo.....	68
Figura 2.26 - Superfície de resposta e curva de contorno para K_e como uma função da percentagem de PEG e percentagem de sal.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Aplicações industriais de lipases.....	24
Tabela 2.1 - Resultados dos estudos de atividade hidrolítica da lipase após a partição nos sistemas formados por diferentes composições de PEG e citrato de sódio e variações no pH, temperatura.....	45
Tabela 2.2- Média dos parâmetros termodinâmicos de transferência da LGc obtidos pela equação de Van't Hoff não-linear em SAB formado por PEG 4000 g mol ⁻¹ + citrato de sódio + água em quatro diferentes temperaturas.....	61
Tabela 2.3 - Matriz de planejamento fatorial usada para investigar a influência das variáveis independentes sobre o coeficiente de partição.....	65
Tabela 2.4 - Coeficientes de regressão para o coeficiente de partição obtido.....	65
Tabela 2.5 - ANOVA para o coeficiente de partição da lipase obtida do caldo de fermentação.....	66
Tabela 2.6 - Matriz de planejamento fatorial usada para investigar a influência das variáveis independentes sobre o coeficiente enzimático.....	69
Tabela 2.7 - Coeficientes de regressão para o coeficiente de atividade da lipase obtida do caldo de fermentação.....	70
Tabela 2.8- ANOVA para o coeficiente de atividade da lipase obtida do caldo de fermentação.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLA - Comprimento da linha de amarração

DEX- Dextrana

LGc - Geotrichum candidum lipase

PEG - Poli(etileno glicol)

L35 - Copolímero tribloco (bloco-poli-(óxido de etileno)-bloco-poli(óxido de propileno)-bloco-poli(óxido de etileno), (EO)₁₁(PO)₁₆(EO)₁₁.)

ILA - Inclinação da linha de amarração

SAB - Sistema Aquoso Bifásico

Pc - Ponto Crítico

K_e - Coeficiente enzimático

K_p - Coeficiente de partição

PI - Ponto isoeléctrico

FP - Fator de purificação

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1.1 Sistemas Aquosos Bifásicos e sua aplicação para partição de biomateriais	15
1.2 Diagrama de Equilíbrio de Fases	17
1.3 Parâmetros termodinâmicos de transferência	19
1.4 Lipase	21
1.5 Aplicações de Lipases	24
1.6 Produção de Lipases	25
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2	32
2.1 Partição da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em Sistemas aquosos bifásicos	32
2.2 Materiais e Métodos	33
2.2.1 Materiais.....	33
2.2.2 Micro-organismo.....	33
2.2.3 Inóculo.....	33
2.2.4 Produção de lipase.....	34
2.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	34
2.2.6 Determinação da Atividade Hidrolítica.....	34
2.2.7 Experimentos de partição.....	35
2.2.8 Funções termodinâmicas.....	37
2.2.9 Planejamento fatorial para o processo de partição.....	38

2.3	Resultados e Discussões	39
2.3.1	Produção de Lipase.....	39
2.3.2	Efeito da massa molar de PEG e da CLA.....	41
2.3.3	Efeito da variação da composição de Citrato de sódio e adição de NaCl.....	49
2.3.4	Efeito Hidrofóbico.....	53
2.3.5	Efeito do pH.....	55
2.3.6	Efeito da temperatura sobre a partição.....	59
2.3.7	Otimização do processo de partição da LGc.....	63
2.4	Conclusão	72
	REFERÊNCIAS	73

CAPÍTULO 1

1.1 Sistemas Aquosos Bifásicos e sua aplicação para partição de biomateriais

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) são formados por espécies químicas que, quando misturadas em determinadas faixas de concentração e temperatura dividem-se em duas fases com composições diferentes. Essas espécies podem ser polímeros, como polietileno glicol (PEG) e dextrana (DEX), e sais como o citrato de sódio. O componente majoritário em ambas as fases é a água, fornecendo um ambiente ameno para as biomoléculas evitando, assim, mudanças em suas estruturas e perdas das atividades biológicas.^{1,2}

Os SAB foram descobertos no fim do século XIX por Beijerinck quando o mesmo observou que a mistura de soluções de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel em determinadas faixas de temperatura e composição havia a formação de misturas turvas que após o repouso separavam-se espontaneamente em duas fases. Beijerinck descobriu que a fase mais densa era enriquecida com ágar ou amido e a fase superior em gelatina, sendo a água o componente majoritário em ambas as fases. Porém, foi somente nos anos de 1950 que os trabalhos de Albertson deram ao SAB a importância no âmbito de sua aplicação para processos de partição e extração de biomoléculas devidas os SAB serem constituídos majoritariamente por água.³ Mais tarde, precisamente nos anos de 1980, estudos em cima dos SAB mostraram também a sua eficiência para uso na extração não só de compostos orgânicos e inorgânicos como também de íons. Nestes casos, a extração por meio de SAB é adequada para substituir a extração convencional por solventes orgânicos, pelo fato do solvente ser a água, são ambientalmente seguros e permitem a separação de partículas sensíveis à desnaturação em outros solventes.⁴

A literatura descreve uma grande quantidade de combinações de substâncias químicas capazes de originar SAB. Estas combinações são obtidas por tentativa e erro, uma vez que não há uma teoria capaz de prever quais relações entre as espécies químicas resultariam na segregação de fases e conseqüente formação destes sistemas.⁵ A Figura 1.1 descreve algumas combinações que formam SAB.

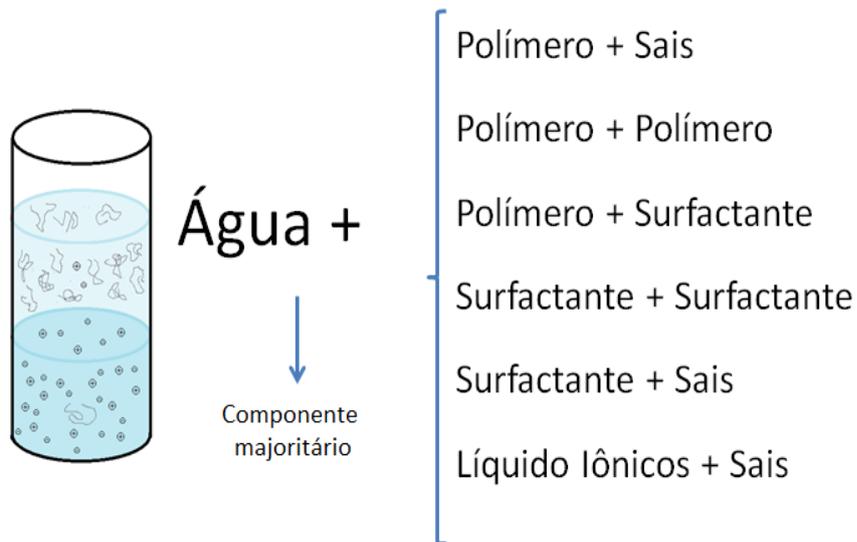


Figura 1.1 - Exemplos de componentes e tipos de sistema aquoso bifásico.

Fonte: Do Autor.

Apesar da grande variedade de sistemas aquosos bifásicos, os sistemas mais utilizados para extração líquido-líquido são basicamente os formados por PEG-sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG-Dextrana (DEX), devido à disponibilidade em grandes quantidades no mercado, por não serem tóxicos, possuírem alta seletividade, possibilidade de reciclagem dos reagentes e por manterem a integridade das enzimas.⁶ Todavia, o elevado custo da dextrana torna inviável a sua aplicação em escala industrial. Assim, o sistema PEG e sais têm sido empregados para a extração de enzimas em larga escala, pelo reduzido custo, baixa viscosidade e elevada seletividade.⁷

Na área de extração e purificação de materiais biológicos, recentemente surgiu a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas, pois as técnicas mais utilizadas são sistemas cromatográficos, o processo de extração líquido-líquido, eletroforese, destilação a vapor entre outros.⁸ Estas técnicas têm, em comum, um elevado custo, complexidade de execução, a utilização de solventes e materiais tóxicos. A partir destas necessidades, pesquisas vêm sendo desenvolvidas, no sentido de encontrar técnicas de bioseparação eficientes, efetivas e econômicas em larga escala, que permitam atingir elevado grau pureza e rendimento de recuperação, mantendo a atividade biológica da molécula. A utilização dos SAB, compatível com os processos de bioseparações, permite isolar moléculas com atividade biológica de misturas complexas, e oferece vantagens como curto tempo de processamento, baixo custo e facilidade de aplicação tanto em escala piloto como em escala industrial.⁹⁻¹²

A base da partição em SAB é a distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Esta distribuição é governada por um grande número de fatores, por exemplo: natureza e tamanho da partícula alvo; constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza do eletrólito e pH do sistema bifásico. Por isto, a predição e a interpretação da partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos é uma difícil tarefa, embora conhecendo as propriedades do sistema e as propriedades da partícula são possíveis se prever um determinado tipo de interação entre a partícula e o sistema e venha a ser uma forma de se controlar a partição. Daí a importância de estudar diferentes SAB, ampliando e facilitando a utilização dos mesmos na extração líquido-líquido.

1.2 Diagrama de Equilíbrio das Fases

Para a utilização de SAB é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Os dados de equilíbrio podem ser representados em diagramas de equilíbrio, em uma temperatura e pressão fixa. Os diagramas de fase representam graficamente a composição dos constituintes do sistema, presentes em certas concentrações, na qual ocorre a separação das fases, como mostra na Figura 1.2

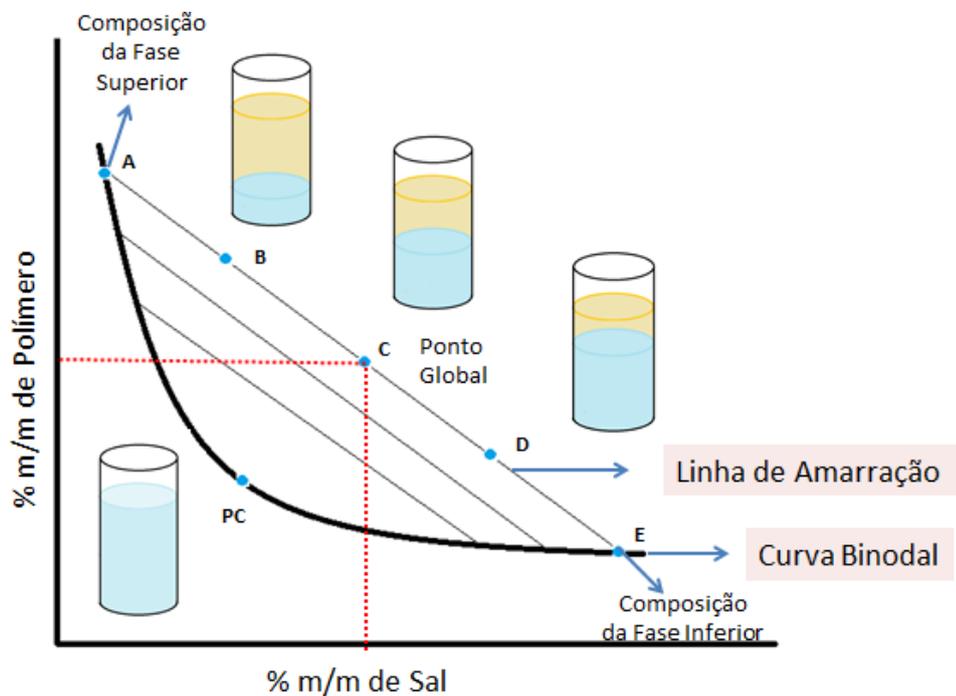


Figura 1.2 - Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.

Fonte: Do Autor.

Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica.

As linhas de amarração são retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer conjunto de pontos que pertençam à região bifásica e que estejam sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc.).

Para se estudar a separação de fases em SAB, faz-se uso de uma medida numérica de referência, o comprimento da linha de amarração (CLA), é um parâmetro termodinâmico importante, pois ela representa o quão distintas são as propriedades termodinâmicas intensivas das fases do sistema. A CLA é determinada considerando, simplesmente a relação pitagórica para o triângulo retângulo, sendo calculado por:

$$CLA = \sqrt{[\Delta PEG]^2 + [\Delta SAL]^2} \quad (1)$$

em que $[\Delta PEG]$ e $[\Delta SAL]$ correspondem à diferença de concentração de PEG e sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa, respectivamente. À medida que o valor do CLA aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases. Outra característica importante dos diagramas de fases é a inclinação da linha de amarração (ILA). A ILA é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química, como, por exemplo, a temperatura e a massa molar.¹³ O valor da inclinação pode ser calculado por:

$$ILA = \frac{\Delta PEG}{\Delta SAL} \quad (2)$$

em que $[\Delta PEG]$ e $[\Delta SAL]$ foram definidas acima.

Outra particularidade de um diagrama de fases é o ponto crítico (Pc). O ponto crítico é aquele no qual as propriedades físico-químicas (composição e volume, dentre outras) das duas

fases são teoricamente iguais. Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, se caracteriza um estado termodinâmico de alta instabilidade, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa.

1.3 Parâmetros termodinâmicos de transferência

A distribuição desigual de uma dada biomolécula entre duas fases é resultante de um criterioso balanço de interações entre esta e as outras espécies (exemplo: polímeros, água e sais inorgânicos) presentes nas fases que coexistem em equilíbrio.

As propriedades físico-químicas do sistema, como a natureza química dos componentes, massa molar do polímero, presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica, composição de mistura, pH e temperatura, como tamanho, conformação (estruturas primária, secundária, terciária e quaternária), distribuição de carga da biomolécula, hidrofobicidade, entre outros fatores influenciarão a transferência entre as fases.

É possível relacionar o coeficiente de partição obtido experimentalmente com a variação da energia livre de Gibbs associada ao processo de transferência do biocomposto ($\Delta_t G$) da fase inferior para a fase superior através da equação:

$$\Delta_t G = - RT \ln K \quad (3)$$

em que K é o coeficiente de partição do processo de partição, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura em Kelvin. Define-se como o coeficiente de partição num processo de transferência como a razão entre a atividade de um componente na fase superior pela a atividade deste mesmo componente na fase inferior. Em concentrações do analito em solução próximas de zero, ou seja, em regimes de diluição infinita o coeficiente de atividade aproxima-se da unidade, logo, a constante de equilíbrio é expressa por:

$$K_p = \frac{\alpha_{FS}}{\alpha_{FI}} \cong \frac{C_{FS}}{C_{FI}} \quad (4)$$

onde α_{FS} e C_{FS} são, respectivamente, a atividade e a concentração do analito nas diferentes fases (S = superior ou I = inferior). Entretanto, para experimentos em que a concentração do analito é muito baixa (regime de diluição infinita), os valores da concentração e da atividade tornam-se muito próximos, pois diminuiu a formação de agregados, devido a formação das camadas de solvatação. Que causam a diminuição das interações analito-analito, mas a enzima podem se associar sob certas condições, particularmente perto do seu ponto isoelétrico e/ou na presença de outros polímeros.

A energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_t G$) pode ser dividida em duas contribuições, uma entálpica ($\Delta_t H$) e outra entrópica ($\Delta_t S$). Para todos os fenômenos que ocorrem na natureza existe sempre um balanço entre os fatores entálpicos e entrópicos relacionados a tal fenômeno. De modo que podem ocorrer situações onde um ou outro fator esteja favorecendo a ocorrência espontânea de tal processo, ou uma situação mais favorável na qual tanto entalpia quanto a entropia favorecem a espontaneidade do fenômeno estudado. A variação de entropia de transferência é obtida a partir da equação fundamental de Gibbs:

$$\Delta_t G = \Delta_t H - T \Delta_t S \quad (5)$$

Neste caso, a determinação de $\Delta_t H$ permite-nos a obtenção de $\Delta_t S$ por diferença na equação (5).

A contribuição da entálpica de transferência para a partição das biomoléculas, pode ser calculada ($\Delta_t H$), por aproximação de Van't Hoff. Em geral, a entalpia de transferência pode ser estimada indiretamente a partir de estudos de dependência da temperatura com o coeficiente de partição, pela a equação de Van't Hoff, a partir da inclinação da reta proveniente da regressão linear do gráfico de $\ln K$ versus $1/T$. A equação 6 é proveniente da substituição da equação 3 na equação 5.

$$\ln k = \frac{-\Delta_t H}{RT} + \frac{\Delta_t S}{R} \quad (6)$$

A partir dos cálculos das variáveis termodinâmicas de transferência pode-se explicar porque a biomolécula se concentra na fase superior ou na fase inferior.

A contribuição entrópica para a partição do biocomposto aparece em decorrência da diferença da densidade numérica entre as fases. A entropia levará o analito a particionar para

a fase com maior número de moléculas por unidade de volume, o que implica num maior número de configurações possíveis para o sistema. Em sistemas aquosos bifásicos formados pela mistura de eletrólito/polímero, a força motriz de natureza entrópica atuará no sentido de forçar o biocompostos e concentrar na fase rica em sal.^{14,15}

Uma maior concentração de analitos na fase rica em polímero, em detrimento à fase rica em sal, ocorrerá sempre que interações específicas entre o soluto e os componentes da fase superior forem suficientemente fortes para superar o direcionamento entrópico do material para a fase de maior densidade numérica de partículas. Para sistemas com densidade numérica das fases muito próximas, é a entalpia que determinará o comportamento de partição da biomolécula. A contribuição do termo entálpico para o comportamento de partição faz com que o analito se difunda para a fase que proporcione o menor gasto energético para a formação da cavidade em que este será alojado.¹⁶

1.4 Lipases

As lipases eram tradicionalmente obtidas de pâncreas de animais. A descoberta foi feita por Claude Bernard em 1856 e, anos mais tarde, aumentou o interesse pelas lipases microbianas devido à dificuldade de acesso ao material de origem animal.¹⁷

As lipases provenientes de micro-organismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade pelo substrato e facilidade de produção em larga escala, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial.¹⁸ As lipases têm encontrado aplicações em diversos tipos de indústrias, tais como de alimentos (aditivos, modificadores de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergente (remoção de gorduras), tratamento de efluentes (remoção de produtos oleosos) e farmacêutica (remédios, digestivos, enzimas para diagnósticos, etc), possuem um papel importante em biotecnologia.^{19,20}

As mais usadas no segmento industrial são as microbianas, devido a maior facilidade da produção em larga escala e ainda por serem mais fáceis e baratas de serem obtidas. Dentre os micro-organismos produtores de lipase, destacam-se fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor*, bactérias do gênero *Pseudomonas* (*Burkholderia*) e leveduras do gênero *Candida* como o *Geotrichum candidum*.²¹ Uma das maiores limitações do uso das lipases em substituição a processos catalíticos convencionais consiste no seu elevado custo. Para

proporcionar um aumento da utilização das enzimas nos processos industriais é necessário diminuir o custo final da enzima.

A produção de lipases pode ser realizada por fermentação submersa (FS) ou por fermentação em estado sólido (FES). A FES baseia-se em crescimento e metabolismo dos micro-organismos em sólidos úmidos sem a presença de água livre e a FS utiliza meio de cultura líquido, com nutrientes solúveis. Neste caso, as células podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizada.²²

Dentre os processos bioquímicos reportados na literatura, as lipases representam cerca de 35% dentre as enzimas empregadas. Depois das proteases e amilases, as lipases são consideradas o terceiro grande grupo em volume de vendas, movimentando bilhões de dólares. No entanto, mesmo com uma vasta variedade de lipases microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, pelos elevados custos de produção. Assim, estudos sobre a utilização de diferentes micro-organismos, suplementos e substratos para a produção de lipase em meio líquido e sólido podem contribuir no sentido de encontrar combinações ideais para se obter lipases com altos rendimentos, utilizando substratos e condições operacionais que possibilitem a redução dos custos do processo de produção em escala industrial.²³

As propriedades catalíticas das lipases como a seletividade e a estereoespecificidade, dentre outras, podem ser de fácil controle através da manipulação nas condições das reações. A dependência destas propriedades catalíticas com o meio reacional pode ser uma consequência do complexo mecanismo de ação das lipases, que envolvem mudanças conformacionais em sua estrutura, a lipase obtida de *Geotrichum candidum* teve sua estrutura determinada em 1993 como mostra a Figura 2.1.^{24,25}

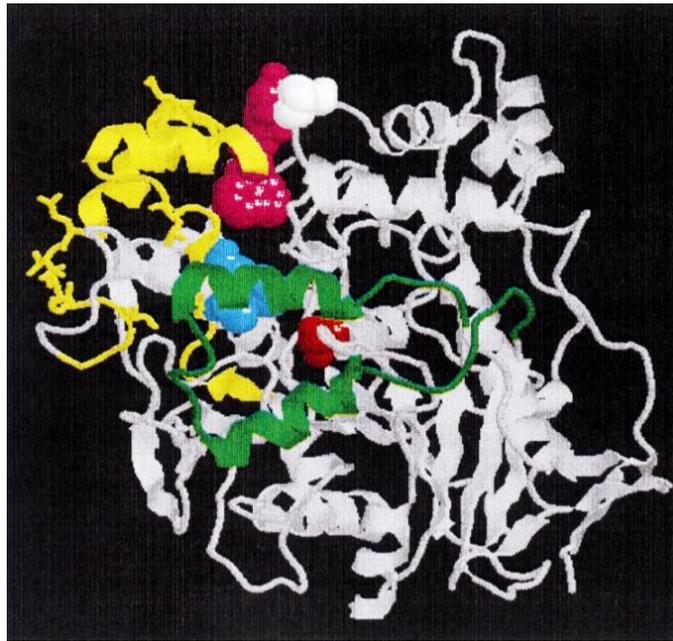


Figura 1.3 - Estrutura tridimensional da lipase de *Geotrichum candidum*.

Fonte: (Schrag e Cygler, 1993).

A Serina-Histidina-Aspartato é a tríade catalítica característica das lipases. Também tem sido diretamente observadas nos sítios catalíticos das lipases produzidas pelo *Geotrichum candidum* que produz várias formas diferentes de lipases. Duas já foram caracterizadas, ambas codificam proteínas de 544 aminoácidos com uma massa molecular total de cerca de 60KDa. As duas formas são 86% idênticas. Seus pontos isoelétricos diferem ligeiramente, sendo entre 4,3 e 4,6. A estrutura tridimensional de uma lipase de *Geotrichum candidum* (LG_C) pode também apresentar, a tríade catalítica de Ser-His-Glu, com a substituição aspartato habitual pelo glutamato. Apesar da similaridade de sequência com as outras lipases é limitada à região próxima ao sitio ativo, há algumas semelhanças nas suas estruturas tridimensionais. A LG_C também é uma proteína alfa/beta com uma folha beta central.²⁶ Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando de 20 a 75 kDa, atividade em pH entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. São geralmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica.²⁷⁻²⁹

1.5 Aplicações de Lipases

A indústria de enzimas como existe hoje é o resultado do rápido desenvolvimento das últimas quatro décadas, graças à evolução das técnicas biotecnológicas. O desenvolvimento dos processos de fermentação durante a última parte do século XX propiciou a produção de enzimas através do uso de linhagens selecionadas e tornou possível a obtenção de enzimas purificadas e bem caracterizadas, mesmo em escala industrial.

Embora atualmente as aplicações das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes e de alimentos e ainda sejam, em sua maioria, baseadas nas reações de hidrólise, novas aplicações decorrentes também das reações de síntese e transesterificação e das características enantio e regioseletivas das lipases vêm se estabelecendo nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, de química fina, de cosméticos, oleoquímicas, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais. A Tabela 1.1 apresenta algumas aplicações industriais das lipases.³⁰

Tabela 1.1 - Aplicações industriais de lipases.

Área	Aplicação	Produto
Química		
Detergentes	Remoção de manchas de óleos e gorduras	Detergentes para limpeza
Farmacêutico	Síntese de ésteres	Ésteres e emulsificantes
Cosméticos	Síntese de ésteres	Fragrância para perfumes
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Médica		
Exames	Ensaio de triglicérides no sangue	Kits de diagnósticos
Alimentação		
Laticínios	Hidrólise de gordura do leite	Aromas para produtos lácteos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas, ex: saque, vinho e outras
Processamento de óleos e gorduras	Transesterificação de óleos naturais. Hidrólise de óleos (ácido graxos, diglicérides e monoglicérides) e gorduras	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)

Fonte: PAQUES, F. W. E MACEDO, G., 2006.³¹

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade, são Lipases ácido graxo específicas, Lipases 1,3 específicas e Lipases não específicas.

Lipases não específicas catalisam a clivagem das ligações acilglicerol de forma aleatória, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior.

Lipases 1,3 específicas liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não-regiosseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico inferior.

Lipases ácido graxo específicas são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum*. Esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilglicerídeos utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras.³²

1.6 Produções de Lipases

A composição do meio e condições de fermentação geralmente têm um papel central na produção de lipases, bem como a identificação de uma formulação de meio que seja efetivo e a condição da cultura utilizada é de grande importância para a otimização da produção.³³

As enzimas de interesse biotecnológico têm sido tradicionalmente produzidas por fermentação submersa (FS), devido à maior facilidade de controle e de operação do processo tendo como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, sendo este o processo mais utilizado atualmente para produção de enzimas.

A otimização das condições de fermentação para lipases microbianas é de grande interesse, desde que as condições de cultura não influenciem nas propriedades da enzima, bem como na proporção de lipase extracelular e intracelular. A quantidade de lipase produzida é dependente de vários fatores como a composição do meio de cultura, concentração de nitrogênio, fontes de carbono e lipídio, concentração de sais inorgânicos, temperatura de cultivo, pH do meio de cultura e ainda a oxigenação e agitação. A produção de lipases pode ser estimulada por certos lipídios tais como manteiga, óleo de oliva e ácidos graxos.

Com relação à melhor formulação de meio de cultivo para produção de lipases microbianas, regras gerais não têm sido reportadas, mas podem ser detectadas diversas tendências, comuns a muitos trabalhos. Como fonte de lipase, além dos triglicerídeos ou derivados, podem ser utilizados diversos carboidratos como a glicose, maltose, sacarose, sorbitol, xilose e o amido.

A produção de lipases microbianas requer altas concentrações de fontes de nitrogênio, quando comparada à produção de outras enzimas. Dentre as principais fontes citadas na literatura, a peptona vem sendo a mais utilizada. Essa fonte é usualmente adicionada na faixa de 1 a 7% (m/v) ao meio de fermentação. O extrato de levedura também vem sendo empregado como fonte única de nitrogênio, ou complementando um meio contendo peptona, em níveis de adição que variam de 0,1 a 1% (m/v). A maioria dos micro-organismos produtores de lipases necessita de um indutor para promover a síntese enzimática, podendo este ser um triglicerídeo, um éster ou um ácido graxo, que pode ser adicionado ao meio com única fonte de carbono ou em adição a carboidratos, em concentrações reduzidas. O meio de cultivo utilizado para produção de lipases microbianas é em geral complexo (sintético ou natural), adicionado de indutores, muito frequentemente o óleo de oliva.³⁴

Burkert et al.²⁹ e Maldonado²³ investigaram a produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em frascos agitados utilizando meio de cultivo contendo peptona como fonte de nitrogênio e óleo de soja como indutor da produção, e também com controle das condições de pH inicial do meio de fermentação e de temperatura de produção da enzima. As condições otimizadas de produção da enzima foram 3,58 % (m/v) de peptona e 0,64 % (m/v) de óleo de soja, pH inicial do meio de fermentação igual a 7,0, temperatura de produção de 30,0 °C, agitação de 250 rpm, sendo que nestas condições 20 U/ml de atividade foi obtida.

A produção de enzimas lipolíticas pode ser realizada em diferentes sistemas, como em escala laboratorial em frascos agitados (como exemplo, erlenmeyers) e agitadores de bancada, como em escala industrial, em fermentadores industriais.

Os tipos de fermentadores podem ser operados de forma contínua ou descontínua. No regime contínuo há uma constância na entrada de substrato conforme as necessidades do micro-organismo e na saída do meio fermentado. Os processos descontínuos são conduzidos na forma de batelada, isto é, quando quantidades únicas de substrato são fornecidas ao micro-organismo no início do experimento. Este processo é muito utilizado na produção de enzimas lipolíticas, devido ao seu baixo custo, porém necessita de uma maior vigilância operacional para assegurar a reprodutibilidade e constância das propriedades do produto.²⁴

REFERÊNCIAS

- 1- SILVA, L. H.M. e LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p.1345-1351, 2006.
- 2 - ALBERTSSON, P.A. Partition of cell and macromolecules. New York: John Wiley, 1986, 346p.
- 3 - CUNHA, EVELYN VILMA CARAVAZI. Equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos água + PEG 8000 + sal: determinação experimental e modelagem termodinâmica Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil 2008.
- 4 - SOUZA, FERNANDA DE LOURDES; Determinação espectrofotométrica de fenol em amostras aquosas utilizando um sistema aquoso bifásico, constituído pelo copolímero L35 e sulfato de lítio. Universidade Federal de Viçosa, Brasil 2008.
- 5 - PESSOA-JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos, Barueri -SP, Manole, 2005.
- 6 - FERREIRA, J. F.; PADILHA, G. D. S.; TAMBOURGI, E. G. Efeitos da massa molar e do PH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos, **Exata**, v. 1, p. 49-56, 2009.

- 7 - MALPIEDI, L.P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G.A.; NERLI, B.B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers. **Separation Purification Technology**, v. 65, p. 40-45, 2009.
- 8 - REIS I F, REIS J B A, BARBIERI R S. Tópicos em ciências naturais e da saúde. Caratinga, Centro Universitário de Caratinga, 2010.
- 9 - CARVALHO C. Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água. Dissertação de mestrado, Departamento de tecnologia de alimentos, UFV, Viçosa, 2004.
- 10 - SOUSA R. C. S. Separação da lisozima, albumina e ovalbumina presentes na clara de ovo: Aspectos tecnológicos e termodinâmicos. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2008.
- 11 - CASCONI, O; ANDREWS, B. A. and ASENJO, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, p.629, 1991.
- 12 - CASTRO, B. D., AZNAR, M. Liquid–liquid equilibrium of water + PEG 8000 + magnesium sulphate or sodium sulphate aqueous two–phase systems at 35 °C: experimental determination and thermodynamic modelling. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 22, p. 463–470, 2005.
- 13 - ROGERS, R. D. Controlling the Aqueous Miscibility of Ionic Liquids: Aqueous Biphasic Systems of Water-Miscible Ionic Liquids and Water-Structuring Salts for Recycle, Metathesis, and Separations. **JACS**, n. 125, p. 6632-6633, 2003.
- 14 – MELLER, S., LUIZA H., MEIRELLES, A. JA. PEG + potassium phosphate + urea aqueous two-phase systems: Phase equilibrium and protein partitioning. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 46, n. 2, p. 251-255, 2001.

- 15 - MAYERHOFF, Z. DVL; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Purification of xylose reductase from *Candida mogiini* aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 3, p. 217-223, 2004.
- 16 - JÖNSSON, M.; JOHANSSON, H-O. Protein partitioning in thermoseparating systems of a charged hydrophobically modified ethylene oxide polymer. **Journal of Chromatography A**, v. 983, n. 1, p. 133-144, 2003.
- 17 - HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, in press, 2005.
- 18 - SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.
- 19 - COSTA, V. E. U, AMORIM, H. L.N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, p. 6, 1999.
- 20 - KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R. Extracellular lipase of *Pseudomonas sps* train ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. **Journal of Bacteriologia**, v. 177, p. 4836-4841, 1991.
- 21 - FEITOSA, I. C. et al. produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum.Technology**, v. 32, n. 1, p. 27-31, 2010.
- 22 - CASTILHO, L. R, et al. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239-247, 2000.
- 23 - MALDONADO, R. R. Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais. Campinas: 2006. Dissertação de Mestrado.

Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Faculdade de engenharia de alimentos.

24 - CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, 2004.

25- SCHRAG, J.D., CYGLER, M. 1.8 Å refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. **J. Mol. Biol.** v. 230, p. 575–591, 1993.

26 - SCHRAG, J. D., LI, Y., WU, S., & Cygler, M. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **J. Mol. Biol** , p. 761-764, 1991.

27 - ELLAIAH, P., et al. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.39, p. 525–528, 2004.

28 - CASTILHO, L. R, et al. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v.4, p. 239-247, 2000.

29 - BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I.; Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p.77-84, 2004.

30 - FEITOSA, I. C., ET AL. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum. Technology Maringá**, v. 32, n. 1, p. 27-31, 2010.

31 - PAQUES, F. W. e MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 93-99, 2006.

32 - SABUQUILLO, P., et al. Interfacial affinity chromatography of lipases: Separation of different fractions by selective adsorption on supports active with hydrophobic groups. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1388, p.337-348, 1998.

33 - BERNARDES, O. L., et al. Biodiesel Fuel Production by the Transesterification Reaction of Soybean Oil Using Immobilized Lipase. Humana Press Inc.

34 - PINHEIRO, T.L.F. Produção de Lipases por Fermentação em Estado Sólido e Fermentação Submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como Microrganismo. Tese de Mestrado, Universidade Regional Integrada, Erechim, RS, Brasil, 2006.

CAPITULO 2

2.1 Partição da lipase de *Geotrichum candidum* em Sistemas aquosos bifásicos

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) podem ser formados por uma grande variedade de combinações de substâncias químicas. No entanto, as combinações de polietileno glicol (PEG) - sal (por exemplo: citrato, fosfato e sulfato) e PEG - dextrana são mais utilizadas para a extração líquido-líquido.¹⁻³

Estes sistemas têm vantagens como alta seletividade, não-tóxico, fácil aumento de escala, menor tensão interfacial e os reagentes podem ser reciclados. Além disso eles são capazes de manter a atividade biológica de moléculas como proteínas e enzimas.^{4,5} A distribuição das biomoléculas entre as fases é influenciada por um grande número de fatores tais como a concentração de polímero e sal formadores do sistema, a hidrofobicidade, tipo e peso molecular do polímero, natureza do sal, pH e temperatura do sistema.^{6,7}

A utilização de sistemas formados por PEG-sal para a extração e purificação de lipases é bem documentado na literatura.²⁻⁸ As lipases são enzimas (Triacilglicerol ésteres hidrolases EC 3.1.1.3) que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras em ácidos graxos, glicerídeos e glicerol. Em meio orgânico é capaz de catalisar reações de esterificação e transesterificação.^{9,10} Estas enzimas podem ser aplicadas em vários processos industriais como, aromas e fragrâncias, cosméticos, síntese de biopolímeros e biodiesel, produção de fármacos, agroquímicos e detergente.¹⁰⁻¹²

As lipases de *Geotrichum candidum* são conhecidas por sua especificidade para os ácidos graxos insaturados com ligações dupla (s) na posição cis-9, como os ácidos oleico e linoleico.^{13,14} Por esta razão, esta lipase está sendo investigada para aplicações industriais (por exemplo, produção de especialidades químicas a partir de gorduras e óleos) e preparação de compostos enantiomericamente puros.¹⁵

Até o momento, não há relato de artigos acadêmicos na literatura sobre o uso de SAB para a extração de lipase extracelular de *Geotrichum candidum*. Por esta razão, o presente estudo para a previsão deste particionamento da lipase em sistemas formados por PEG-citrato foi o objetivo do presente trabalho, tentando compreender os mecanismos que governam a distribuição da enzima entre as fases, para determinar as melhores condições para a extração da lipase, sem perda da atividade hidrolítica.

Descrevemos aqui pela primeira vez o estudo da atividade hidrolítica da lipase após o processo de partição do caldo fermentado obtido no processo de produção da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL Y - 552 em SAB formados por PEG/citrato, como parte inicial do processo de purificação do caldo fermentado. Estudos dos efeitos da variação da concentração de PEG e sal formadores do sistema, temperatura, pH, adição de NaCl, massa molar de PEG foi realizado para avaliar sua influencia sobre a atividade da enzima, estes efeitos são importantes para determinar as melhores condições de partição do sistema com a manutenção da atividade da enzima após a partição no sistema.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Materiais

Os reagentes utilizados na produção de fase lipase foram: acetona (Aldrich, EUA); Azeite (Carbonel, Brasil); Biftalato de potássio (Synth, EUA); Etanol 95 % (Vetec, Brasil); fenolftaleína (Dynamic, Brasil); fosfato de sódio monobásico (Vetec); Goma Arabic (Cromoline, Brasil) e hidróxido de sódio (Vetec, Brasil). Os reagentes usados no passo de purificação foram: poli(etileno-glicol) com peso molecular médio de 1500, 4000, 6000 g mol⁻¹ foram adquiridos a partir de Aldrich (EUA); copolímero tribloco L35, (EO)₁₁(PO)₁₆(EO)₁₁, foi comprado da Aldrich (EUA), com uma massa molar média de 1900 g mol⁻¹, citrato de sódio foi obtido de Synth (Brasil); corante Coomassie azul brilhante R-250 (Sinopharm Reagente químico, China); ácido Fosfórico (Vetec, Brasil) e água Milli-II (Millipore, EUA) foi usada para preparar todas as soluções aquosas.

2.2.2 Microrganismo

Geotrichum candidum NRRL - 522 utilizado neste estudo foi doado pela Fundação André Tosello. As culturas de reserva foram mantidas a 4,0 °C em MEA (2 % (m/v) de extrato de malte, 0,5 % (m/v) de peptona e 1,5 % (m/v) de agar) em placas de agar .

2.2.3 Inóculo

As estirpes de *Geotrichum candidum* foram inicialmente cultivadas em placas de SDA (Sabouraud dextrose agar) e incubadas a 30 °C durante 48 h. Uma colônia de 5 mm de

diâmetro foi transferida para um balão de erlenmeyer de 1000 mL contendo 100 mL de meio com 2 % (m/v) de peptona, 0,1 % (m/v) de extrato de levedura, 1 % (m/v) óleo de oliva, 0,05 % (m/v) NaNO_3 e 0,05 % (m/v) MgSO_4 a pH 7,0. Incubou-se a 30 °C em agitador rotativo (250 rpm) durante 24 h.

2.2.4 Produção da lipase

A produção do caldo fermentado de lipase foi realizada através da incubação de 10 % (v/v) de inoculo com 90 mL de meio de cultura contendo 3 % (m/v) de peptona , 0,05 % (m/v) de extrato de levedura , 0,05 % (m/v) de NaNO_3 , 1,5 % (m/v) de óleo de semente de algodão e 0,05 % (m/v) de MgSO_4 . O sistema foi mantido sob agitação (250 rpm) a 28 °C e pH 7,0 durante 72 h. Os experimentos foram realizados em duplicata e amostras foram colhidas em intervalos de 12 h para a análise da atividade hidrolítica, concentração celular e pH .

2.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

SDS - PAGE foi efetuada de acordo com Laemmli,¹⁶ utilizando 5 % m/m e 12 % m/m de poliacrilamida para o empilhamento e resolução dos géis, respectivamente. Padrões de massa molecular com alcance amplo (Ladder Protein 10-220 kDa da Life Technologies ®) foram utilizados para a determinação da massa. Os géis foram corados com Coomassie azul brilhante R-250.

2.2.6 Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade hidrolítica livre da enzima foi determinada pela hidrólise de azeite, tal como metodologia modificada por Soares *et al.*¹⁷ Em um balão de 125 mL foram adicionados 5 ml de emulsão (50 % (m/v) de goma arábica e 50 % (m/v) de azeite de oliva) em 1 mL de tampão fosfato pH 7,0 . A esta mistura foi adicionado 1 mL de caldo fermentado contendo a enzima que foi incubada por 10 minutos, a 37,0 °C (Figura 2.1). A reação foi interrompida com a adição de 5 ml da mistura de acetona /etanol 1:1 (v/v) e os ácidos graxos liberados com a reação de hidrolise do azeite de oliva foram titulados com uma solução de NaOH 0,02 M ate o ponto de viragem (indicado pela ligeira coloração cor de rosa), foi utilizado como indicador

a fenolftaleína. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.



Figura 2.1 - Experimentos de determinação da atividade da Lipase após o processo de partição.

Fonte: Do autor.

2.2.7 Experimentos de partição

Os SAB (PEG 1500, 4000 e 6000 g mol^{-1} + citrato de sódio + água, L35 1900 g mol^{-1} + citrato de sódio + água) foram preparados em cinco composições diferentes de acordo com os diagramas de fase descritos na literatura.¹⁸⁻²⁰ Após a mistura das soluções estoque de polímero e sal com água, os sistemas foram agitados vigorosamente e em seguida, deixados em repouso por 24 horas, em condições controladas de temperatura, em um banho termostático (SOLAB - BR, com uma incerteza de 0,1 °C). As alíquotas da fase superior e inferior foram coletadas com o auxílio de seringas e o total de 3,0 g de cada uma das fases foi misturado com 100 μL de caldo fermentado em três tubos. Estes tubos foram agitados durante aproximadamente 2 minutos, centrifugados durante 15 min e em seguida, transferidos para o banho termostático a 25,0 °C (ou em outras temperaturas), incubado durante aproximadamente 24 horas, a fim de obter o equilíbrio termodinâmico. Cada fase resultante foi cuidadosamente coletada com uma seringa, deixando uma camada de 5 mm de espessura acima e abaixo da interface. O estudo do efeito da variação do pH sobre a partição da LGc foi avaliado obtendo sistemas aquosos bifásicos para a partição com variações de pH diferentes

utilizando pequenas alíquotas de solução concentrada de NaOH ou HCl, respectivamente. Os estudos de partição das biomoléculas foram realizados em triplicata e a quantificação da biomolécula em ambas as fases foi realizada por medição da absorbância a 595 nm de acordo com o método de Bradford, em espectrômetro UV-VIS (Shimadzu UV-2401 PC, EUA) (Figura 2.2).

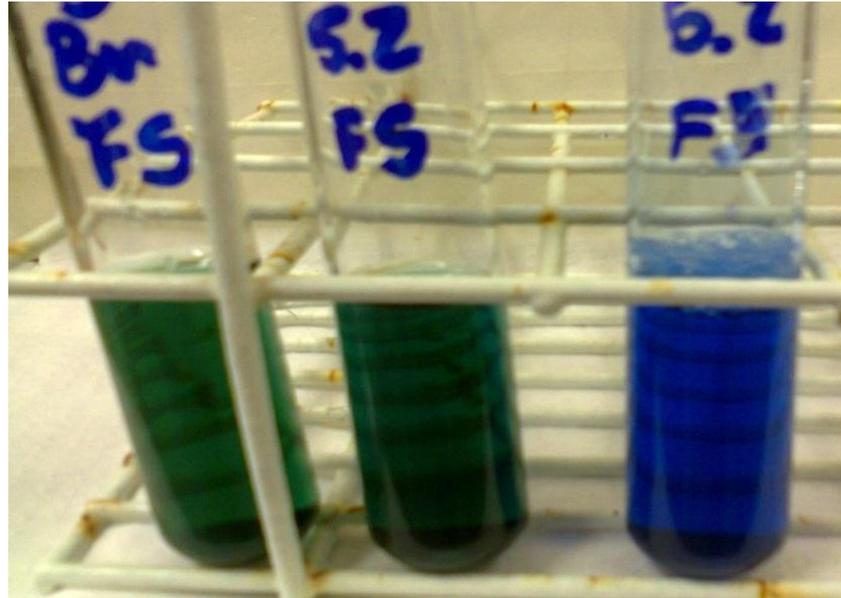


Figura 2.2 - Fases coletados dos sistemas com adição do reagente de Bradford, para análise em espectrômetro.

Fonte: Do autor.

E o coeficiente de partição (K_p) foi determinado pela concentração de proteínas na fase superior, pela concentração de proteínas na fase inferior, como descrito pela Equação (1). Com o desvio padrão relativo em geral, inferior a 10%. O coeficiente enzimático (K_e) foi determinado pela determinação da atividade da lipase nas fases superior e inferior após a partição pelo método de hidrólise de azeite de oliva, pela Equação (2).

$$K_p = \frac{a_{\text{soluto}}^S}{a_{\text{soluto}}^I} \cong \frac{[\text{Soluto}]^S}{[\text{Soluto}]^I} \quad (1)$$

$$K_e = \frac{AEs}{AEi} \quad (2)$$

onde $[\text{Soluto}]^S$ e $[\text{Soluto}]^I$ foram consideradas como as concentrações de lipase particionada entre as fases, já que em análises prévias do caldo fermentado a maior concentração proteica presente são dessas enzimas (ver Figura 2.5). AEs e AEi são a atividade da enzima nas fases superior e inferior, respectivamente em (U mL^{-1}) encontrados após a reação de hidrólise do azeite de oliva e K_e é o coeficiente enzimático da lipase.

A fim de avaliar o processo de purificação, a percentagem da enzima recuperada na fase inferior ($Y_{\text{INFERIOR}}(\%)$) e na fase superior ($Y_{\text{SUPERIOR}}(\%)$) foram calculados de acordo com as Equações (3) e (4), utilizando os valores de k_e determinados pelas análises de atividade nas fases.

$$Y_{\text{INFERIOR}}(\%) = \frac{100}{1+RVK_e} \quad (3) \qquad Y_{\text{SUPERIOR}}(\%) = \frac{100}{1+\frac{1}{RVK_e}} \quad (4)$$

onde RV corresponde à razão entre os volumes da fase superior e inferior e K_e é o coeficiente enzimático da lipase. Outros fatores que podem ser avaliados são a seletividade (β) onde $\beta = K_e / K_p$ fator que indica a capacidade dos sistemas de separar a proteína a partir das impurezas e a atividade específica (AS) da enzima calculada por $AS = AE_{\text{FASE}}/C$ sendo AE_{FASE} a atividade da enzima na fase analisada e C a concentração de proteína total, determinada pelo método de Bradford está e utilizada para o cálculo do fator de purificação.²¹

O fator de purificação (FP), calculado pela Equação (5), compara a atividade da enzima antes e após a distribuição da enzima entre as fases.

$$FP = \frac{[\text{Act}_{\text{FASE}}]}{[\text{Act}_{\text{CALDO BRUTO}}]} \quad (5)$$

onde Act_{FASE} e $\text{Act}_{\text{CALDO BRUTO}}$ correspondem às atividades específica da lipase na fase e no caldo fermentado.

2.2.8 Funções termodinâmicas

Os coeficientes de partição foram determinados em cinco temperaturas diferentes e a dependência de $\ln K_{\text{LGc}}$ em $1/T$ foi aproximada por uma expressão polinomial, conforme representado pela Equação (6),²²

$$\ln K_{LGc} = a + b \left(\frac{1}{T} \right) + c \left(\frac{1}{T} \right)^2 + \dots \quad (6)$$

Aplicando a equação de Van't Hoff não linear (Equação 7), a entalpia molar padrão ($\Delta_t H_m^o$) associada com a transferência entre as fases LGc foi calculada.

$$\Delta_t H_m^o = -R \left[b + 2c \left(\frac{1}{T} \right) + \dots \right] \quad (7)$$

A energia livre de Gibbs molar padrão de transferência ($\Delta_t G_m^o$) e variação de entropia molar padrão de transferência de ($\Delta_t S_m^o$) associado com a partição LGc foram determinados de acordo com as Equações (8) e (9).

$$(\Delta_t G_m^o) = -RT \ln K_{LGc} \quad (8)$$

$$(\Delta_t S_m^o) = \frac{(\Delta_t H_m^o - \Delta_t G_m^o)}{T} \quad (9)$$

Nas Equações (7), (8) e (9), K_{LGc} é o coeficiente de partição da LGc, T a temperatura absoluta, R a constante dos gases ideais e a, b, c, d, ... constantes da Equação (6).

2.2.9 Planejamento fatorial para o processo de partição

As análises dos dados do experimento foram realizadas através da metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, que é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro. A utilização dos planejamentos fatoriais teve como objetivos analisar e otimizar a partição da lipase, visando obter um menor coeficiente de partição e maior atividade hidrolítica, através do estudo da influência das variáveis envolvidas. As influências avaliadas foram a variação da concentração de PEG e do citrato de sódio, componentes formadores do SAB, sobre os coeficientes de partição e a atividade.

Os níveis de concentração de PEG foram de (17,6 - 27,4 % m/m) e de concentração de citrato de sódio foram de (11,2 - 16,8 % m/m). O coeficiente de partição da lipase foi obtido como resposta ao delineamento. Os resultados experimentais foram analisados utilizando o software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc., EUA).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Produção de lipase

A lipase extracelular foi produzida pelo *Geotrichum candidum* NRRL Y - 552 por fermentação a 30,0 °C, pH 7,0, com uma agitação de 250 rpm (Figura 2.3). Duas amostras foram retiradas durante a fermentação a cada 12 horas ao longo de um período de 72 horas, somando 12 amostras de cultura para análises da atividade hidrolítica, concentração celular e pH.

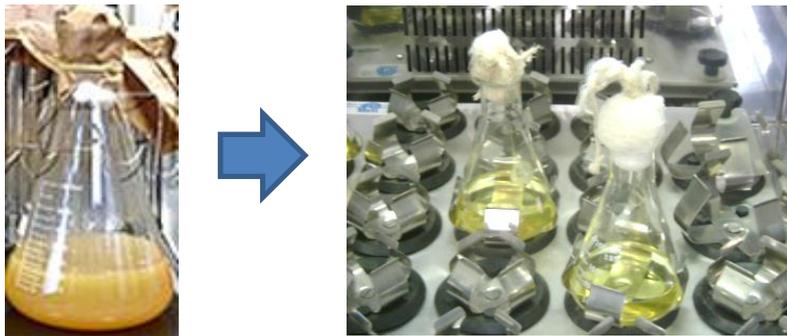


Figura 2.3: Amostra de caldo antes e após o processo de fermentação.

Fonte: Do autor.

A maior atividade enzimática foi observada em 36 h de fermentação (23,65 U/mL), no presente caso, a concentração de proteína ficou (0,124 g/ml) era relativamente baixa e o pH foi mantido a 5,5 durante as 72 horas de fermentação. O caldo fermentado foi filtrado e os micro-organismos foram retirados. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato da enzima, uma vez que *Geotrichum candidum* produz lipase extracelular. A Figura 2.4 demonstra a cinética observada durante as 72 horas da fermentação realizada.

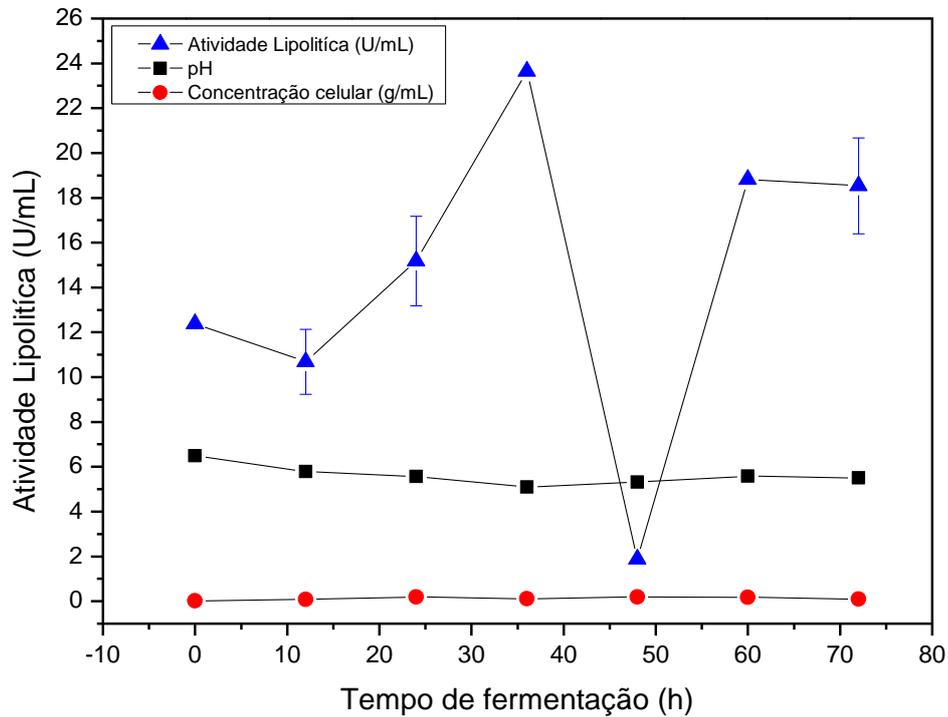


Figura 2.4: Estudo de Produção e Cinética de LG_C em pH 7,0 e 30 °C.

Fonte: Do autor.

Pela análise em SDS-PAGE do caldo a presença de lipase confirmou-se por uma única banda homogênea com uma massa molecular relativa de 60 kDa (pista 2) Figura 2.5. O caldo fermentado contém várias impurezas presentes, pois se trata de uma mistura complexa contendo produtos extracelulares e intracelulares (solúveis e insolúveis), fragmentos de células, substratos, micro-organismos intactos e componentes que não foram convertidos em produtos. A pista 2 revelou uma maior presença da enzima com atividade de esterase.

O caldo fermentado foi filtrado após o término da fermentação para a remoção dos micro-organismos e somente os sobrenadantes foram utilizados como extrato de enzima para os estudos de atividade e partição uma vez que o *Geotrichum candidum* produz lipase extracelular.

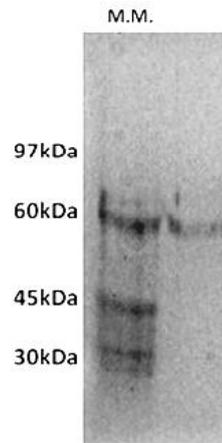


Figura. 2.5 - Análise de SDS-PAGE da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL Y-552. A massa molecular do marcador padrão de proteína variou entre 30 e 66 kDa. Pista 1, relativa às massas molares e a pista 2, relativa à amostra.

Fonte: Do autor.

2.3.2 Efeito da massa molar de PEG e da CLA

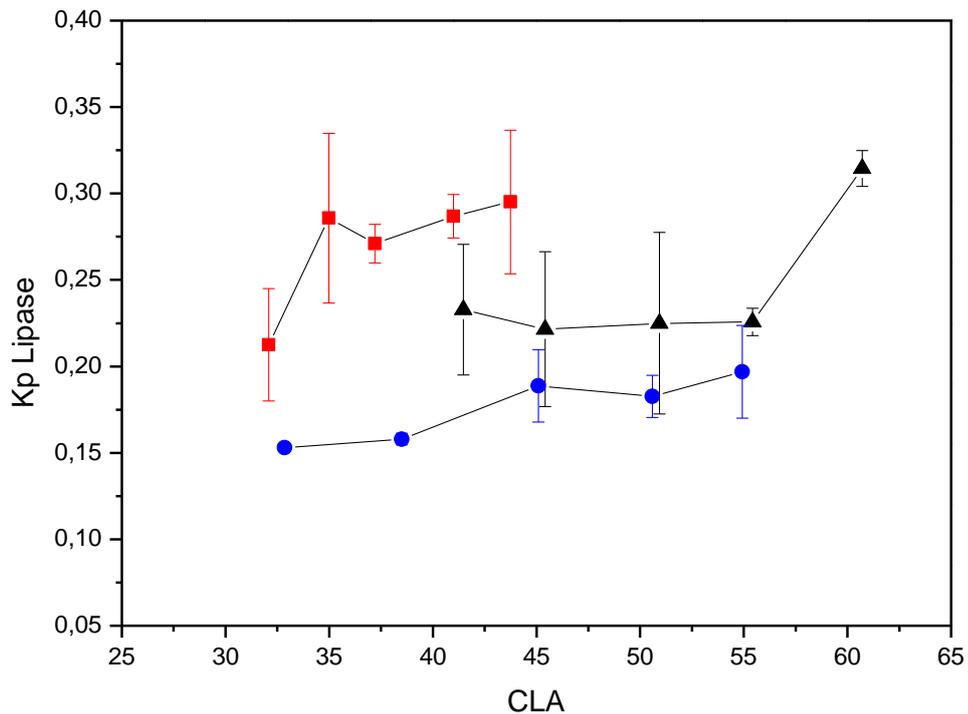


Figura 2.6 - Efeito da massa molecular de PEG sobre o coeficiente de partição da lipase em função do comprimento da linha de amarração (CLA) em sistemas formados por PEG/citrato de sódio, a 25,0 °C e pH = 7,0 (●) PEG 1500 (▲) PEG 4000 (■) PEG 6000 g mol⁻¹.

Fonte: Do autor.

A fim de estudar o efeito da massa molecular do PEG e da composição do sistema sobre a partição da LGc, foram conduzidos experimentos de partição em SAB formados por PEG 1500, 4000 ou 6000 g mol⁻¹ e citrato de sódio, em cinco linhas de amarração. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 2.6. Essa figura mostra que a partição da LGc em sistema PEG/citrato foi substancialmente dependente da variação da massa molar de PEG e da composição de mistura das fases. Observa-se um aumento do valor K_{LGc} para PEG 1500, 4000 e 6000 g mol⁻¹ de 0,15-0,30. Em estudo de partição similar usando lipase pancreática de porco (LPP) em SAB formado por PEG + fosfato de potássio em vários valores de pH, Bassani *et al.*²³ observou que a LPP foi preferencialmente particionada para a fase rica em polímero em sistemas com massa molar de PEG entre 4000 e 8000 g mol⁻¹, enquanto que para PEG 20000 g mol⁻¹ ela foi concentrada na fase rica em fosfato. O aumento no lnK com a CLA foi relatado ser devido à uma interação polímero-proteína devido ao caráter hidrofóbico da LPP. No presente estudo, a partição da LGc é impulsionada pelo volume excluído durante a interação enzima-polímero, o que resulta em uma diminuição do coeficiente de partição. Outros exemplos semelhantes foram relatados por Zhang *et al.*²⁴ e Saravanan *et al.*²⁵

A força repulsiva da interação proteína - polímero e carga elétrica são bem conhecidas como moduladores para a partição de proteínas em SAB. No entanto, estes tem um efeito relativamente maior na partição de proteínas em sistemas formados por PEG e sal. Segundo Pico *et al.*²⁶ moléculas de PEG de baixa massa molecular podem interagir fortemente com proteínas, enquanto que o PEG de massa molecular mais elevada é capaz de formar ligações intermoleculares. A transferência de proteínas para uma das fases requer a interrupção da interação entre os componentes da fase para criar uma cavidade onde a proteína irá ser incluída. Portanto, o equilíbrio de energia pode ser negativo ou positivo dependendo se as interações proteína/polímero forem atrativas ou repulsivas e depende da massa molecular de PEG²⁷. Nesse estudo a massa molar de PEG teve um papel importante no comportamento de partição da lipase. Como todos os polímeros utilizados no estudo possuem baixa massa molar o comportamento de partição observado nos sistemas foi próximo com um ligeiro aumento de K_p com o aumento do tamanho das moléculas de polímero. Estudos em sistemas formados por PEG de elevada massa molecular ainda não foram realizados para avaliar o comportamento da LGc com o aumento do efeito de volume de exclusão.

O comprimento da linha de amarração (CLA) é comumente usado, pois é um importante parâmetro termodinâmico que expressa a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das duas fases como densidade e composição. E as diferenças entre

as propriedades termodinâmicas intensivas são aumentadas com o aumento do valor da CLA. CLA é calculada de acordo com a Equação (10):

$$CLA = \sqrt{(C_P^S - C_P^I)^2 + (C_S^S - C_S^I)^2} \quad (10)$$

onde C_P^S , C_P^I , C_S^S e C_S^I são, respectivamente, as concentrações de polímero e sal em % m/m na fase superior e inferior. Geralmente, a distribuição do soluto é irregular e irá aumentar com o aumento dos valores da CLA. Nestes estudos de variação da massa molar de PEG o coeficiente de partição de LGc foi determinado por cinco diferentes CLA para todos SAB. E os valores encontrados para o coeficiente de partição da LGc foram baixos para os sistemas estudados, o que indica o elevado potencial de extração de sistemas aquosos bifásicos na purificação do LGc.

Outro aspecto avaliado no estudo da variação da massa molecular de PEG foi o seu efeito sobre a atividade hidrolítica da lipase após a partição em sistemas a 5,0 °C. O interesse nesse estudo foi avaliar se após passar pelo processo de partição no SAB a lipase se mantinha ativa. Na Tabela 2.1 é possível observar os resultados encontrados tanto para a partição quanto para a atividade, e que o maior fator de purificação na fase superior foi de FP: 0,07 em sistemas consistindo de PEG 6000 g mol⁻¹ e na fase inferior FP: 0,02 em sistemas formados por PEG 4000 g mol⁻¹. A Figura 2.7 apresenta a variação da atividade nas fases. É possível observar uma diminuição na atividade da lipase em ambas às fases formadas em SAB contendo PEG 4000 g mol⁻¹, quando comparadas com fases dos sistemas formados por PEG 6000 g mol⁻¹ e PEG 1500 g mol⁻¹. Observa-se também, na Figura 2.8, que K_e teve uma diminuição nos SAB formados com PEG 4000 g mol⁻¹, quando comparado com os outros sistemas estudados. Em estudos anteriores foi possível observar que sistemas formados por PEG 4000 g mol⁻¹ possuem a característica de particionar a enzima também para a interface, diminuindo a concentração de enzima nas fases, diminuindo a atividade em ambas as fases. Na Tabela 2.1 observa-se que os valores de K_p tiveram um aumento de 0,025 a 0,122 com o aumento da massa molecular de PEG, o mesmo efeito foi observado no estudo anterior de partição em sistemas a 25,0 °C, um ligeiro aumento de K_p com a massa molecular de PEG. A atividade nas fases formadas por PEG 1500 e 6000 g mol⁻¹, se manteve por volta de 2,0 U/mL.

Bassani *et al*²⁸ também observou no estudo de partição da lipase produzida por *Cândida rugosa* utilizando PEG 10.000 g mol⁻¹ e 40 % m/m de fosfato de potássio a pH 7,0 e 8,0 °C que a atividade da enzima também foi mantida, após a partição em SAB, mas com alguma perda. Bassani *et al*²³ no estudo de partição da lipase pancreática de porco em fosfato de potássio - PEG demonstrou que o PEG, é uma molécula flexível, que pode adquirir uma estrutura compacta estabilizada por ligações hidrofóbicas intramoleculares. A estrutura compacta de PEG tem uma interação com o solvente menor do que a molécula totalmente prolongada, isso permite que a molécula de PEG possa interagir mais com a proteína, tornando a partição da enzima para a fase superior um pouco mais favorável, este efeito irá depender da estrutura química da proteína, proteínas com uma grande área de superfície hidrofóbica exposta ao solvente tem um maior possibilidade de interagir com PEG. Tornando assim os SAB's formados por PEG são uma alternativa para a purificação de lipases, pois a estrutura da molécula de PEG ajuda na manutenção da atividade hidrolítica durante o processo de partição. Baskir *et al*²⁶ completou afirmando que a partição da proteína é acionada por um mecanismo, não só entrópico, mas também entálpico, confirmando que as interações entre os componentes formadores das fases também modulam a partição.

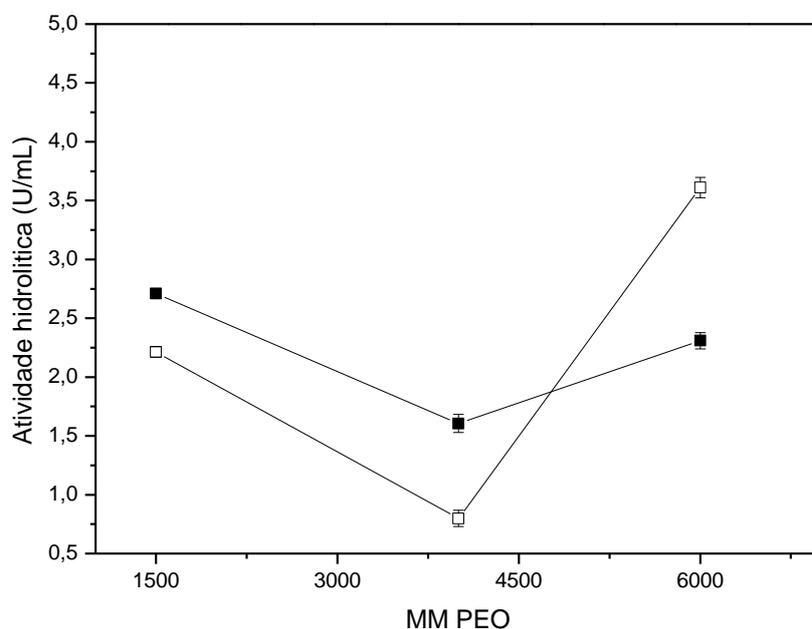


Figura 2.7 - Estudo de atividade da lipase em sistemas formados por PEG 1500, 4000 e 6000 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água na quinta linha de amarração a 5,0 °C e pH 7,0. Atividade da lipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.

Fonte: Do autor.

Tabela 2.1- Resultados dos estudos de atividade hidrolítica da lipase após a partição nos sistemas.

Continua

SAB x	k_p	Atividade Hidrolítica FS	Atividade Hidrolítica FI	k_e	β	$Y_{SUPERIOR}$ (%)	$Y_{INFERIOR}$ (%)	FP _S	FP _I
PEG 1500 (26,26 % m/m) /citrato (14,17 % m/m) / NaCl x % m/m /pH:7,0 / T:5,0									
2	0,020	1,927	3,542	0,544	27,402	59,984	69,261	0,038	0,071
4	0,080	1,551	2,581	0,601	7,530	57,580	67,109	0,031	0,051
6	0,013	2,205	1,424	1,549	121,152	34,497	44,184	0,044	0,028
8	0,059	4,097	1,597	2,565	43,380	24,125	32,338	0,082	0,032
PEG 1500 (x % m/m) /citrate (16 % m/m) /pH:7,0 / T:278,23 K									
18%	0,023	4,959	1,649	0,333	14,576	71,037	78,663	0,033	0,099
22%	0,034	5,098	3,790	0,743	21,805	52,315	62,251	0,076	0,102
26%	0,025	4,236	5,671	1,339	54,457	37,859	47,801	0,113	0,084
29%	0,028	1,574	4,977	3,162	114,372	20,507	27,942	0,099	0,031
PEG 1500 (26 % m/m) /citrate (x % m/m) /pH:7,0 / T:298,23 K									
12%	0,026	5,521	3,229	0,585	22,277	67,701	67,701	0,064	0,110
14%	0,025	3,730	4,182	1,121	45,597	52,237	52,237	0,083	0,074
16%	0,030	4,236	5,671	1,339	44,338	47,801	47,801	0,113	0,084
18%	0,110	2,543	5,417	2,130	19,361	36,535	36,535	0,108	0,051
PEG 1500 (26,26% m/m) / citrato (14,17% m/m) /pH x / T:278,23 K									
3,0	0,037	1,262	0,668	0,530	14,434	60,622	69,825	0,013	0,025
4,0	0,666	2,873	0,651	0,227	0,340	78,260	84,401	0,013	0,057
7,0	0,025	2,708	2,214	0,817	33,245	49,949	60,001	0,044	0,054
9,5	0,275	5,703	2,014	0,353	1,286	69,787	77,638	0,040	0,114

Continuação

SAB x	kp	Atividade Hidrolítica FS	Atividade Hidrolítica FI	ke	β	Y _{SUPERIOR} (%)	Y _{INFERIOR} (%)	FP _S	FP _I
PEG 1500 /citrato /pH:7.0 /T:x									
298,23 K	0,025	2,708	2,214	0,817	33,245	49,949	60,001	0,044	0,054
283,23 K	0,047	2,668	2,703	1,013	21,371	44,604	54,757	0,054	0,053
298,23 K	0,292	1,155	2,500	2,165	7,419	27,361	36,151	0,050	0,023
308,23 K	0,271	2,717	1,328	0,489	1,801	62,527	71,495	0,026	0,054
318,23 K	0,272	3,079	1,111	0,361	1,326	69,325	77,258	0,022	0,061
PEG x /citrato /pH:7.0 / T:298,23 K									
PEG 1500	0,025	2,708	2,214	0,817	33,245	49,949	60,001	0,044	0,054
PEG 4000	0,310	1,606	0,799	0,497	1,602	62,123	71,143	0,016	0,032
PEG 6000	0,122	2,309	3,611	1,564	12,857	34,277	43,944	0,072	0,046

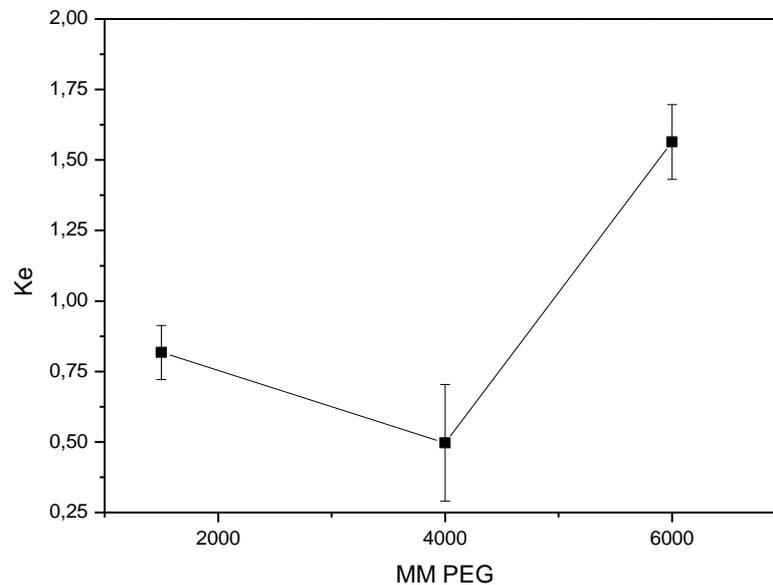


Figura 2.8 - Estudo de atividade da lipase em sistemas formados por PEG 1500, 4000 e 6000 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água na quinta linha de amarração a 5,0 °C e pH 7,0. Coeficiente enzimático (■).

Fonte: Do autor.

Para observar o efeito da variação da concentração de PEG sobre a atividade da enzima uma série de soluções que continham 16 % m/m de citrato de sódio e 18-29 % m/m de PEG 1500 g mol⁻¹ foram avaliados a 5,0 °C e pH 7,0. A maior atividade observada foi de 5,671 U/mL (Figura 2.9) e fator de purificação (FP: 0,113). O fator de purificação compara a atividade do caldo antes e após a partição (ver Tabela 2.1) para o sistema formado por 26 % m/m de PEG 1500 g mol⁻¹ e 16 % m/m de citrato de sódio. Neste sistema também foi possível observar uma elevada atividade na fase superior de 4,236 U/ml, após a partição da enzima. A Tabela 2.1 mostra todos os resultados da variação da concentração de PEG sobre o K_p e observa-se que esses permaneceram por volta de 0,025. No estudo foi possível observar que a enzima particionou-se preferencialmente para a fase inferior, mesmo com a variação da concentração de PEG e que o valor de K_p não teve alterações quando a concentração de PEG foi alterada. Já o K_e variou bastante de 0,333-3,162 devido o aumento da concentração de 18-26 % de PEG 1500 g mol⁻¹ na fase superior o que levou a uma possível manutenção da atividade na fase superior, com uma maior interação com a enzima e seu sítio ativo, aumentando a atividade na fase superior e conseqüentemente aumentando o K_e (Figura 2.10).

Barbosa *et al*²⁹ também observou o mesmo comportamento, um aumento de K_e na purificação da lipase produzida por *Bacillus*, variando a concentração de PEG 8000 g mol⁻¹ e

fixando a concentração de fosfato em 18 % m/m. O efeito foi atribuído ao fato de que quando a concentração deste polímero aumenta, o PEG forma uma estrutura compacta e hidrofóbica com uma grande capacidade de interagir com o sítio ativo da lipase e uma elevada afinidade para ligantes hidrofóbicos.

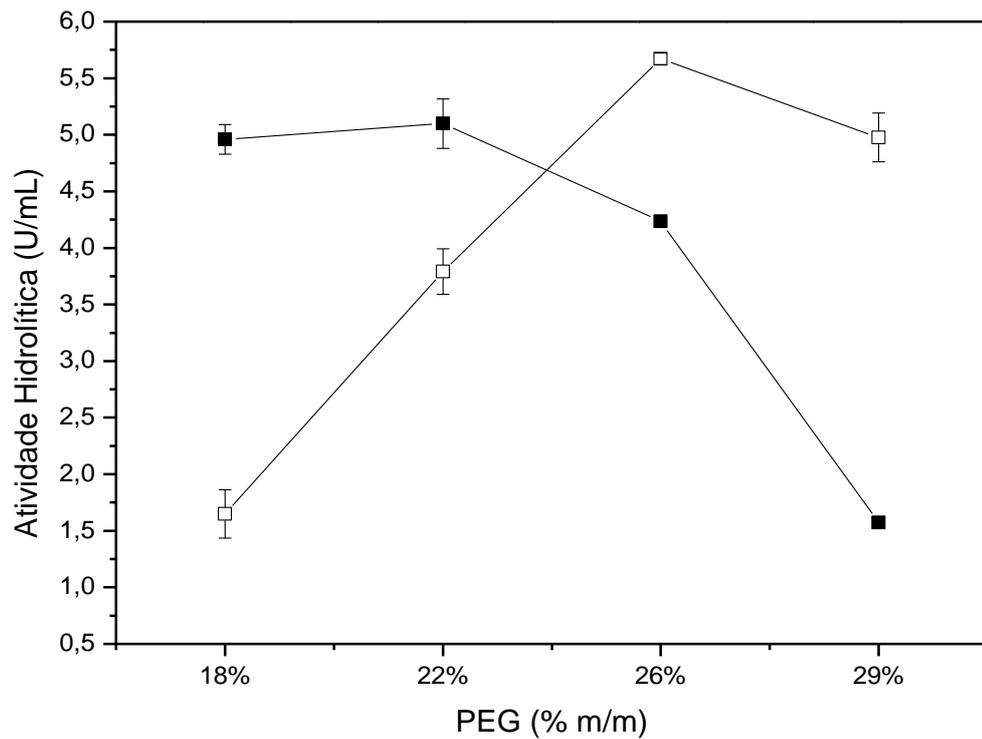


Figura 2.9 - Análise da atividade enzimática da lipase em sistemas com diferentes concentrações de PEG 1500 g mol⁻¹ 18, 22, 26 e 29 % m/m e citrato de sódio 16% m/m a 5,0 °C e pH 7,0. Atividade da lipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.

Fonte: Do autor.

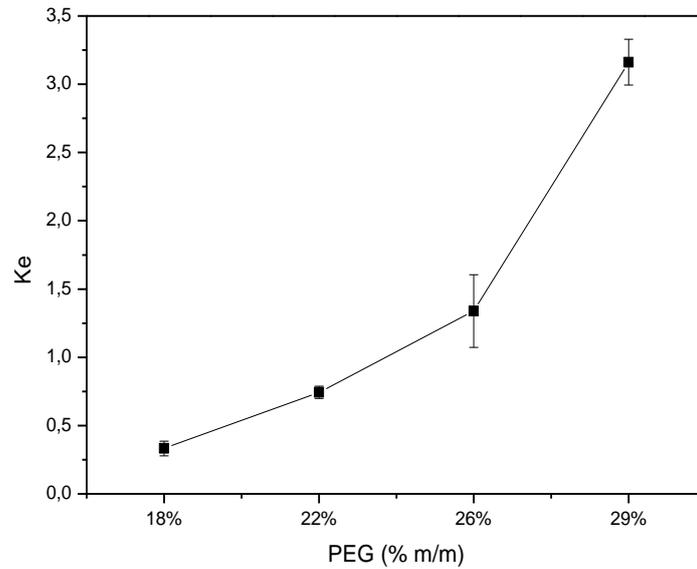


Figura 2.10 - Análise da atividade enzimática da lipase em sistemas com diferentes concentrações de PEG 1500 g mol^{-1} 18, 22, 26 e 29% m/m e citrato de sódio 16% m/m a 5,0 °C e pH 7,0. Coeficiente enzimático (■).

Fonte: Do autor.

2.3.3 Efeito da variação da composição de Citrato de sódio e adição de NaCl

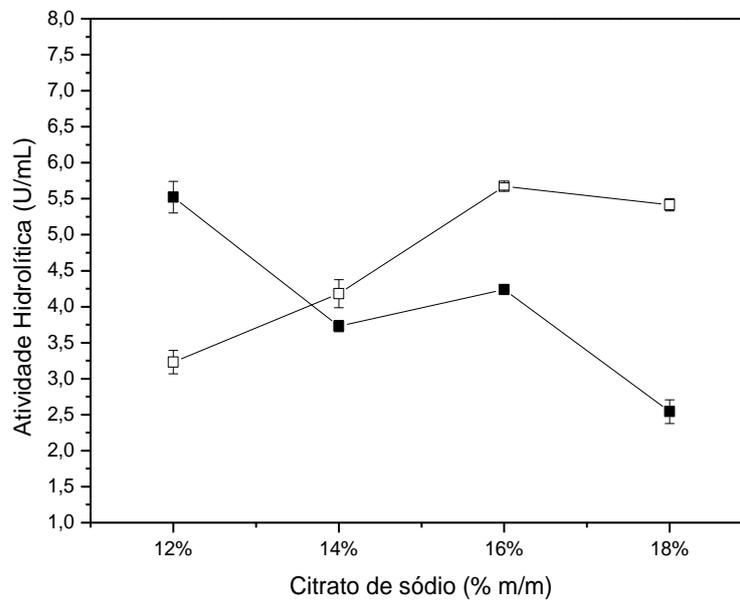


Figura 2.11 - Estudo da atividade da lipase em sistemas com variação de concentração de citrato de sódio 12, 14, 16 e 18 % m/m e PEG 1500 g mol^{-1} 26 % m/m a pH 7,0 e 5,0 °C. Atividade da lipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.

Fonte: Do autor.

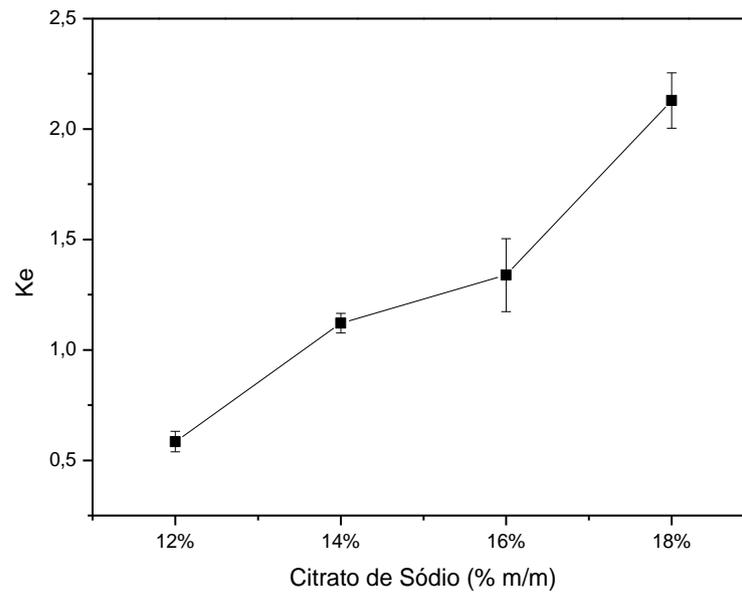


Figura 2.12 - Estudo da atividade da lipase em sistemas com variação de concentração de citrato de sódio 12, 14, 16 e 18 % m/m e PEG 1500 g mol⁻¹ 26 % m/m a pH 7,0 e 5,0 °C. Coeficiente enzimático (■).

Fonte: Do autor.

O efeito da concentração de citrato de sódio em concentrações que variam entre 12 e 18 % m/m sobre a atividade e a partição da lipase foi investigado. A concentração de PEG 1500 g mol⁻¹ foi fixada em 26 % m/m e o sistema foi operado a 5,0 °C e pH 7,0. A Figura 2.12 mostra o aumento do coeficiente enzimático e da atividade nas fases superior e inferior após a partição. A maior atividade observada foi de 5,671 U/mL em alta concentração de sal de 16 % m/m. Como mostrado na Tabela 2.1, a enzima foi particionada preferencialmente para a fase inferior ($K_p < 1,0$) e o valor de K_p aumentou com o aumento da concentração de sal presente no sistema.

A adição de sais afeta diretamente a solubilidade das proteínas em solução. Ao se adicionar sais na solução com proteínas os íons auxiliam a água no processo de solvatação dessas fazendo ligações intermoleculares com os grupos da macromolécula aumentando assim a solubilidades delas, esse efeito é conhecido como “*salting in*”. Em um segundo momento, com o aumento da concentração de íons, estes são capazes além de auxiliar na solvatação, impedirem que as proteínas permaneçam próximas, diminuindo a interação proteína-proteína e aumentando assim ainda mais a solubilidade. Após esta concentração “ideal” os íons começam a competir com as proteínas pelas moléculas de água disponíveis, diminuindo o efeito *salting in*, até chegar em um terceiro ponto, onde a concentração de íons é alta o suficiente para diminuir a solubilidade das proteínas produzindo então o efeito inverso, o

“*salting out*”, efeito que faz as proteínas mais suscetíveis a aglomeração, aumentando a interação proteína - proteína, resultando na diminuição da solubilidade de biomoléculas na fase inferior e, conseqüentemente, aumentando a partição para a fase superior³⁰. Este efeito foi observado neste estudo com a variação da concentração de sal nas fases, assim devido ao aumento da concentração de sal a lipase se deslocou um pouco mais para a fase superior aumentando a atividade da enzima nessa fase de 1,649 para 4,977 U/mL.

Oliveira *et al*³¹ utilizando o sistema PEG/citrato para purificar a enzima glicose - 6 - fosfato desidrogenase (G6PDH) avaliou o efeito de diferentes massas molares de PEG (400 a 1500 g mol⁻¹) e de concentrações (20 a 24 % m/m) de citrato de sódio. Os resultados preliminares demonstraram que a enzima particionou preferencialmente para a fase superior (rica em PEG), mesmo em elevada concentração do polímero. Acredita-se que este resultado se deve, principalmente, à baixa massa molar dos polímeros PEG usados e à alta concentração de sal, o que impediu o efeito de exclusão e favorecendo o efeito *salting out*. Contudo, em estudo realizado por Barbosa *et al*²⁹ o efeito de volume de exclusão em elevada massa molecular de PEG foi mais forte do que o efeito de *salting out*, e assim, a enzima concentrou preferencialmente na fase rica em sal.

Com o intuito de estudar a influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da LG_c foram conduzidos experimentos de partição com adição de 2, 4, 6 e 8 % m/m de NaCl em SAB formados por (26,26 % m/m de PEG 1500 g mol⁻¹ e 14,17 % m/m de citrato de sódio), em pH 7,0 e temperatura de 5,0 °C. Os resultados são apresentados nas Figuras 2.13 e 2.14. A adição de sais é conhecida por gerar uma diferença de potencial elétrico entre as duas fases, afetando assim a partição de proteínas em SAB. Neste estudo, foi possível observar um aumento da atividade da LG_c na fase superior, com o aumento da concentração de NaCl no sistema. Os resultados sugerem que pode ter ocorrido uma mudança de hidrofobicidade da fase superior com a adição desse sal. É conhecido o fato de que o NaCl altera a solubilidade de enzimas em ambas as fases de um dado sistema de partição, devido a alterações provocadas nas interações nas moléculas de água tanto com a enzima como com o PEG. As moléculas de PEG também podem ter influenciado na estabilização da estrutura da enzima, ou seja, mantendo a estrutura do sítio ativo e, com isso, aumentando a atividade da enzima na fase superior. A maior atividade registrada para o estudo da adição de NaCl foi o FP:0,08 e atividade de 4,097 U/mL na concentração de 8% m/m de NaCl. Já para a atividade da enzima na fase inferior (Figura 2.13) foi observada uma redução de 3,542 U/mL para 1,597 U/mL com o aumento da concentração de NaCl adicionado ao sistema.

É conhecido o fato de que o NaCl e outros sais possuem a propriedade de modificar a estrutura da água de hidratação da cadeia hidrofóbica do polímero ou de expor ao solvente a área da superfície hidrofóbica da proteína. A perda de águas de hidratação ocorre quando uma proteína é transferida, a partir de uma fase rica em sal para a fase rica em PEG, facilitando deste modo a interação entre o polímero e a proteína e aumentando o K_e . Esse efeito foi observado no estudo realizado (Figura 2.14).

Em outros estudos de partição com a adição de NaCl em sistemas aquosos bifásicos foram relatados resultados variados como os realizados por Gulati *et al*³², em que foi observado uma diminuição do K_e ao purificar lipase de *Aspergillus terreus*. Saravanan *et al*²⁵ observou que o coeficiente de partição da mioglobina aumentou com a adição de NaCl. Tendência semelhante também foi observada para a ovalbumina, mas a diferença no comportamento de partição foi mais baixa em comparação com a observada para a mioglobina. O mesmo efeito também foi observado para BSA³³.

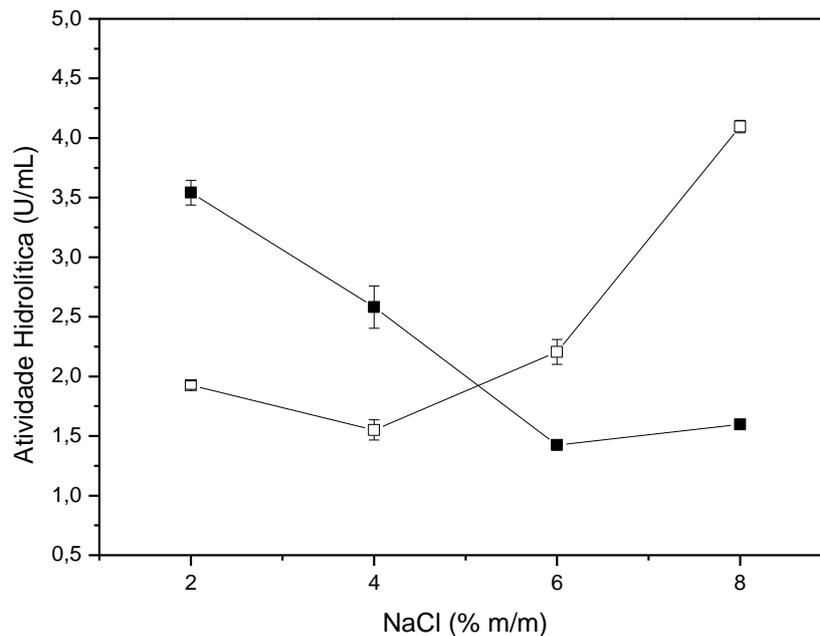


Figura 2.13 - Estudo da atividade da lipase em sistemas formados por PEG 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água a CLA: 54,92% m/m com a adição de NaCl a 2, 4, 6 e 8% m/m, 5,0 °C e pH 7,0. Atividade da lipase na (□) fase superior (■) fase inferior.

Fonte: Do autor.

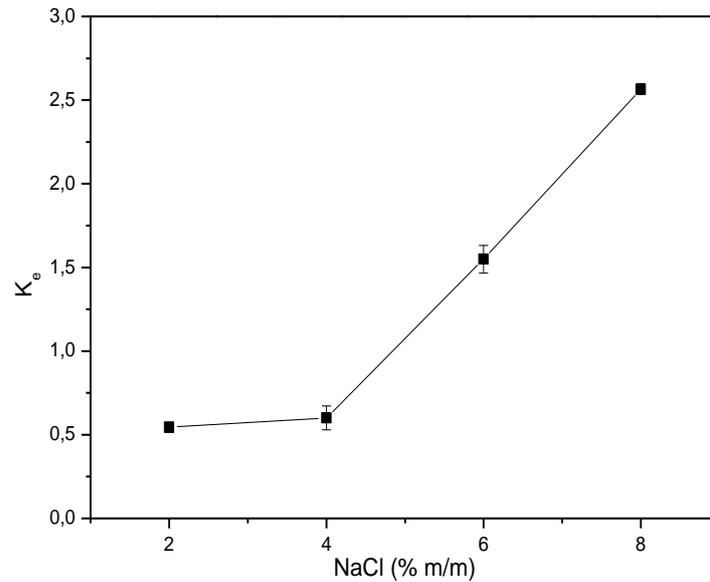


Figura 2.14 - Estudo da atividade da lipase em sistemas PEG 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água a CLA: 54,92 % m/m com a adição de NaCl a 2, 4, 6 e 8 % m/m, 5 °C e pH 7,0. Coeficiente enzimático (■).

Fonte: Do autor.

2.3.4 Efeito Hidrofóbico

Figura 2.15 mostra o coeficiente de partição da lipase contra CLA em sistemas formados por PEG 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água e L35 1900 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água. Como pode ser visto, o coeficiente de partição diminui quando a hidrofobicidade da fase superior aumenta.

O L35 é um copolímero tribloco de terminação difuncional em grupos hidroxilo primários que formam micelas termodinamicamente estáveis com o aumento da concentração de copolímero e/ou da temperatura da solução. A diferença na hidrofobicidade entre a fase rica em copolímero e a fase rica em PEG nos SAB é devido à existência de segmentos de óxido de propileno nas macromoléculas de L35, que é composto de 50 % em massa de blocos de poli (óxido de propileno) (PPO) e os outros 50% referem-se a dois blocos de PEG. Os segmentos PO apresentam interação molecular fraca com as moléculas de água³⁴. Estudos realizados por Alexandridis e Alan Hatton³⁵ mostraram que o processo de micelização de copolímeros de PEG-PPO-PEG em água é endotérmico e impulsionado por uma diminuição da polaridade de segmentos de óxido de etileno (EO) e do óxido de propileno (PO) com o aumento de temperatura e pelo ganho de entropia da água quando unímeros agregam para

formar micelas. As micelas têm raios hidrodinâmicos de cerca de 10 nm e número de agregação na ordem de 50. A natureza hidrófoba do grupo PO induz a agregação das macromoléculas em nanoestruturas com núcleo que consiste de apenas blocos de PPO e uma região de coroa que consiste em água e blocos de PEG. A diminuição dos valores do coeficiente de partição de LGC em sistemas formados por copolímero L35 indica que esta enzima não tem tendência para solubilizar no núcleo hidrofóbico das micelas, mostrando um efeito de volume de exclusão ligeiramente mais pronunciado do que a observado para os sistemas com PEG 1500 g mol⁻¹, especialmente com o aumento da CLA.

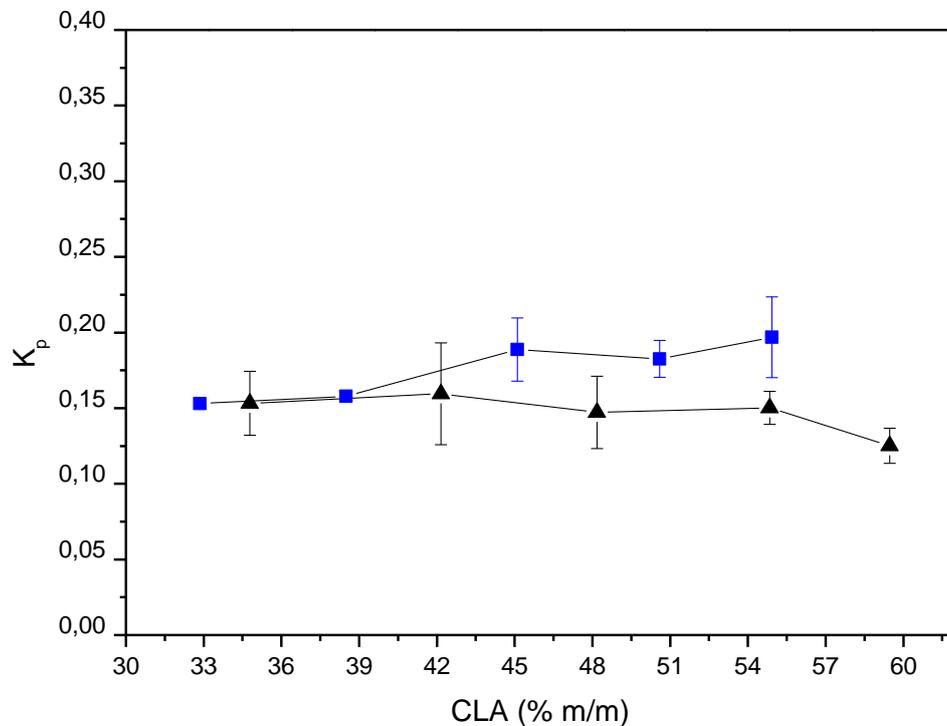


Figura 2.15 - Efeito da hidrofobicidade sobre o coeficiente de partição da lipase em função do comprimento da linha de amarração (CLA) a 25,0 °C e pH 7,0: (■) PEG 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água (▲) L35 1900 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água.

Fonte: Do autor.

2.3.5 Efeito do pH

A fim de estudar a influência do pH sobre a partição da lipase de *Geotrichum candidum* os SAB selecionados foram formados por PEG 1500, 4000 ou 6000 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água. Os experimentos foram realizados no intervalo de pH de 3,0 à 9,5 e os resultados são mostrados na Figura 2.16. Em geral, observa-se que o coeficiente de partição não mostra forte dependência com a massa molecular de PEG em diferentes valores de pH, exceto para o efeito observado pontualmente em pH 4,0 para os SAB formados por PEG 4000 g mol⁻¹.

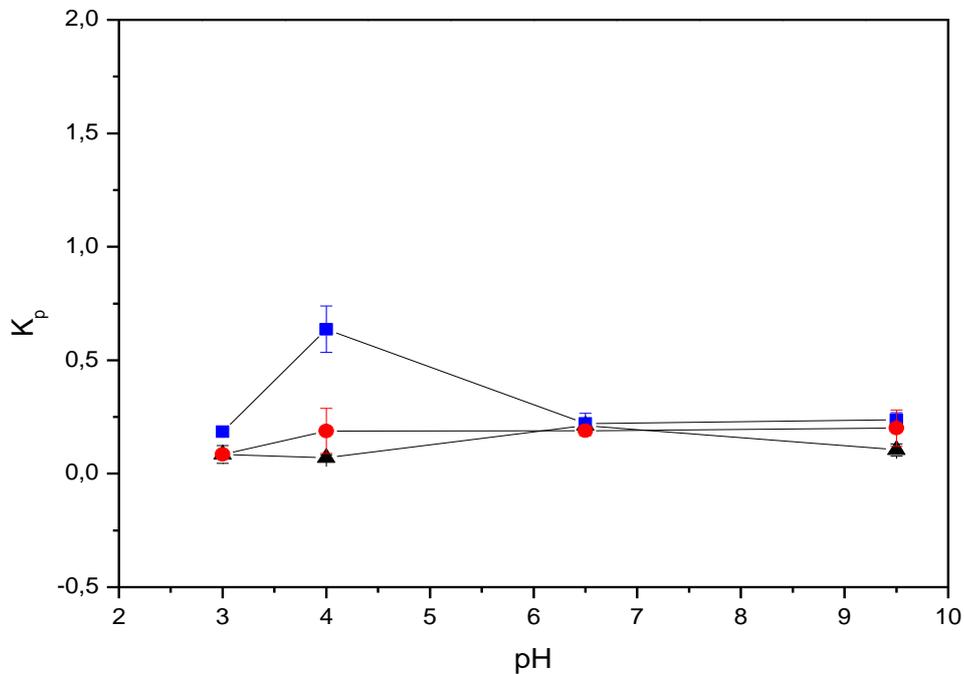


Figura 2.16 - Efeito do pH sobre o coeficiente de partição da lipase nos sistemas PEG(▲) 6000, (■) 4000 e (●) 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água a 25,0 °C.

Fonte: Do autor.

De acordo com a Equação (11), proposta por Albertsson²⁴, a partição da proteína é influenciada por dois efeitos: o componente eletrostático ($F\Delta \psi Z_p/RT$) determinado pela carga elétrica da proteína, e um componente hidrófobo (K_0) que tem um efeito máximo quando o pH do meio é próximo do pH isoelétrico.

$$\ln K_{LGc} = \ln K_0 + F\Delta\psi Z_p/RT \quad (11)$$

Como regra geral, as proteínas carregadas positivamente particionarão para a fase inferior, enquanto que as proteínas carregadas negativamente são dirigidas para a fase superior. O particionamento da enzima para as fases é dependente do seu ponto isoelétrico (PI). A LGc é uma enzima ácida, com um PI próximo de 4,3³⁶, portanto, à medida que o pH do sistema aumenta acima do ponto isoelétrico, a carga superficial da lipase torna-se mais negativa e como resultado a partição da enzima para a fase rica em sal diminui.

No sistema com PEG 4000 g mol⁻¹ observou-se um grande aumento no valor de K_{LGc} de cerca de 0,2 para 0,6. Neste valor de pH a LGc está próxima do seu ponto isoelétrico ($PI_{LGc} = 4,3$) e, por conseguinte, se encontra ligeiramente carregada positivamente. Este resultado se deve a mudança nas cargas de superfície da lipase que em pH 4,0 está próximo de seu ponto isoelétrico, mudando o seu comportamento dentro do sistema, pois a interação entre lipase/água, lipase/PEG, lipase/sal altera significativamente.

Para avaliar a influência da variação do pH sobre a atividade da lipase após a partição no sistema (PEG 1500g mol⁻¹: 26 % m/m / citrato sódio: 16% m/m) variou-se o pH no intervalo de 3,0-9,5, e os resultados são apresentados na Tabela 2.1. Observa-se que houve um aumento da atividade em ambas as fases com a mudança do pH. Na Figura 2.17, verificou-se que o K_e é influenciado pela variação do pH. A enzima quando assume uma carga mais negativa tende a ter uma maior afinidade com a fase superior, pois aumenta a afinidade pelas moléculas de PEG. A atividade foi de 5,703 U/mL na fase superior quando o pH era de 9,5 e de 1,262 U/mL no pH 3,0 (Figura 2.18).

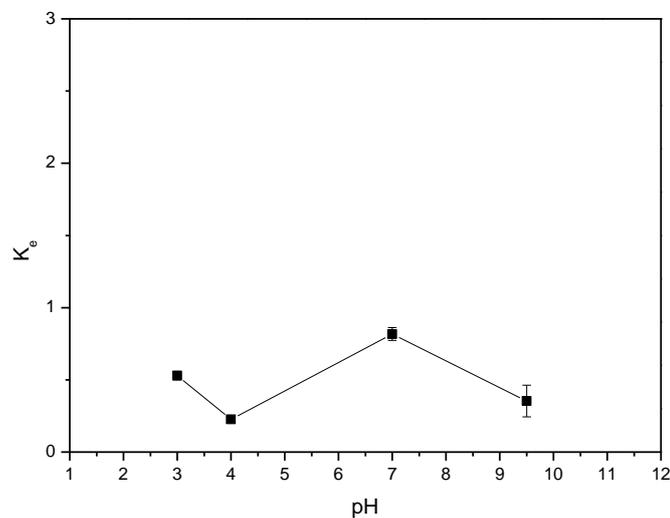


Figura 2.17 - Estudo da atividade da lipase nos sistemas formados por PEG 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água variando o pH 3, 4, 7 e 9,5 na CLA: 54,92% m/m a 5,0 °C. Coeficiente enzimático (■).

Fonte: Do autor.

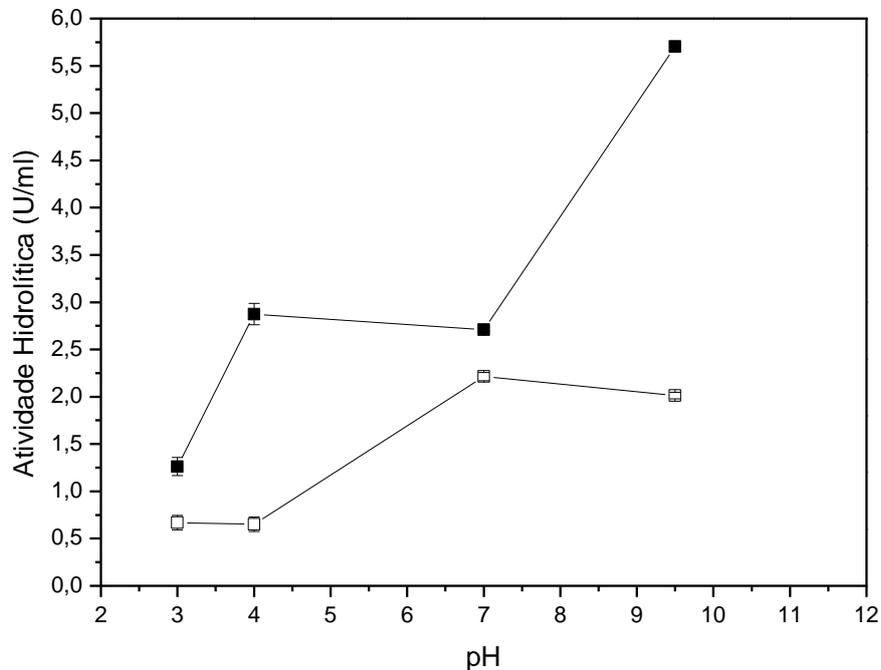


Figura 2.18 - Estudo da atividade da lipase nos sistemas formados por PEG 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água variando o pH 3, 4, 7 e 9,5 na CLA: 54,92 % m/m a 5,0 °C. Atividade da lipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.

Fonte: Do autor.

Com cargas neutras a lipase interage menos com o sal na fase inferior o que leva ao aumento desta na fase superior, levando a enzima a se particionar um pouco mais para a fase superior quando comparado a sistemas com pH neutros e básicos. Outro fator que pode ter contribuído para o aumento no valor de K_p nos sistemas com PEG 4000 g mol⁻¹ é aumento acentuado da concentração de LGc na interface do sistema. As análises realizadas na interface dos sistemas estudados, Figura 2.19, mostram a concentração na lipase também na interface do sistema o que leva a alterações nos resultados de K_p para estes sistemas. Para sistemas constituídos por PEG 1500 e 6000 g mol⁻¹ os valores de K_{LGc} foram ambos alterados de 0,1 a 0,2 com um pH de 4,0 e 6,5, respectivamente.

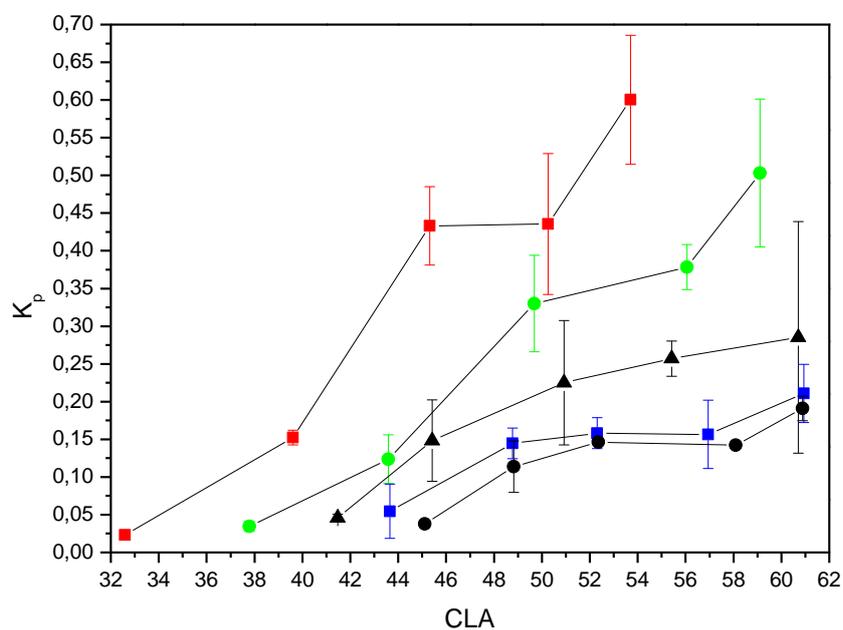


Figura 2.19 - Sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 4000 g mol^{-1} + citrato de sódio + água a 25,0 °C, com distribuição da lipase na interface.

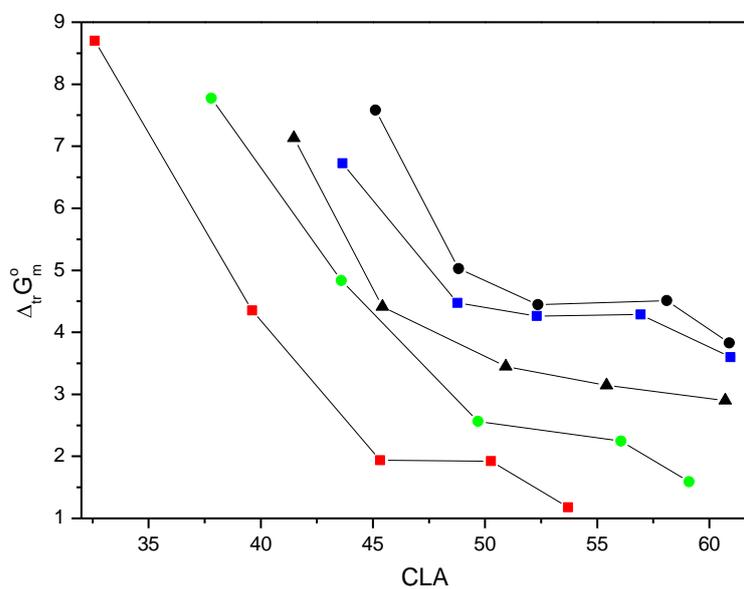
Fonte: Do autor.

Bassani *et al*²³ observou que no estudo de partição da lipase pancreática de porco em PEG/fosfato de potássio, durante a mudança de pH, a recuperação da enzima a partir da fase inferior diminui. Zhang *et al*²⁴ também observaram um aumento do coeficiente de partição em pH 7,0 e 9,0 e descobriram que a atividade nesta faixa de pH é mais significativa.

2.3.6 Efeito da temperatura sobre a partição



(a)



(b)

Figura 2.20 - (a) Coeficiente de partição da LGc contra CLA e (b) a transferência de energia livre $\Delta_t G_m^0$ da LGc contra CLA em SAB formado pela mistura de PEG 4000 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água a temperaturas de (■) 5,0 °C, (●) 10,0 °C, (▲) 25,0 °C, (■) 35,0 °C e (●) 45,0 °C e pH = 7,0.

Fonte: Do autor.

O efeito da temperatura sobre a partição da lipase foi estudada em sistemas formados por PEG 4000 g mol⁻¹/citrato de sódio nas temperaturas de 5,0-45,0 °C. O coeficiente de partição diminui com o aumento da temperatura do sistema e aumenta com o aumento da CLA como mostrado na Figura 2.20a. Tem sido relatado que quando a temperatura aumenta, a estrutura de PEG se torna mais aberta e, como resultado a sua interação com a proteína diminui, diminuindo o coeficiente de partição³⁷. Com o aumento da temperatura, a estrutura de PEG tende a ficar mais aberta o que leva a um aumento do efeito de volume de exclusão, diminuindo os valores de K_{LGc} com o aumento da temperatura, os valores mais baixos K_{LGc} foram observadas a 45,0 °C. Na Figura 2.20b a relação não linear entre $\Delta_t G_m^0$ e a CLA é observado. Termodinamicamente, $\Delta_t G_m^0$ pode ser dividido em duas contribuições de energia, uma entálpica $\Delta_t H_m^0$ e outra entrópica $\Delta_t S_m^0$. A análise do comportamento de partição da LGc em diferentes temperaturas também permite determinar indiretamente a entalpia, quando a enzima é particionada entre duas fases. A fim de investigar a contribuição entálpica de transferência da LGc, foi calculado $\Delta_t H_m^0$ utilizando a aproximação não-linear de Van't Hoff, Equações. (6) e (7) e a energia de Gibbs $\Delta_t G_m^0$ e a variação de entropia ($\Delta_t S_m^0$) através da aplicação das equações (8) e (9). Para esta proposta os valores do coeficiente de partição da LGc relacionados com as CLA com menos de 2% de mudanças em seus valores foram considerados para o ajuste não-linear da equação de Van't Hoff. Foram considerados os dados de coeficiente de partição de 3 das 5 CLA nas 4 temperaturas da Figura 2.20a. Os valores do ajuste não linear da equação de Van't Hoff são mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Média dos parâmetros termodinâmicos de transferência da LGc obtidos pela equação de Van't Hoff não-linear em SAB formado por PEG 4000 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água em quatro diferentes temperaturas.

Parâmetros de ajuste	CLA 1	CLA 2	CLA 3
	44,62 (1,9%)	49,69 (1,5%)	60,41 (1,1%)
R ²	0,92502	0,93559	0,99034
a	-73,24077	8,92203	33,86189
b	42580,224	-8490,66119	-23623,56142
c	-6,35251x10 ⁶	1,60086x10 ⁶	3,91951x10 ⁶
Temperatura (°C)	Δ_tG^o (kJ mol⁻¹)	Δ_tH^o (kJ mol⁻¹)	Δ_tS^o (J mol⁻¹)
10,0	3,05	-12,72	-55,68
25,0	3,85	-13,54	-58,31
35,0	5,46	-14,04	-63,27
45,0	6,27	-14,51	-65,31

*As equações (6-9) foram utilizadas para obter estes resultados. Os valores correspondem às médias no intervalo de concentrações consideradas.

Fonte: Do autor.

Os logaritmos naturais dos valores observados para K_{LGc} foram ajustados a um polinômio quadrático contra $1/T$ levando aos parâmetros termodinâmicos de transferência listadas na Tabela 2.2. Como é evidente nesta tabela, a diminuição do coeficiente de partição quando a temperatura aumenta, indica que a transferência da LGc a partir da fase rica em citrato para a fase rica em macromoléculas, é um processo exotérmico. Estes dados fornecem evidências de fortes interações entre a LGc e o PEG na fase superior dos SAB utilizados nos estudos de partição. No entanto, o processo de transferência da LGc para a fase rica em sal predomina o que constitui uma prova de que o termo entrópico é a força motriz para o processo de partição da LGc.

A influência da variação da temperatura sobre a atividade hidrolítica da enzima particionada também foi avaliada dentro deste intervalo de temperatura, a partição da lipase foi realizada ao longo do mesmo intervalo de temperatura de 5-45 °C, pH 7.0, a composição escolhida foi a quinta CLA em sistemas formados por PEG 1500 g mol⁻¹/citrato sódio. Na figura 2.21 podemos observar o comportamento da atividade na fase superior e na fase inferior, a atividade da lipase não teve uma grande diferença entre as fases com a variação da temperatura, apenas em 25 °C foi possível observar uma pequena variação na atividade entre as fases. Na figura 2.22, é possível observar a mudança de K_e a partir da temperatura de 25 °C

devido a um ligeiro aumento da concentração da enzima na fase superior, observado pelos dados apresentados na Tabela 2.1. Os valores de K_p não variaram muito com as mudanças de temperatura do sistema para os sistemas onde foi avaliada a atividade hidrolítica da LGc após a partição.

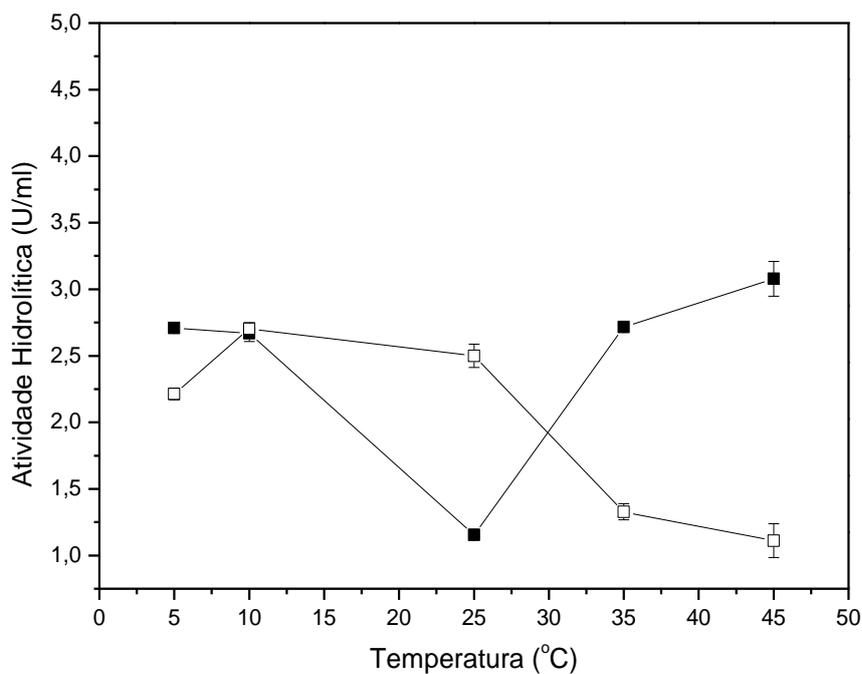


Figura 2.21 - Estudo da atividade da lipase nos sistemas formados por PEG 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água. Com temperaturas de 5, 10, 25, 35 e 45 °C na CLA: 54,92 % m/m e pH 7,0. Atividade da lipase na (□) fase superior e (■) fase inferior.

Fonte: Do autor.

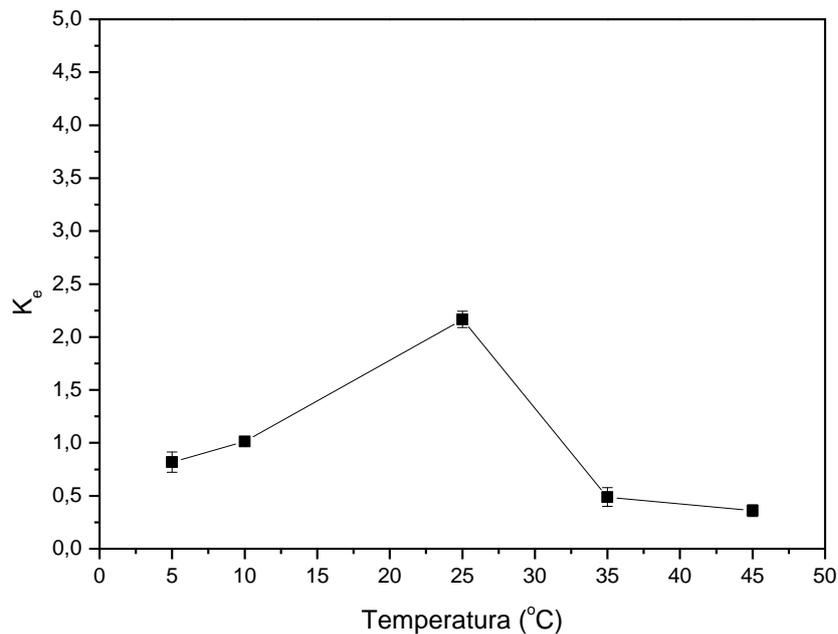


Figura 2.22 - Estudo da atividade da lipase nos sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio + água. Temperaturas de 5, 10, 25, 35 e 45 °C na CLA: 54,92 % m/m e pH 7,0. Coeficiente enzimático (■). Fonte: Do autor.

Alguns estudos têm relatado um aumento no coeficiente de partição com a temperatura. Sarubbo *et al*³⁸ observaram um aumento no coeficiente de partição da enzima tripsina ao utilizar um SAB formado por 13% m/m de PEG 1500 g mol⁻¹ e 21 % m/m de goma de cajueiro-do-pará e variação de temperatura de 25 para 40 °C. Barbosa *et al*²⁹ notou uma diminuição no K_e para a partição de lipase de *Bacillus* em um sistema contendo 20 % m/v de PEG 8000 g mol⁻¹ e 18 % m/v de fosfato de potássio.

2.3.7 Otimização do processo de partição da LGc

O processo de partição da lipase através do SAB foi otimizado com base no estudo da atividade nas fases superior e inferior depois da partição e a influencia das concentrações de PEG 1500 e citrato de sódio tem sobre a atividade da enzima.

Como o sistema mais eficiente para a partição da lipase foi o PEG 1500 g mol⁻¹ + citrato de sódio + água a pH 7,0. Este sistema bifásico foi escolhido para a otimização do processo de partição da lipase, o diagrama de fase (Figura 2.23) deste sistema foi construído com base nos dados da literatura antes utilizados para os estudos anteriores (19), delimitou-se

uma área dentro do diagrama para a análise da variação da composição de sal e polímero sobre a partição e a atividade da LGc.

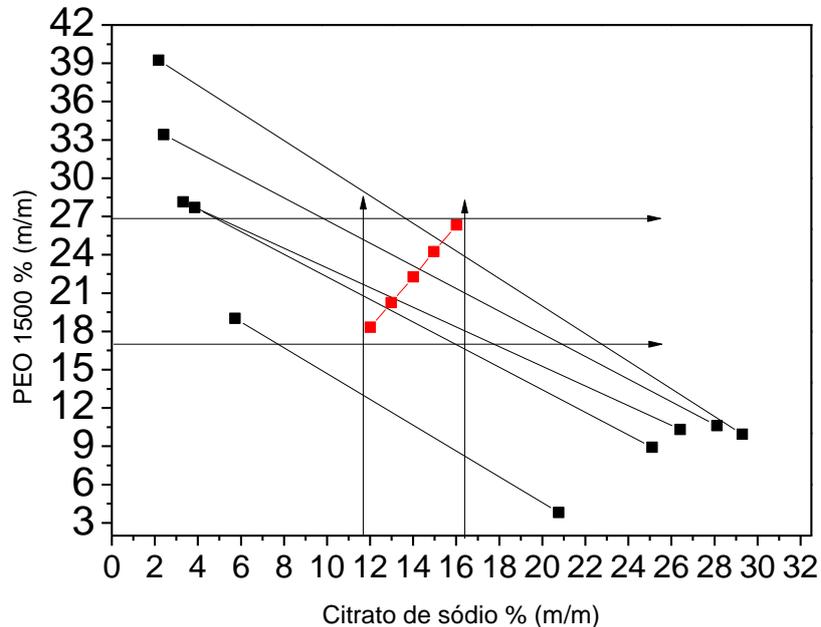


Figura 2.23 - Diagrama de fase do sistema formado por PEG 1500 + citrato de sódio + água a 25 °C e pH:7,0, com dados da literatura.

Fonte: Do autor.

A primeira análise feita com os resultados obtidos para o K_p mostram na Tabela 2.3 que o coeficiente de partição da lipase variou de 0,15 (ensaios 1 e 5) para 0,24 (pontos centrais). Observou-se uma boa correspondência entre valores experimentais e previstos, o que significa que o modelo experimental obtido a partir de desenho fatorial explica adequadamente maior parte das variações de resposta (25,41). Tabela 2.3 mostra o coeficiente de regressão para o modelo que prevê o K_{LGc} em função das concentrações de citrato de sódio e PEG. De acordo com a tabela, os termos lineares para as concentrações de PEG (x_1) e citrato de sódio (x_2) para ambas as variáveis foram estatisticamente significativas com 95 % de nível de confiança. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a adequação do modelo ajustado (Tabela 2.3). Com base na análise de variância, um modelo de segunda ordem (Eq. (12)) para descrever o coeficiente de partição da lipase foi estabelecido. O erro calculado a partir dos pontos centrais foi muito baixo, indicando uma boa reprodutibilidade dos dados experimentais. Baseado no F-teste, o modelo é preditivo, uma vez que o F-teste calculado (76,32) foi maior que o F-tabelado (5,05). Além disso, o coeficiente de determinação ($R^2 = 98,7\%$) foi muito bom. Portanto, o modelo expresso pela Equação (12) foi

utilizado para obter as superfícies de respostas e os gráficos de contorno (Figura 2.24), para a partição da Lipase dentro do intervalo determinado.

$$K_{L_{Gc}} = 0,233 + 0,008x_1 - 0,032x_1^2 + 0,006x_2 - 0,028x_2^2 - 0,016x_1 \cdot x_2 \quad (12)$$

Tabela 2.3 - Matriz de planejamento fatorial usada para investigar a influência das variáveis independentes sobre o coeficiente de partição.

Ensaio	Variáveis	Resposta			
		PEG (%)	Sal (%)	Kp experimental	Kp estimado
1	-1	-1	0,148895386	0,1390	6,65
2	1	-1	0,192640617	0,1950	-1,22
3	-1	1	0,191881042	0,1910	0,46
4	1	1	0,172432241	0,1670	3,15
5	-1,41	0	0,153786634	0,1581	-2,81
6	1,41	0	0,18139441	0,1807	0,40
7	0	-1,41	0,166932707	0,1689	-1,16
8	0	1,41	0,182215243	0,1858	-1,96
9	0	0	0,235503423	0,2330	1,06
10	0	0	0,228196799	0,2330	-2,10
11	0		0,236366919	0,2330	1,42

Fonte: Do autor.

Tabela 2.4 – Coeficientes de regressão para o coeficiente de partição obtido.

	Coef. de regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim de Conf. -95%	Lim. de Conf. 95%
Média	0,233	0,0029	80,66	0,000000	0,225919	0,240792
x_1 (L)	0,008	0,0018	4,47	0,006584	0,003364	0,012471
x_1 (Q)	-0,032	0,0021	-14,96	0,000024	-0,036958	-0,026117
x_2 (L)	0,006	0,0018	3,13	0,025896	0,000995	0,010103
x_2 (Q)	-0,028	0,0021	-13,30	0,000043	-0,033466	-0,022626
$x_1 \cdot x_2$	-0,016	0,0025	-6,306	0,001476	-0,022239	-0,009358

Fonte: Do autor.

Tabela 2.5 – ANOVA para o coeficiente de partição da lipase obtida do caldo de fermentação.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{Calc}	p-valor
Regressão	0,009541	5	0,001908	76,32	0,000102
Resíduos	0,000125	5	0,000025		
Falta de Ajuste	0,000085				
Erro Puro	0,000040				
Total	0,009666	10			

% variação explicada (R^2) = 98,70%; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Fonte: Do autor.

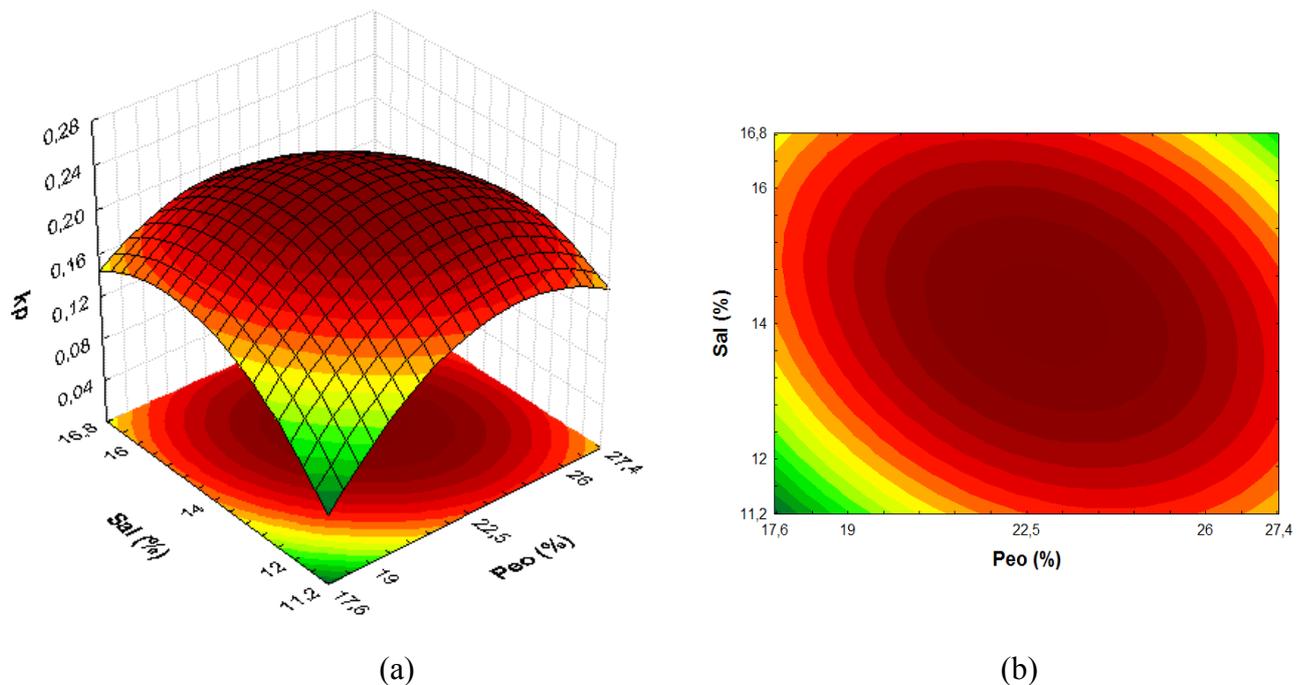


Figura 2.24 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para K_{LGc} em função da composição de PEG e citrato de sódio.

Fonte: Do autor.

A lipase se particionou preferencialmente para a fase inferior como valores de K_p foram encontrados em estudos $k_p < 1$. Ao estudar a variação da concentração de PEG e sal utilizados no sistema, foi possível determinar a gama de concentração ótima de componentes do sistema para atingir valores inferior que 1 para K_p , ou uma concentração mais elevada de lipase na fase inferior. Foi possível observar que nos sistemas 1 e 5 onde a concentração de

PEG era mais baixa, ou seja, nos pontos de mínimo do PEG, os valores de K_p foram os menores nos experimentos realizados, mesmo com o aumento da concentração de sal nestes sistemas. Como já discutido, as macromoléculas de PEG interagem com a enzima na fase superior, mas como a concentração de PEG é menor nestes sistemas a enzima vai migrar mais para a fase com maior número de espécies onde pode assumir um número maior de configurações. Já nos sistemas com maior concentração de PEG como os sistemas 2 e 4 houve um aumento do K_p , pois com o aumento da concentração de PEG, aumenta a interação proteína-enzima.

Com os testes também se determinou qual o sistema, com maior atividade. Os valores K_p foram ($K_p < 1$) significa que a lipase migrou mais para a fase inferior do que para a fase superior como ilustrado na Tabela 2. Sob as condições avaliadas para k_p e k_e , a lipase preferencialmente migrou para o fundo, no entanto, nos ensaios 2, 4, 6 e 8 a maior atividade foi encontrada na fase superior. O sistema 2 constituído por 26 % m/m de PEG 1500 e 12 % m/m de citrato de sódio, apresentou a atividade da lipase em ambas as fases, o sistema 4 consiste de 26 % de PEG 1500 e 16 % de citrato de sódio a atividade em ambas as fases teve um decréscimo, este efeito demonstra a influência da concentração de sal no sistema, com o aumento da concentração de sal no sistema, o aumento da concentração de sal pode ter causado um efeito de remoção da água que rodeia o sítio ativo da enzima, fazendo com que a lipase perder um pouco a sua atividade. O mesmo efeito também pode ser observado para o sistema 6 na fase inferior, enquanto que o aumento da concentração de PEG de 27,4 % não foi significativo para a atividade. No ensaio 8 a atividade é praticamente igual entre as fases neste sistema, de 6,01-6,03 U / mL o sistema possui uma pequena diferença de concentração entre o PEG e o sal, 22,5 % de polímero e de 16,8 % de sal.

O ensaio em que foi observada a maior atividade de 7,27 U/ml foi o número 7, com 22,5 % de PEG 1500 e 11,2 % de citrato de sódio. Fixando a composição de PEG dos sistemas e fazendo variar a concentração de citrato de sódio (testes 7-11) a atividade na fase superior permaneceu em cerca de 2,7 - 2,8 U/ml e a atividade na fase inferior foi mantida.

A Tabela 3.2 e 3.3 mostra o coeficiente de regressão para o modelo que prevê o coeficiente de partição da lipase em função do PEG e as concentrações de citrato de sódio. De acordo com esta tabela, os termos lineares para PEG (x_1) e (x_2) concentrações de citrato de sódio e também quadráticos termos para ambas as variáveis foram estatisticamente significativas a 95 % de nível de confiança.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a adequação do modelo ajustado (Tabela 3.4). Com base na análise de variância, um modelo de segunda ordem (Eq. 13) que descreve o coeficiente enzimático da lipase foi estabelecido. O erro, calculado a partir dos pontos centrais, foi muito baixo, indicando uma boa reprodutibilidade dos dados experimentais. Baseado no F- teste, o modelo é preditivo, uma vez que o F- teste calculado (27,125) foi maior que o F cotado (5,05). Além disso, o coeficiente de determinação ($R^2 = 98,70\%$) foi muito bom. Portanto, o modelo codificado expresso pela Equação 13 foi utilizado para obter as superfícies de respostas e os gráficos de contorno (Figura 2.6).

$$K_e = 0,46 + 0,55x_1 + 0,28x_1^2 + 0,22x_2 + 0,10x_2^2 + 0,24x_1x_2 \quad (13)$$

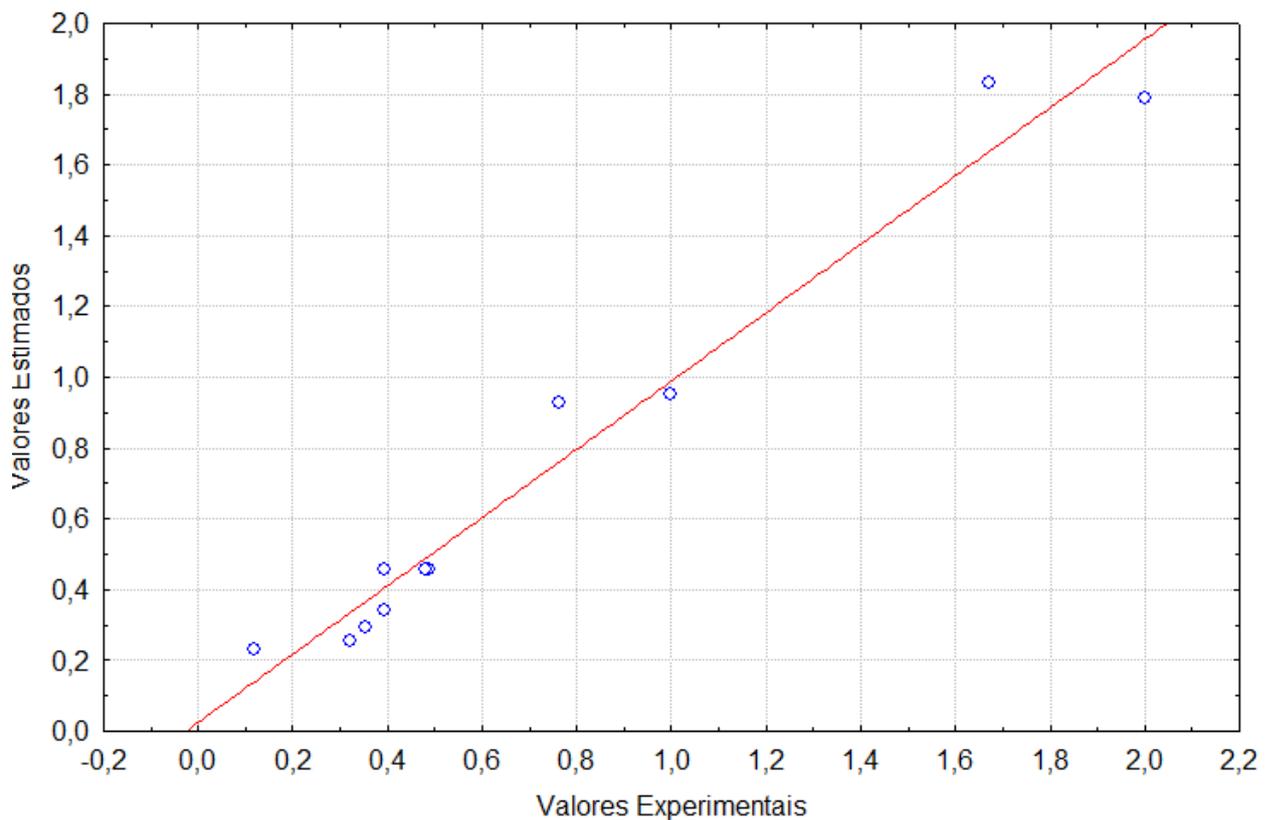


Figura 2.25 - Valores experimentais de k_e como uma função dos valores previstos pelo modelo.

Fonte: Do autor.

Há um bom ajuste entre o modelo gerado e pontos experimentais (figura 3.14). Os desvios relativos obtidos para K_e estimada pelo modelo da equação 13 são muito pequenos, confirmando que a análise de superfície pode ser utilizado para explicar a K_e .

Tabela 2.6 - Matriz de planejamento fatorial usada para investigar a influência das variáveis independentes sobre o coeficiente enzimático.

Ensaio	Variáveis				Resposta						
	x1	x2	PEG (%)	Citrato (%)	Kp	Atividade FS	Atividade FI	Soma da Atividade	K e Exp.	Ke estimado	Desvio
1	-1	-1	19	12	0,15	1,54	4,34	5,88	0,36	0,31	-0,05
2	1	-1	26	12	0,19	4,37	5,73	10,11	0,76	0,93	0,17
3	-1	1	19	16	0,19	1,94	6,00	7,94	0,32	0,27	-0,05
4	1	1	26	16	0,17	3,26	1,95	5,22	1,67	1,85	0,18
5	-1,41	0	17,6	14	0,15	0,31	2,60	2,91	0,12	0,24	0,12
6	1,41	0	27,4	14	0,18	3,80	1,90	5,70	2,00	1,80	-0,2
7	0	-1,41	22,5	11,2	0,17	2,85	7,27	10,12	0,39	0,35	-0,04
8	0	1,41	22,5	16,8	0,18	6,01	6,03	12,04	1,00	0,97	-0,03
9	0	0	22,5	14	0,23	2,72	5,60	8,32	0,49	0,46	-0,03
10	0	0	22,5	14	0,23	2,77	5,75	8,53	0,48	0,46	-0,02
11	0	0	22,5	14	0,24	2,69	6,80	9,49	0,40	0,46	0,06

Fonte: Do autor.

Tabela 2.7– Coeficientes de regressão para o coeficiente de atividade da lipase obtida do caldo de fermentação.

	Coef. de regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim de Conf. -95%	Lim. de Conf. 95%
Média	0,46	0,092	4,92	0,004382	0,217	0,692
x ₁ (L)	0,55	0,057	9,76	0,000192	0,407	0,697
x ₁ (Q)	0,28	0,067	4,12	0,009153	0,104	0,450
x ₂ (L)	0,22	0,057	3,82	0,012340	0,071	0,361
x ₂ (Q)	0,10	0,067	1,42	0,215978	-0,078	0,268
x ₁ .x ₂	0,24	0,080	2,94	0,032264	0,030	0,441

Fonte: Do Autor.

Tabela 2.8 – ANOVA para o coeficiente de atividade da lipase obtida do caldo de fermentação.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{Calc}	p-valor
Regressão	3,472	5	0,6944	27,125	0,001246
Resíduos	0,128	5	0,0256		
Falta de Ajuste	0,123				
Erro Puro	0,005				
Total	3,6	10			

% variação explicada (R^2) = 96,44%; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

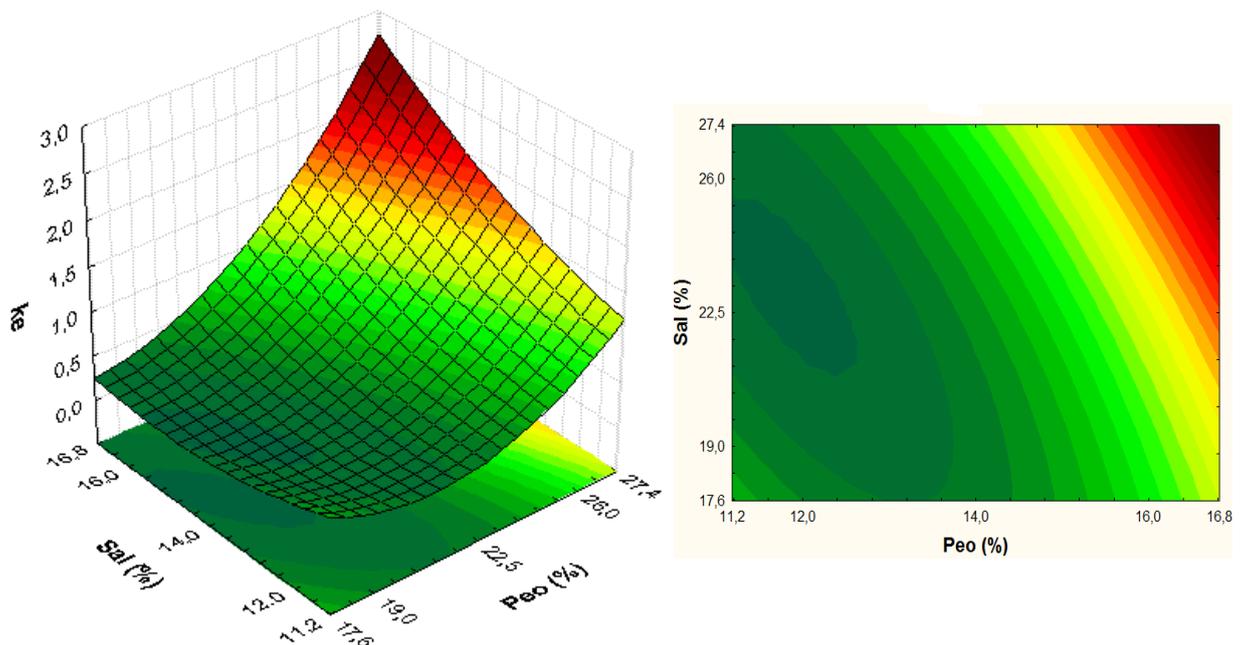


Figura 2.26 - Superfície de resposta e curva de contorno para K_e como uma função da percentagem de PEG e percentagem de sal.

Fonte: Do autor.

Figura 3.15 mostra um ponto de mínimo para o coeficiente de partição para a atividade (k_e). Os valores mais baixos de K_e são observados próximo ao ponto central na percentagem de sal e no nível de -1 percentagem de PEG. Como a enzima particiona preferencialmente na fase inferior é importante que a atividade na fase inferior seja mantida.

Para a validação do modelo proposto para k_{LGc} , foi escolhida para reproduzir as mesmas condições de ensaio, o ensaio 1 (19% de PEG e 12% de citrato de sódio), no qual foi obtido o menor coeficiente de partição da lipase. O valor estimado 0,1377 foi obtido pela equação 14, e o valor experimental foi encontrado foi de $0,1489 \pm 0,07$. E para validar o

planejamento da atividade foi escolhido o ensaio 7 (22,5% de PEG e 11,2% de citrato de sódio), pois este apresentou a maior atividade na fase inferior de 7,27 U/ml, onde existe a maior concentração de enzima dentro do sistema, o valor estimado calculado pela equação 15 de K_e foi de 0,35 e o experimental foi de $0,39 \pm 0,04$. Portanto, a metodologia do projeto fatorial e da superfície de resposta foi apropriada para descrever o particionamento da lipase nos SAB estudados.

Testes adicionais serão realizados para avaliar a atividade da enzima acima dos níveis máximos usados no planejamento, já que a maior atividade se apresentou nos níveis máximos, assim será possível determinar melhor a melhor composição do sistema para se obter uma maior atividade da LGc após a partição.

2.4 Conclusão

LGc é uma enzima hidrofílica com uma massa molecular de 60 kDa e de ponto isoeletrico de 4,3, de interesse em processos biotecnológicos para a produção de biodiesel. Neste trabalho, o coeficiente de partição da LGc foi investigado em função do pH, da variação da composição do polímero e do sal, adição de NaCl, da massa molar de PEG, hidrofobicidade, comprimento da linha de amarração e temperatura, com o objetivo de melhorar a seletividade dos SAB e determinar as melhores condições para a partição. Os resultados demonstraram uma influência maior da massa molar de PEG, CLA e da temperatura do sistema sobre o coeficiente de partição da LGc. Nos estudos da atividade após o processo de partição, houve uma grande inatividade da enzima nas condições estudadas, assim novos sistemas devem ser estudados para uma melhor manutenção da atividade após a partição do caldo fermentado, a fim de se obter uma enzima com maior fator de purificação e alta atividade. Os SAB estudados apresentaram concentração da LGc preferencialmente para a fase inferior, pois os valores de $K_{LGc} < 1$ em todos os sistemas estudados, apresentando um ligeiro aumento de k_p quando a interação do polímero e da enzima se tornava um pouco mais favorável. O sistema PEG + citrato de sódio + água foi eficiente para o processo de partição do caldo fermentado, mais não obteve êxito na manutenção da atividade, apresentando valores médios de atividade nas fases de 1,5 U/ml na fase superior e 5,5 U/ml na fase inferior, quando no caldo bruto produzido a atividade era de 23,5 U/ml. Os dados obtidos pela aproximação de Van't Hoff com a variação da temperatura forneceram evidências de fortes interações entre o LGc e o PEG na fase superior dos SAB, no entanto o baixo coeficiente de partição encontrado nos SAB formados por PEG de massa molar diferente é o que sugere que o processo de

transferência da LGc nestes sistemas é entropicamente conduzido. A otimização mostrou que em sistemas formados por maior concentração de PEG e citrato apresentaram uma maior manutenção da atividade após a partição e menores valores de k_p .

REFERÊNCIAS

- 1 - WEI X., et al. Formation and characteristics of aqueous two-phase systems formed by a cationic surfactant and a series of ionic liquids. **Journal of Chromatography B**, v. 939, p. 1–9, 2013.
- 2 - OOI C. W., et al. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 68–73, 2011.
- 3 - ZHANG Y.; LIU J. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 909–912, 2010.
- 4 - MARINI, A.; IMELIO, N.; PICÓ, G.; ROMANINI, D.; FARRUGGIA, B. Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 879, 2135–2141, 2011.
- 5 - OOI, C. W., et al. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1083–1087, 2009.
- 6 - NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Liquid–Liquid Extraction of Lipase Using Aqueous Two-Phase System. **Food Bioprocess Technol**, v. 4, p. 295–303, 2008.
- 7 - JAHIM, J. M.; MUTALIB, F. A. A.; ANUAR, N.; MARKOM, M. Optimization of lipase extraction from industrial preparation using aqueous two phase PEG6000/phosphate system. **Asian J. Exp. Sci**, V. 22, n. 1, p. 33-42, 2008.
- 8 - ZHOU, Y., et al. Purification of porcine pancreatic lipase by aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography B**, v. 926, p. 77–82, 2013.

- 9 - MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Enzymatic synthesis of biodiesel from vegetable oils using microbial lipases immobilized on resin affinity by multipoint covalent attachment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 109-115, 2011.
- 10 - HASAN, F.; ALI SHAH, A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 235-251, 2006.
- 11 - SANTOS, K. C., et al. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462– 470, 2013.
- 12 - GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 763–781, 2004.
- 13 - SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* Lipase by Long-Chain Fatty Acids. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 74, n. 2, p. 77-80, 1992.
- 14 - BAILLARGEON, M. W.; BISTLINE JR, R. G.; SONNET, P E.. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 30, p. 92-96, 1989.
- 15 - ZAREVUCKA M., et al. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 481–486, 2005.
- 16 – LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.
- 17 - SOARES, A. C. M. F., CASTRO, H. F. DE, MORAES, F. F., ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 77, p. 745, 1999.

- 18** - OLIVEIRA R. M., et al. Liquid-liquid equilibria of biphasic systems composed of sodium citrate + polyethylene (glycol) 1500 or 4000 at different temperatures. **J ChemEng Data.**; v. 53, p. 895-9, 2008.
- 19** - MARTINS J. P., et al. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures. **J ChemEng Data.**; v. 54, p. 2891-2894. 2009.
- 20** - CARVALHO, C. P., et al. Influence of the temperature and type of salt on the phase equilibrium of PEG 1500 + potassium phosphate and PEG 1500 + sodium citrate aqueous two-phase systems. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 209-213, 2008.
- 21** - MARINI, A., et al. Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 22, p. 2135-2141, 2011.
- 22** - BOYSEN, R. I., WANG, Y. , KEAH, H. H. , HEARN, M. T. W. Observations on the origin of the non-linear van't Hoff behavior of polypeptides in hydrophobic environments. **Biophys Chem.**, v. 77, p. 79-97, 1999.
- 23** - BASSANI, G., et al. Porcine pancreatic lipase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 859, n. 2, p. 222-228, 2007.
- 24** - ZHANG, Y. Y., & LIU, J. H. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of in *Trichosporon laibacchii* in using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 11, p. 909-912, 2010.
- 25** - SARAVANAN, S., et al. Partition of tannery wastewater proteins in aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-magnesium sulfate systems: Effects of molecular weights and pH. **Chemical Engineering Science**, v. 62, p. 969-978, 2007.

- 26 - PICÓ, G., BASSANI, G., FARRUGGIA, B., NERLI, B. Calorimetric investigation of the protein–flexible chain polymer interactions and its relationship with protein partition in aqueous two-phase systems. **International journal of biological macromolecules**, v. 40, n. 3, p. 268-275, 2007.
- 27 - ZAFARANI-MOATTAR, M. T., SADEGHI, R., HAMIDI, A. A. Liquid–liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and sodium citrate: experiment and correlation. **Fluid phase equilibria**, v. 219, n. 2, p. 149-155, 2004.
- 28 - BASSANI, G., FUCIÑOS, P., PICÓ, G., FARRUGGIA, B. Candida rugosa lipase Lip1–polyethylene glycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 2, p. 532-537, 2010.
- 29 – BARBOSA, J. M. P., et al. Purification of lipase produced by a new source of Bacillus in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 32, p. 3853-3858, 2011.
- 30 - BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 83-89, 2008.
- 31 – OLIVEIRA, G. G. G. et al. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. **Ver. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 2, 2001.
- 32 - GULATI, R., SAXENA, R. K., GUPTA, R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 149-155, 2000.
- 33 - TUBIO G, NERLI B, PICO G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 293–301, 2004.

- 34 - SVENSSON, M., BERGGREN, K., VEIDE, A., TJERNELD, F. Aqueous two-phase systems containing self-associating block copolymers: Partitioning of hydrophilic and hydrophobic biomolecules. **Journal of Chromatography A**, v. 839, p. 71, 1999.
- 35 - ALEXANDRIDIS, P., HATTON, A. Poly (ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 96, I 46, 1995.
- 36 - SCHRAG, J. D., LI, Y., WU, S., Cygler, M. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **J. Mol. Biol** , p.761-764, 1991.
- 37 - NUCCI H.D., NERLI B., PICO G., Comparison between the thermodynamic features of a 1-antitrypsin and human albumin partitioning in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol–dextran. **Biophy Chem**, v. 89, p. 219–29, 2001.
- 38 - SARUBBO, L. A., et al. Partition of proteins in aqueous two-phase systems based on cashew-nut tree gum and poly (ethylene glycol). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 685-691, 2004.