

# FATORES QUE AFETAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA: ENZIMAS QUE CATALISAM REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO

## FACTORS AFFECTING THE ENZYME ACTIVITY: ENZYMES WHICH CATALYSES OXI-REDUCTIVE REACTIONS

### RESUMO

Avaliou-se o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da glicose oxidase (GO), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutamato desidrogenase (GLUDH). A GO apresentou maior atividade ( $11,5 \times 10^{-4}$  mg  $H_2O_2$ /min.mL) em pH 5,0 e 30°C. A atividade da GO variou linearmente com a temperatura (30°C a 45°C), inclusive seguindo a lei de Van't Hoff, apresentando  $E_a = 53$  kJ/mol e  $(\Delta H)_{370C} = 50,4$  kJ/mol, além de ser estável por 30h a 30°C e pH 5,0. Quando usada em associação com a invertase e a catalase, a GO permitiu uma conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico da ordem de 92%. As desidrogenases (G6PDH e GLUDH) foram mais afetadas pelo pH do que pela temperatura, sendo o  $pH_{\text{ótimo}}$  da G6PDH igual a 7,5 e o da GLUDH igual a 7,0. A G6PDH e a GLUDH mantiveram-se estáveis por 30h quando submetidas, respectivamente, às condições pH 7,5/30°C e pH 7,0/30°C. Demonstrou-se, indiretamente, que a interconversão NADP/NADPH ocorreu ao longo de 30h de reação ao se usar o sistema G6PDH/GLUDH em reator com membrana, o qual foi alimentado alternadamente com glicose 6-fosfato (substrato da G6PDH) e 2-oxoglutarato/amônia (substratos da GLUDH).

**Palavras-chave:** Glicose Oxidase. Glicose 6-fosfato Desidrogenase. Glutamato Desidrogenase.

### ABSTRACT

It was studied the effect of pH and temperature on the activity of glucose oxidase (GO), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutamate dehydrogenase (GLUDH). The highest activity for GO ( $11,5 \times 10^{-4}$  mg  $H_2O_2$ /min.mL) occurred at pH 5,0 and 30°C. The GO activity varied linearly with the temperature, following the Van't Hoff's law, besides to be stable for 30h at pH 5,0 and 30°C and presenting activation energy and enthalpy of 53 kJ/mol and 50.4 kJ/mol, respectively. By using GO in association with invertase and catalase it was attained a yield of 92% for the sucrose conversion to fructose and gluconic acid. Regarding to G6PDH and GLUDH it was observed that pH affected more intensely the catalytic activity than temperature, being the optimal pH equal to 7.5 and 7.0, respectively. Both enzymes were stable for 30h at pH 7.5/30°C (G6PDH) and pH 7.0/30°C (GLUDH). By feeding a membrane reactor, containing G6PDH, GLUDH and NADP, alternately with glucose 6-phosphate (substrate of G6PDH) and 2-oxoglutarate/ammonium (substrates of GLUDH), it was observed, even so indirectly, the interconversion of the oxidized (NADP) and reduced (NADPH) form of the coenzyme along the 30h-reaction process.

**Keywords:** Glucose Oxidase. Glucose 6-phosphate Dehydrogenase. Glutamate Dehydrogenase.

*Fadi Antoine Taraboulsi-Jr,  
Diana Zukas Andreotti e  
Michele Vitolo\**

Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da USP, Depto.  
Tecnologia Bioquímico-  
Farmacêutica

\*Correspondência:  
E-mail: michenzi@usp.br

# INOVAÇÃO TECNOLÓGICA É O NOSSO COMPROMISSO!

**HITACHI**  
Inspire the Next

## MEV DE BANCADA COM EDS TM-3000



- Compacto, Menor e com Design Diferenciado, Melhor Resolução e Maior Magnificação.
- Fácil de Operar, Um botão para Começar; Estágio Maior, Amostras Maiores; Automação X/Y.
- Voltagem de Aceleração Variável e Plug de tomada Padrão. Não necessita instalações especiais.

O TM-3000 é uma alternativa real para Microscópios Óticos, Estereoscópios, Confocais e MEVs convencionais. Suas aplicações estão, nos mais variados setores incluindo Biologia, Alimentos, Cosméticos, Saúde, Farmacêutica, Têxtil, Ciência dos Materiais, Semicondutores, Educação, Geologia, entre outros.

## attension Theta QC Tensiômetro Óptico

NOVO TENSÍMETRO PORTÁTIL PARA LINHA DE  
PRODUÇÃO E LABORATÓRIO PARA ANÁLISES DE:

Ângulo de contato  
Molhabilidade  
Adesão  
Homogeneidade  
Printabilidade

Energia livre de superfície  
Espalhabilidade  
Sorção  
Limpeza

**Diversas aplicações em pesquisa e indústrias tais como:**

Tintas e Revestimentos, Tratamentos de Superfície, Papel e Embalagens, Engenharia de Superfície Impressão, Semicondutores, Laminação e Plásticos.



Rua Monsenhor Basílio Pereira, 50 - Jabaquara

Fone: 11 5079-8411

[www.dpunion.com.br](http://www.dpunion.com.br)

[info@dpunion.com.br](mailto:info@dpunion.com.br)



Acesse em  
nosso site!



## INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos, cuja atividade e estabilidade dependem da estrutura macromolecular. São proteínas globulares, cujo formato tridimensional é garantido por um ordenamento estrutural constituído por pelo menos três níveis hierárquicos de organização.

O primeiro nível relaciona-se à sequência e aos tipos dos aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica.

O segundo nível de organização resulta das interações entre aminoácidos da cadeia polipeptídica – ou de cadeias polipeptídicas, se existirem duas ou mais – através do compartilhamento de átomos de hidrogênio (constituem as “pontes de H”) entre dois átomos fortemente eletronegativos, no caso os átomos de nitrogênio (N) e de oxigênio (O). O átomo de hidrogênio poderá estar ligado ao átomo de nitrogênio ou ao de oxigênio. De qualquer modo, a “ponte de H” se configura pela interação eletrostática entre a densidade de carga positiva do átomo de hidrogênio ( $H^{d+}$ ), resultado da eletronegatividade do átomo de N ou de O, ao qual está ligado covalentemente, com o par de elétrons descompartilhado de outro átomo de O ou de N. Da formação de pontes de hidrogênio entre os aminoácidos da cadeia surgem os padrões estruturais  $\alpha$ -hélice e folha pregueada- $\beta$ . Normalmente, os dois padrões surgem em uma mesma cadeia peptídica, porém, no caso de existirem mais de uma cadeia na estrutura da proteína enzimática, o tema- $\beta$  se estabelece, também, entre as cadeias.

O terceiro nível de organização resulta, principalmente, da interação dos grupos químicos e/ou das próprias cadeias laterais dos aminoácidos através de uma variedade de ligações não covalentes (interação eletrostática, interação dipolo-dipolo, interação de Van der Waals, pontes de H, pontes de sulfeto, forças hidrofóbicas, dentre outras), fazendo com que no final a molécula da enzima adquira a forma globular.

O quarto nível organizacional ocorre quando a proteína possui mais de uma cadeia peptídica, as quais permanecem juntas através de ligações covalentes fracas (por exemplo, ponte de dissulfeto estabelecida entre duas moléculas do aminoácido cisteína situadas em cadeias distintas). Há enzimas que, além de possuírem os quatro níveis de organização, se agregam, formando estruturas “supramoleculares”. Um exemplo notório é a capacidade de agregação das moléculas de invertase – dímeras naturais – formando agregados tetraméricos, hexaméricos e octoméricos, que possuem atividades catalíticas crescentes (TOMOTANI, VITOLO, 2010).

Dado a complexidade estrutural das enzimas não é de surpreender que vários fatores reacionais possam interferir no desempenho catalítico e na estabilidade delas.

Os fatores interferentes na atividade enzimática podem ser divididos em dois grandes grupos, a saber, os que atuam em sítios específicos da macromolécula (substâncias tensoativas, ativadoras, inibidoras, dentre outras) e os que atuam de forma inespecífica - dita “randômica” – sobre a molécula (por exemplo, pH, temperatura e força iônica) (VENTURA, *et al.*, 2008; PURICH, 2010).

Está bem estabelecido que os fatores, os quais mais interferem sobre a atividade e a estabilidade enzimática durante o processo biocatalítico, são os de atuação randômica, sendo a influência do pH e da temperatura em enzimas óxido-redutoras objeto deste trabalho. Quanto aos fatores específicos, com exceção dos inibidores, pouca coisa se pode fazer, ou seja, ou a enzima necessita de um deles ou não. Caso necessite ele deverá ser incluído no meio reacional – por exemplo, íons magnésio na ativação da glicoseisomerase, enzima usada na produção dos xaropes ricos em frutose de uso amplo na indústria de alimentos (GODFREY, WEST, 1996); coenzimas  $\beta$ -nicotinamídicas fosforadas ou não para a atividade de desidrogenases (ANDREOTTI, *et al.*, 2010). No caso dos inibidores, eles são sempre evitados nos processos biocatalíticos, a menos que, do mecanismo de ação particular da enzima utilizada, surja e se acumula no meio reacional um subproduto, que acima de uma dada concentração passa a inibir a enzima, que o originou. Quando isso acontece, deve-se dispor de algum artifício para minimizar ou, se possível, anular o efeito inibitório. Por exemplo, na oxidação da glicose pela glicose oxidase forma-se água oxigenada, que acima de 1,3 mM passa a inativar a enzima (TOMOTANI, *et al.*, 2005). A solução para este caso se resume na decomposição da água oxigenada pela adição da catalase (enzima que degrada especificamente esta substância) ao meio de reação (Da SILVA, *et al.*, 2011).

O pH interfere essencialmente com o grau de ionização dos grupos químicos polares e/ou com carga elétrica, que no final pode perturbar com maior ou menor intensidade as interações não covalentes estabilizadoras da estrutura terciária e/ou quaternária da macromolécula. Se a variação do pH reacional levar a uma otimização da estrutura da enzima, o catalisador atuará com a maior velocidade de reação possível e esta concentração hidrogeniônica particular recebe o nome de “pH ótimo”. Fora deste valor, a enzima apresentará atividade menor, porque sofre uma modificação estrutural reversível (neste caso, a atividade máxima é recuperada, quando a enzima é colocada no pH ótimo, uma vez que, nesta situação, ligações não covalentes fundamentais foram preservadas) ou irreversível, quando a macromolécula sofre desestruturação intensa (PURICH, 2010).

A temperatura é o parâmetro energético por excelência de qualquer sistema. A energia associada a ela distribui-se como energia cinética dos componentes do sistema. Por conseguinte, quanto mais alta a temperatura do sistema maior é a energia cinética de seus componentes. Em um sistema reacional o aumento da energia cinética se traduz em aumento da velocidade da reação, uma vez que a energia cinética média das moléculas aumenta e, em consequência, a frequência dos choques intermoleculares, sobretudo os efetivos para a transformação química, também aumenta. No caso das enzimas o aumento da temperatura também favorece a velocidade da reação, sendo a temperatura na qual a velocidade é máxima denominada de temperatura ótima. Sucede que, no caso das enzimas, o aumento da temperatura não só au-

menta a energia cinética das moléculas, mas também promove o rompimento de ligações não covalentes – aquelas que justamente estabilizam a estrutura terciária e/ou quaternária (quando houver) -, que, dependendo da extensão, poderá provocar o desenovelamento de um dado sítio da macromolécula, levando, no final, à desnaturação da enzima. O efeito desnaturante da temperatura sobre a estrutura do catalisador é mais gradativo do que abrupto, devendo-se, portanto, levar em conta o tempo durante o qual a enzima ficou à dada temperatura. O binômio de ocorrência simultânea ativação/desnaturação obriga associar à temperatura ótima o tempo durante o qual a enzima ficou submetida àquela temperatura, ou seja, com relação à temperatura é possível considerar que a desnaturação é um fenômeno sempre presente. A questão essencial é se sua velocidade suplanta ou não a velocidade de ativação da enzima. Em moléculas que se agregam como no caso da invertase, o efeito gradual da temperatura sobre o catalisador é facilmente evidenciado. De QUEIROZ *et al.* (1996) demonstraram que a desnaturação térmica da invertase na forma solúvel ocorria de modo gradativo (primeiro as moléculas se separam e depois se desnaturam), enquanto que na forma imobilizada (invertase adsorvida em resina de troca iônica) ocorria de modo abrupto, uma vez que a separação das moléculas não poderia ocorrer, por se encontrarem ligadas ao suporte.

Neste trabalho, estudou-se o efeito do pH e da temperatura sobre as enzimas glicose oxidase, glutamato desidrogenase e glicose 6-fosfato desidrogenase, bem como a aplicação das mesmas em processos contínuos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

As enzimas catalase [EC.1.11.1.6], glicose 6-fosfato desidrogenase [EC.1.1.1.49], glutamato desidrogenase [EC.1.4.1.3] e glicoseoxidase [EC.1.1.3.4] e as coenzimas (NAD, NADP, NADH e NADPH) foram adquiridas da SIGMA®. A invertase [EC.3.2.1.26] foi adquirida da MERCK®. Os demais reagentes, todos de grau P.A., foram adquiridos de marcas tradicionais.

### Fatores que afetam as atividades enzimáticas

#### 1. Glicose oxidase (GO)

##### 1.a. Efeito do pH sobre a atividade da GO

Em um béquer de 250 mL de capacidade colocou-se 125 mL de uma solução-tampão acetato 0,01M (pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 ou 6,5), o qual foi colocado em banho-maria a 37°C. Borbulhou-se ar durante todo o tempo de reação, uma vez que o O<sub>2</sub> é um dos substratos da GO. Após 10min dissolveu-se sob agitação (100 rpm) 0,15g de glicose P.A. Após 5min adicionou-se 25 mL de solução aquosa de GO (180U). Disparou-se o cronômetro, passando-se a retirar

alíquotas de 1mL do meio reacional a intervalos de 10min até completar o tempo total de reação de 60min. As alíquotas, assim que retiradas, foram colocadas em banho-fervente para bloquear a reação. A quantidade de água oxigenada formada foi determinada por leitura em espectrofotômetro a 240nm. Imediatamente antes de se adicionar a enzima, tomou-se uma alíquota de 1 mL da solução do béquer, sendo usada como branco (tempo zero). O oxigênio dissolvido, mantido entre 4 e 5 mg/mL, foi determinado com oxímetro (DIGIMED, DM-4) em cada um dos instantes de retirada das alíquotas.

##### 1.b. Efeito da temperatura sobre a atividade da GO

De acordo com método descrito em 2.2.1.1., realizaram-se testes variando a temperatura (30°C, 35°C, 37°C, 40°C ou 45°C) com o pH mantido em 5,0.

##### 1.c. Estabilidade da GO em pH 5,0 e 37°C

Preparou-se seis balões de 25 mL de solução de GO (180U), em solução-tampão acetato 0,01M e pH 5,0. Após os tempos: 0; 0,5h; 1h; 2h; 10h; 20h e 30h, foram realizados testes com esta solução de enzima, na qual dosou-se a atividade enzimática residual, nas condições descritas em 2.2.1.1., sendo o pH mantido em 5,0. Os balões foram deixados em banho-maria a 37°C durante os tempos indicados.

#### 2. Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

##### 2.a. Efeito do pH sobre a atividade da G6PDH

Em uma cubeta de espectrofotômetro adicionou-se 910 µL de tampão-TRIS (0,05M; MgCl<sub>2</sub> 5mM), 10 µL de G6PDH (0,1U), 40 µL de glicose 6-fosfato (0,3mM) e 40 µL de NADP ou NAD (100 µL). A reação foi realizada a 30°C por 60s. A cada 5s, a quantidade de NADPH ou NADH formado foi registrada a 340nm. Os valores de pH avaliados foram: 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5.

##### 2.b. Efeito da temperatura sobre a atividade da G6PDH

De acordo com método descrito em 2.2.2.1, realizaram-se testes variando a temperatura (30°C, 35°C, 40°C ou 45°C) com o pH mantido em 7,5.

##### 2.c. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da G6PDH

A cada uma das temperaturas (30°C, 35°C, 40°C ou 45°C) a atividade da G6PDH foi medida em valores de pH iguais a 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5. A composição do meio de reação foi a mesma descrita em 2.a.

##### 2.d. Estabilidade da G6PDH frente ao pH e à temperatura

Prepararam-se soluções de G6PDH (0,1U) em tampão TRIS de pH 7,5, as quais foram deixadas em banho-maria a 30°C e 45°C por 30h. Alíquotas de 10 µL foram tomadas a cada 2h até que se completasse 12h. Após a 12<sup>a</sup> hora, foram retiradas alíquotas na 24<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> horas. A atividade residual de G6PDH foi medida em meio com composição descrita em 2.a.

### 3. Glutamato desidrogenase (GLUDH)

#### 3.a. Efeito do pH sobre a atividade da GLUDH

Em uma cubeta de espectrofotômetro, adicionou-se 70  $\mu\text{L}$  de 2-oxoglutarato (0,2M), 100  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio (3,2M), 720  $\mu\text{L}$  de tampão-TRIS (0,05M;  $\text{MgCl}_2$  5mM), 10  $\mu\text{L}$  de NADPH ou NADH (10 mg/mL) e 100  $\mu\text{L}$  de GLUDH (4U). A reação foi realizada a 30°C por 180s. A cada 30s, a quantidade de NADPH ou NADH consumida foi registrada a 340nm. Os valores de pH avaliados foram: 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5.

#### 3.b. Efeito da temperatura sobre a atividade da GLUDH

De acordo com método descrito em 3.a, realizaram-se testes variando a temperatura (30°C, 35°C, 40°C ou 45°C) com o pH mantido em 7,5.

#### 3.c. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da GLUDH

A cada uma das temperaturas (30°C, 35°C, 40°C ou 45°C) a atividade da G6PDH foi medida em valores de pH iguais a 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5. A composição do meio de reação foi a mesma descrita em 3.a.

#### 3.d. Estabilidade da GLUDH frente ao pH e à temperatura

Prepararam-se soluções de GLUDH (4U) em tampão TRIS de pH 7,0 e 7,5, as quais foram deixadas em banho-maria a 30°C e 45°C por 30h. Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram tomadas a cada 2h até que se completasse 12h. Após a 12<sup>a</sup> hora, foram retiradas alíquotas na 24<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> horas. A atividade residual de GLUDH foi medida em meio com composição descrita em 3.a.

## Aplicações das enzimas

### 1. Sistema G6PDH/GLUDH na regeneração NADP/NADPH

Em um reator com membrana de 10 mL de capacidade, já descrito previamente (TOMOTANI, *et al.*, 2005), foram colocados 1000  $\mu\text{L}$  de GLUDH (4U), 100  $\mu\text{L}$  de G6PDH (0,1U) e 400  $\mu\text{L}$  de NADP (10 mg/mL). A membrana usada no reator foi de 500Da. Através de uma bomba peristáltica, regulada para uma vazão de 10 mL/h, o reator foi alimentado com solução de glicose 6-fosfato (G6F) (50mM) durante 1h, seguindo-se a adição de uma solução contendo 2-oxoglutarato (0,2M) e sulfato de amônio (3,2M) por 2h. A seguir, a alimentação do reator foi feita alternando-se a adição das soluções de G6F e da mistura (2-oxoglutarato e sulfato de amônio) a cada 2h até completar 30h de processo contínuo. Amostras foram coletadas a cada 1h, nas quais foram determinados os consumos de amônia e de G6F através dos métodos do reativo de Nessler e de Somogyi, respectivamente. A reação foi conduzida a 30°C, pH 7,5 e 100 rpm.

### 2. Conversão contínua da sacarose em ácido glicônico pela associação da GO com enzimas auxiliares (invertase e catalase)

Em um reator com membrana de 400 mL de capacidade, já descrito por DA SILVA (2010) e munido de membrana de

100kDa, introduziram-se invertase (70U), GO (7.000U) e catalase (236.000U), sendo, a seguir, alimentado com solução de sacarose (64g/L) à vazão de 100mL/h. A pressão interna do reator foi mantida a 3bar através da injeção de ar comprimido e o volume operacional foi mantido a 300mL durante 15h de processo contínuo. As demais condições de reação foram: pH 5,0, 37°C, 100 rpm e tempo de residência de 3h. Amostras foram retiradas a cada 1h para fins analíticos.

## MÉTODOS ANALÍTICOS

### 1. Dosagem dos açúcares redutores

A dosagem dos açúcares redutores (glicose e glicose 6-fosfato) foi feita utilizando-se os reagentes de Somogyi-Nelson, conforme modificação proposta por TARABOULSI-Jr, VITOLO (2010).

### 2. Dosagem da amônia

A amônia foi dosada pelo método do reativo de Nessler, conforme ANDREOTTI, *et al.* (2010).

### 3. Dosagem da água oxigenada

A dosagem da água oxigenada foi feita conforme descrito por TOMOTANI, *et al.* (2005).

### 4. Detecção da coenzima NADP(H)

Para certificar-se que a coenzima  $\beta$ -nicotinamídica NADP(H) ficou retida dentro do reator contínuo, fizeram-se leituras das amostras diretamente nos comprimentos de onda 260nm e 340nm, segundo método descrito por ANDREOTTI, *et al.* (2010). Em nenhuma situação detectou-se escape da coenzima do reator.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Glicose Oxidase (GO)

O efeito do pH sobre a atividade da GO pode ser analisado através da Figura 1, na qual observa-se que a maior atividade, da ordem de  $11,5 \times 10^{-4}$  mg  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min.mL, ocorreu em pH 5,0. A verificação da existência de um  $\text{pH}_{\text{ótimo}}$  para a atividade de uma enzima evidencia, que nesta concentração hidrogeniônica particular, a macromolécula adquire a conformação estrutural mais adequada e eficiente para atuar sobre o substrato, no caso a glicose. As atividades observadas em valores de pH menores ou maiores que o  $\text{pH}_{\text{ótimo}}$  desde que não difiram em mais de 20%, constituem-se em condições nas quais a molécula enzimática, embora não estando na sua melhor conformação, ainda possui plena capacidade catalítica (PURICH, 2010). Em última análise, a variação da concentração hidrogeniônica do meio interfere com o grau de ionização dos grupos ionizáveis localizados nas cadeias laterais dos aminoácidos constituintes da estrutura primária

# HPLC

Colunas para Cromatografia Líquida  
feitas no Brasil 🇧🇷

Fases estacionárias:

C30, C18, C8, C6, C4, C1, Fenil, NH<sub>2</sub>, Ciano, Sílica.

Comprimento:

Todos de 1cm até 30cm.

Diâmetro Interno:

4,6mm; 4,0mm; 3,9mm; 3,0mm; 2,1mm; 2,0mm; 1,0mm.

Partículas:

2µm; 3µm; 3,5µm; 4µm; 5µm; 10µm.

Especiais:

Outras dimensões e fases são produzidos sob consulta.



Representantes Sudeste:  
CMS Instrumentos Analíticos Ltda.  
[www.cmscientifica.com.br](http://www.cmscientifica.com.br)  
TEL: 19 3812.9222  
[cms@cmscientifica.com.br](mailto:cms@cmscientifica.com.br)  
Cosmópolis SP - Brasil

Representantes Centro-Oeste:  
JPChrom Com. de Prod. Lab. Ltda.  
TEL: 61 8114.1800  
[junior.jpchrom@gmail.com](mailto:junior.jpchrom@gmail.com)  
Brasília DF - Brasil

Demais Regiões:  
[www.nstonline.com.br](http://www.nstonline.com.br)  
TEL: 16 3376.9914  
[info@nstonline.com.br](mailto:info@nstonline.com.br)  
São Carlos SP - Brasil

**nst**  
Nano Separation Technologies

da molécula. Em consequência, ligações não covalentes de natureza eletrostática (ponte de H, interação dipolo-dipolo, interação iônica, dentre outras), que estabilizam a estrutura tridimensional da molécula – cuja conformação é a verdadeira responsável pela ação catalítica – são desfeitas, levando à modificação da estrutura da cadeia proteica e à variação da atividade.

Salienta-se que o valor encontrado para o pH corrobora aqueles descritos na literatura (BAO, *et al.*, 2001; RABA, MOTTOLA, 1995; FOGARTY, KELLY, 1990; Da Silva, 2010).

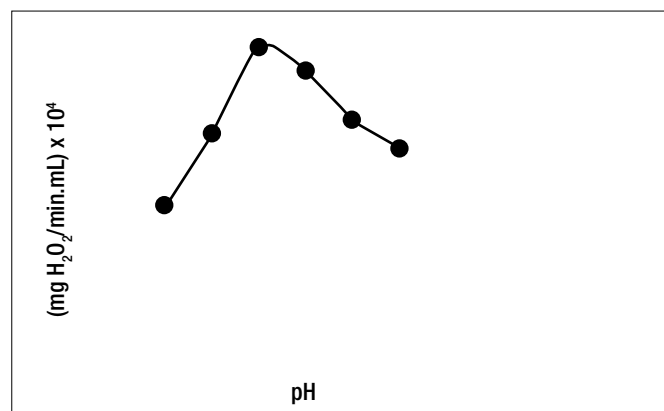


Figura 1. Efeito do pH sobre a atividade da glicose oxidase

A Figura 2 mostra a variação da atividade da GO em função da temperatura, que no caso segue um perfil linear em conformidade com a equação:

$$v_{GO} = 7 \times 10^{-5}T - 145 \times 10^{-5} \quad (r = 0,990) \quad (\text{Eq. 1})$$

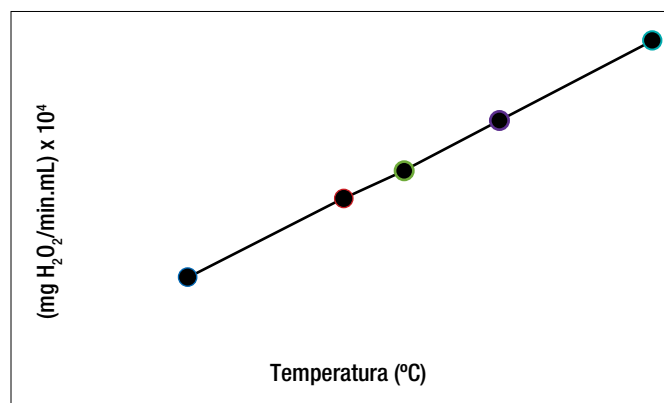


Figura 2. Efeito da temperatura sobre a atividade da glicose oxidase

Normalmente, o perfil de uma curva dessas tem o formato de sino, indicando a existência de uma temperatura ótima para a atividade enzimática (PURICH, 2010). Neste trabalho, entretanto, o perfil referido não foi observado, provavelmente, devido à faixa estreita de temperatura considerada para o estudo frente à termoestabilidade particular desta enzima.

Em todo o caso, a GO nas condições do ensaio e no intervalo de temperatura considerado teve sua atividade seguindo a lei de Vant'Hoff, cuja velocidade de reação dobra para um aumento de 10°C na temperatura de reação, fato não muito comum para as enzimas em geral (GODFREY, WEST, 1996).

Tabela 1. Variação da atividade da GO frente à temperatura para a determinação da energia de ativação (Ea), conforme o método convencional de Arrhenius

T (°C)	T (K)	V <sub>GO</sub> (U/mL)x10 <sup>5</sup>	1/T(K <sup>-1</sup> )x10 <sup>3</sup>	Ln v <sub>GO</sub>
30	303	61	3,30	- 7,40
35	308	78	3,25	- 7,16
37	310	98	3,23	- 6,93
40	313	124	3,19	- 6,69
45	318	156	3,14	- 6,46

A partir dos dados apresentados na Tabela 1, aplicou-se o método convencional de Arrhenius para a determinação da energia de ativação (Ea; kJ/mol) (Figura 3) - representado pela Eq. 2 - e, em consequência, a entalpia de reação ( $\Delta H$ )<sub>37°C</sub> (kJ/mol) através da equação 3.

$$\text{Ln } (v_{GO}) = (Ea/R) \times (1/T) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$(\Delta H)_{37^\circ\text{C}} = Ea - 2,6 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde T = temperatura absoluta (K) e R = constante universal dos gases (8,3144x10<sup>-3</sup> kJ/mol.K).

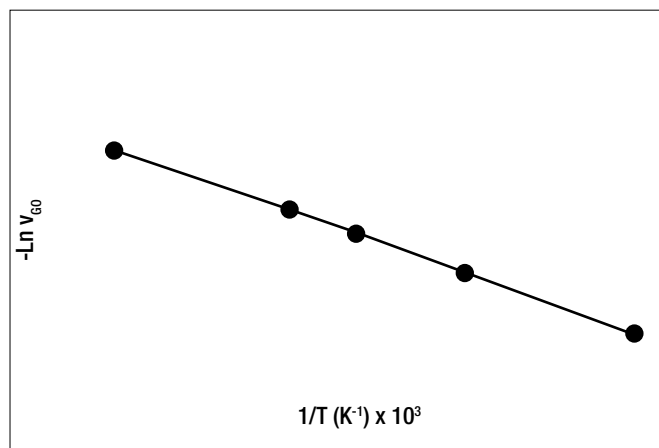


Figura 3. Logaritmo natural da atividade da glicose oxidase em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação (Ea), segundo o método convencional de Arrhenius

Da Figura 3 observa-se que  $\text{Ln } (v_{GO}) = f(1/T)$  é linear, obedecendo à equação:

$$\text{Ln } (v_{GO}) = - 6315,1 \cdot (1/T) + 13,422 \quad (r = 0,990) \quad (\text{Eq. 4})$$

Comparando as Eqs. 2 e 4, tem-se que  $E_a = 53 \text{ kJ/mol}$ . Colocando este valor na Eq. 3 tem-se que  $(\Delta H)_{37^\circ\text{C}} = 50,4 \text{ kJ/mol}$ .

**Tabela 2.** Atividade residual da GO após uma solução da enzima ter sido deixada em pH 5,0 e 37°C por 30h.

Amostra (h)	$v_{\text{GO}} (\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{min.mL}) \times 10^3$
0	1,15
0,5	1,16
1	1,17
2	1,14
10	0,985
20	0,990
30	1,01

Quando a reação catalisada pela enzima for de longa duração, como nos processos contínuos, é de fundamental importância verificar a estabilidade da enzima frente ao pH e à temperatura do processo. Da Tabela 2, tem-se que a atividade da GO entre 0 e 30h perdeu cerca de 10% de sua atividade inicial, o que pode ser considerada uma boa estabilidade frente aos parâmetros considerados. A perda verificada não é de fácil explicação, uma vez que tanto o pH quanto a temperatura atuam randomicamente por toda a estrutura da macromolécula, infringindo-lhe fragilizações em diferentes pontos da estrutura. Este fato dar-se-ia através da eliminação e/ou modificação de determinadas ligações não covalentes, as quais isoladamente não causariam mal à atividade da enzima, mas que ao se acumularem ao longo do tempo, têm um efeito sinérgico deformador sobre a conformação da macromolécula, afetando seu desempenho catalítico.

### Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6pdh)

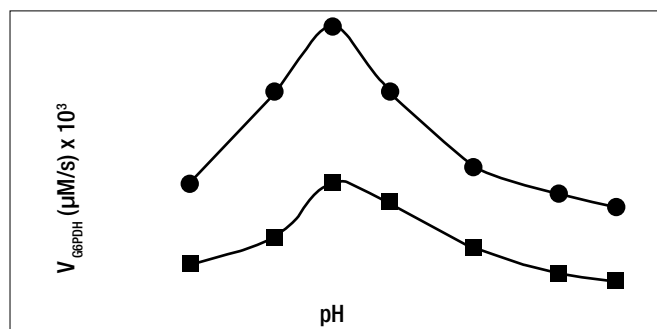
Na Figura 4 apresentam-se a variação da G6PDH com o pH do meio reacional, usando-se o NADP e o NAD como coenzimas.

A maior atividade ocorreu em pH 7,5, independentemente da coenzima usada. No entanto, a atividade máxima da enzima

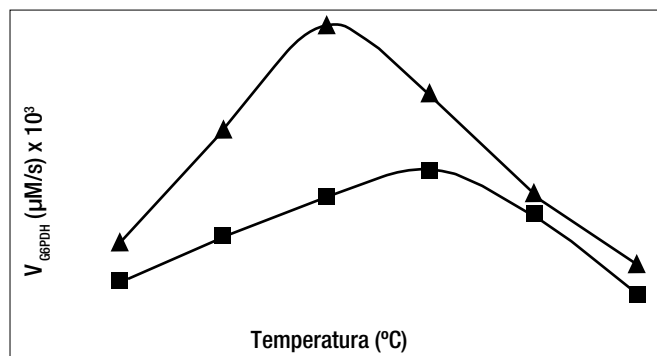
na presença do NADP (0,0368  $\mu\text{M}$  de NADPH formado/s) foi 2,3 vezes maior do que na presença do NAD (0,0160  $\mu\text{M}$  de NADH formado/s), mostrando a maior afinidade catalítica da G6PDH pelo NADP. Por este motivo, ao se empregar a G6PDH em um dado processo a coenzima de escolha deverá ser o NADP.

O efeito da temperatura sobre a G6PDH dependeu da coenzima empregada (Figura 5), uma vez que as maiores atividades para o NADP (0,0368  $\mu\text{M}$  de NADPH formado/s) e o NAD (0,0206  $\mu\text{M}$  NADH formado/s) ocorreram a 30°C e 35°C, respectivamente.

Na Tabela 3 são apresentadas as atividades da G6PDH frente ao NADP e NAD para várias combinações entre o pH



**Figura 4.** Variação da atividade da G6PDH frente ao pH e na presença de NADP (●) e NAD (■)



**Figura 5.** Variação da atividade da G6PDH frente à temperatura e na presença de NADP (▲) e NAD (■)

**Tabela 3.** Atividade da G6PDH na presença da coenzima (NADP\* ou NAD\*\*) frente à ação combinada do pH e da temperatura. Mostram-se as médias [ $\mu\text{M/s} \times 10^4$ ], os desvios-padrão (DP) [ $\mu\text{M/s} \times 10^4$ ] e o Coeficiente de variação (CV) (%)

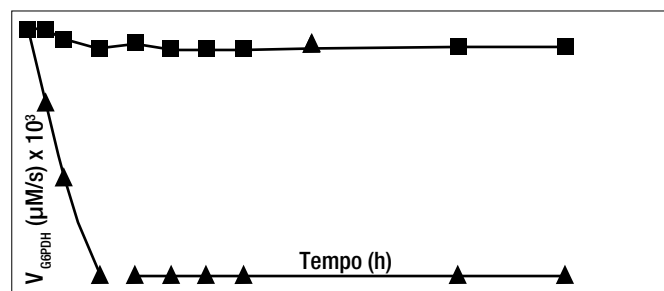
pH	Atividade ( $\mu\text{M/s}) \times 10^4$				Média	DP	CV
	30°C	35°C	40°C	45°C			
7,0	203*/76**	186/64	182/72	169/70	185/70	14/5	8/7
7,5	278/220	253/177	265/200	338/179	284/194	38/20	13/10
8,0	236/188	276/187	256/184	221/175	247/184	24/6	10/3
8,5	199/151	187/155	199/120	192/131	194/139	6/17	3/12
Média	229/159	226/146	226/144	230/139			
DP	37/62	46/56	41/59	75/51			
CV	16/39	20/39	18/41	18/37			

e a temperatura, observando-se que, independentemente da coenzima usada, o pH é o fator de maior efeito sobre a atividade desta enzima. Provavelmente, o fenômeno possa ser explicado considerando que a eficiência catalítica da G6PDH depende do modo e da intensidade da interação química com a coenzima, mais sujeita à variação do pH de reação do que da temperatura. Esta última, como bem sabido, contribuiria para a catálise, favorecendo apenas o encontro enzima-coenzima, sem mudar o padrão específico de interação entre esses dois componentes. Inclusive, temperatura mais alta poderia contribuir com o rompimento e/ou desfavorecimento da formação de ligações químicas não covalentes estabilizadoras do binômio G6PDH-coenzima.

A estabilidade da G6PDH frente ao pH (7,5) e à temperatura (30°C e 45°C) na presença de NADP por um período de 30h está mostrada na Figura 6. Sem dúvida alguma, a enzima mostrou-se instável a 45°C, perdendo quase toda a sua atividade após 2h de incubação. Este comportamento é observado com enzimas que possuem organização estrutural a nível quaternário, caso da G6PDH (Das NEVES, 2002; ROSSI, et al., 2009). Inclusive, como exemplo, se demonstra o cálculo da energia de ativação de desnaturação térmica ( $Ea^*$ ), da correspondente entalpia de desnaturação ( $\Delta H^*$ ) e das meias-vidas da G6PDH nas temperaturas de 40°C e 45°C, através das equações 4-7, conforme preconizado por OWUSU, MARKZOOM (1992). Os dados de atividade frente às temperaturas consideradas encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Atividade da G6PDH medida entre 0 e 1,5h na presença de NADP frente às temperaturas de 40°C e 45°C, sendo a enzima dissolvida em solução tampão TRIS (pH 7,5)

Tempo (h)	40°C		45°C	
	$v_{40}$ ( $\mu\text{M/s}$ )	$\text{Log } v_{40}$	$v_{45}$ ( $\mu\text{M/s}$ )	$\text{Log } v_{45}$
0	-	-	-	-
0,25	0,0342	- 1,466	0,0240	- 1,620
0,50	0,0326	- 1,487	0,0160	- 1,796
0,75	0,0318	- 1,498	0,0112	- 1,951
1,00	0,0309	- 1,510	0,00600	- 2,222
1,25	0,0298	- 1,526	0,00390	- 2,408
1,50	0,0288	- 1,541	-	-



**Figura 6.** Estabilidade da G6PDH em pH 7,5 às temperaturas de 30°C (■) e 45°C (▲) e na presença de NADP

$$\text{Log } v = -k_d \cdot t + b \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\text{Log } (k_d)_{45}/(k_d)_{40} = (Ea^*/2,303 \cdot R) \cdot [(T_2 - T_1)/T_1 \cdot T_2] \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\Delta H^* = Ea^* - RT \quad (\text{Eq. 6})$$

$$t_{1/2} = \text{Ln } 2 / k_d \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde:  $\text{Log } v$  = logaritmo da atividade enzimática;  $k_d$  = constante de desnaturação térmica ( $\text{h}^{-1}$ );  $t$  = tempo (h);  $b$  = coeficiente linear;  $R$  = constante dos gases;  $T$  = temperatura absoluta (K);  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida (h).

Aplicando a Eq. 4 aos dados da Tabela 4 para as duas temperaturas, obteve-se:

$$\text{Log } v_{40} = -0,059 \cdot t - 1,45 \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\text{Log } v_{45} = -0,80 \cdot t - 1,41 \quad (\text{Eq. 9})$$

Sabendo que  $(k_d)_{40} = 0,059\text{h}^{-1}$  e  $(k_d)_{45} = 0,80\text{h}^{-1}$  e aplicando as equações 5 a 7, obtiveram-se:  $Ea^* = 432 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta H^* = 429 \text{ kJ/mol}$ ,  $t_{1/2(40)} = 11,7\text{h}$  e  $t_{1/2(45)} = 0,90\text{h}$ .

De acordo com os autores deste modelo (OWUSU, MARKZOOM, 1992), os valores de  $\Delta H^*$  entre 200 e 300 kJ/mol denotam o desenovelamento da estrutura terciária e/ou quaternária da enzima, levando à desnaturação irreversível da mesma. No caso da G6PDH, a entalpia de desnaturação situa-se bem acima do intervalo proposto pelos autores citados, devendo-se isto à complexidade estrutural desta enzima. Acrescenta-se que, ao se levar em conta os tempos de meias-vidas, a temperatura máxima de trabalho para a G6PDH não pode ultrapassar 40°C.

### Glutamato Desidrogenase (GluDH)

A glutamato desidrogenase na faixa de pH entre 7,0 e 8,5 tem comportamento atípico, uma vez que sua atividade oscila muito para variações de pH da ordem de 0,5, independentemente da coenzima utilizada (NADPH ou NADH) (Figura 7). No entanto, a faixa de pH considerada é a mesma encontrada na literatura (BERGMEYER, 1984). Neste caso, as maiores atividades da enzima – 0,35 e 0,50 mg de  $\text{NH}_4^+$  consumido/mL.s, respectivamente, em presença da NADPH e NADH – ocorreram em pH 7,0. Certamente, a particular composição em aminoácidos – com cadeias laterais contendo grupos químicos altamente ionizáveis, ou seja, aminoácidos com caráter anfótero altamente dependente da concentração hidrogeniônica do meio reacional – das cadeias peptídicas constituintes da sua estrutura quaternária, bem como a interação mais ou menos flexível entre as cadeias, sobretudo se pontes de sulfeto estão envolvidas, conferem à enzima alta susceptibilidade ao pH do meio de reação.

# TUDO PARA CROMATOGRAFIA!

## Colunas para GC



## Linha completa de Acessórios



## SPE Extração de Fase Sólida



## Colunas para HPLC



## Assistência Técnica

- Manutenção Preventiva e Corretiva
- Qualificação de Performance
- Qualificação Operacional
- Trabalhamos com diversas Marcas

**Consulte-nos!**

## LINHA DE EQUIPAMENTOS



Purificador de Água



HPLC



GC



Absorção Atômica

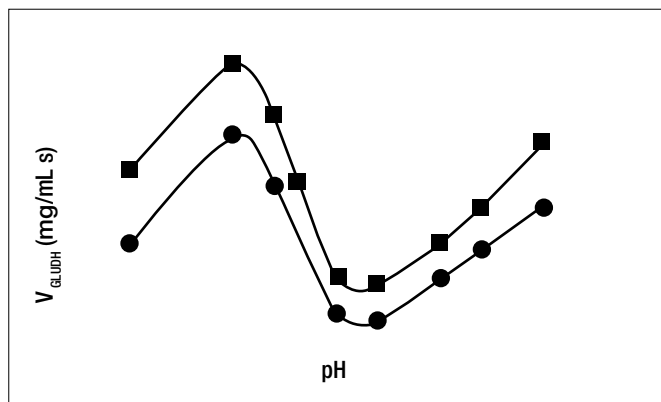
## Qualificação e Manutenção em Sistemas de Purificação de Água Millipore\*



Tel.: (11) 3464 8900 Fax: (11) 3464 8901  
E-mail: [allcrom@allcrom.com.br](mailto:allcrom@allcrom.com.br)  
[www.allcrom.com.br](http://www.allcrom.com.br)



\*Todas as marcas citadas são de seus respectivos proprietários.  
\*As imagens não são proporcionais ao tamanho real e são meramente ilustrativas.



**Figura 7.** Efeito do pH sobre a atividade da glutamato desidrogenase na presença de NADPH (●) e NADH (■)

A atividade da GLUDH no intervalo de temperatura entre 30°C e 45°C apresentou comportamento crescente, independentemente do tipo de coenzima empregada. (Tabela 5). Salienta-se que, nas condições de reação e do intervalo de temperatura empregadas, a GLUDH é uma enzima que aparentemente segue a lei de Van't Hoff, conforme já discutido para a glicose oxidase.

Aplicando aos dados da Tabela 5 a Eq.2, referente ao método convencional de Arrhenius, conforme já discutido anteriormente, calculou-se os valores de energia de ativação ( $E_a$ ) da ordem de 53 kJ/mol e 66 kJ/mol, respectivamente, para GLUDH-NADPH e GLUDH-NADH. Portanto, a velocidade da reação catalisada pela GLUDH na presença de NADPH é cerca de 20% maior do que quando em presença do NADH.

**Tabela 5.** Atividade da glutamato desidrogenase frente a diferentes temperaturas

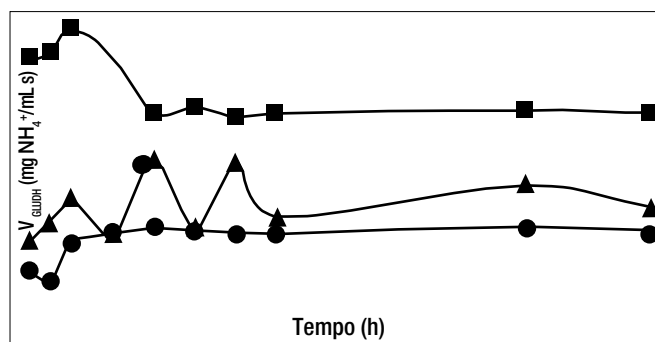
temperatura(°C)	Atividade(mg/mL.s)x10 <sup>4</sup>
30	264
35	424
40	584
45	744

**Tabela 6.** Atividade da GLUDH na presença da coenzima (NADPH\* ou NADH\*\*) frente à ação combinada do pH e da temperatura. Mostram-se as médias [(mg de  $\text{NH}_4^+$  consumido/mL.s)x10<sup>3</sup>], os desvios-padrão (DP)[(mg de  $\text{NH}_4^+$  consumido/mL.s)x10<sup>3</sup>] e o Coeficiente de variação (CV) (%).

pH	Atividade (mg de $\text{NH}_4^+$ cons./mL.s)x10 <sup>3</sup>				Média	DP	CV
	30°C	35°C	40°C	45°C			
7,0	358*/163**	321/446	330/462	320/517	332/397	159/5	40/7
7,5	42/35	43/38	53/62	69/72	52/52	13/18	24/36
8,0	199/286	173/215	212/178	320/309	226/247	65/61	29/25
8,5	141/330	126/287	94/276	139/142	125/259	22/82	17/32
Média	185/207	166/247	172/245	212/260			
DP	132/133	117/170	125/169	128/198			
CV	72/65	70/69	73/69	60/76			

No que se refere aos efeitos interativos entre o pH e a temperatura sobre a atividade da GLUDH (Tabela 6), observa-se que a variação do pH afeta a atividade desta enzima mais intensamente do que a variação da temperatura, independentemente, inclusive, do tipo de coenzima usada (NADPH ou NADH). Não há dúvidas de que o maior efeito exercido pelo pH resulta da complexidade da estrutura quaternária da GLUDH, que é formada por seis cadeias peptídicas (PETERSON, SMITH, 1999). Lembra-se que se chegou a resultado análogo no caso da G6PDH.

Da Figura 8, observa-se que a GLUDH mostrou-se estável em pH 7,0 e 30°C, quando mantida nestas condições por 30h. Quando a temperatura foi aumentada para 45°C, houve uma diminuição da atividade residual da ordem de 20%. Um aspecto relevante é o fato da atividade residual da GLUDH ter oscilado significativamente, quando a enzima foi mantida a 30°C e pH 7,5 pelo mesmo tempo. Este comportamento não uniforme da enzima vem de encontro ao fato já salientado sobre o comportamento atípico da atividade da GLUDH frente à variação do pH (Figura 7).



**Figura 8.** Estabilidade da glutamato desidrogenase em pH 7,0 e temperaturas de 30°C (●) e 45°C (■) e em pH 7,5 à temperatura de 30°C (▲)

## Aplicações

É inquestionável que o avanço tecnológico que, a grosso modo, pode ser visto como um processo de duas fases distintas

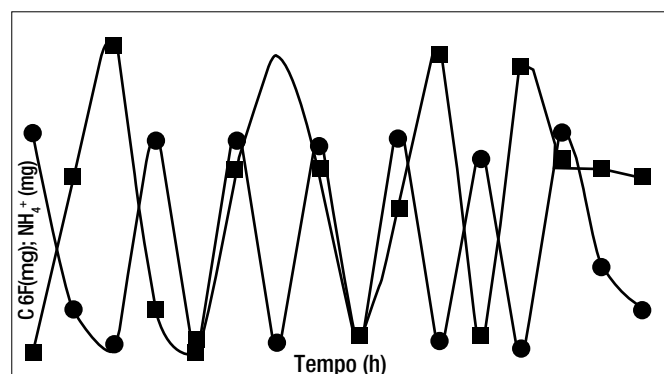
se dá pela fusão do conhecimento básico (1ª fase) com o aplicativo (2ª fase). A caracterização enzimática se enquadra nessa ideia, uma vez que tem por objetivo primeiro, de natureza puramente básica, a compreensão do modo pelo qual a enzima atua e o de aquilatar a intensidade da transformação de um dado substrato e identificar fatores que aumentam ou diminuem esta atividade. O segundo objetivo é o da aplicação, baseada nos parâmetros cinéticos otimizados na fase básica.

Para ilustrar a aplicação das enzimas caracterizadas neste trabalho, selecionou-se a regeneração das formas oxidada (NADP) e reduzida (NADPH) de uma coenzima  $\beta$ -nicotinamida-adenina pela ação combinada das desidrogenases G6PDH e GLUDH. Em que pese o grande interesse dessa transformação, desde os anos sessenta do século passado, ainda, se constitui em questão aberta quando vista sob a ótica da aplicação industrial (TOMOTANI, *et al*, 2009). Outra aplicação interessante é o uso combinado de enzimas para converter substratos de baixo valor agregado em produtos de maior valor comercial e/ou importados pelo país (Da SILVA, 2010). Para este caso, apresentou-se um ensaio envolvendo a conversão da sacarose – substrato abundante e de baixo custo – em frutose e ácido glicônico, usando as enzimas invertase, glicose oxidase e a catalase.

### 1. Sistema G6PDH/GLUDH na Regeneração NADP/NADPH

A partir de experimentos preliminares (ANDREOTTI, 2010) concluiu-se que a forma mais promissora para se conseguir a regeneração NADP/NADPH seria através de processo contínuo em reator com membrana, ao qual a adição dos substratos da G6PDH (G6F) e da GLUDH (2-oxoglutarato e sulfato de amônio) fosse feita de modo alternado.

A Figura 9 ilustra este processo, cuja duração foi de 30h, observando-se que a concentração dos substratos oscilou conforme se poderia antever, sendo este fato uma demonstração indireta da ocorrência da regeneração NADP/NADPH. Inclusive, nas amostras obtidas ao longo do processo, não foi observado o escape do reator de nenhuma das formas da coenzima.



**Figura 9.** Variação da quantidade de glicose 6-fosfato (●) e de amônia (■) durante 30h de reação acoplada G6PDH/GLUDH e na presença de NADP. Os substratos foram adicionados alternadamente, iniciando-se a alimentação do reator com G6F. O fluxo de alimentação, pH e a temperatura foram mantidos constantes e iguais a 10mL/h, 7,0 e 30°C

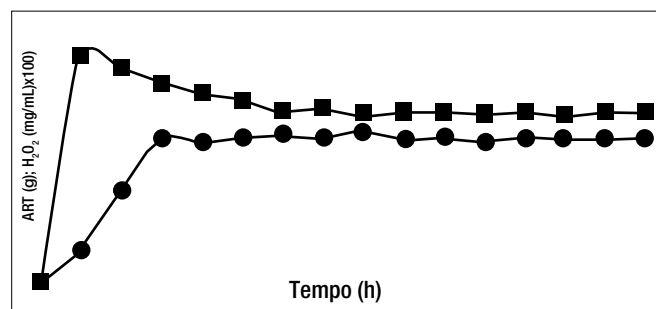
Dado o processo contínuo ser de natureza transiente não foi possível calcular uma percentagem global de conversão média para os substratos (G6F e Amônia), mas em intervalos de 10h (Tabela 7). Observa-se que os percentuais de conversão, não se mantiveram em patamar superior a pelo menos 50%, indicando que o processo requer, ainda, ajustes, em que pese a regeneração da coenzima ter sido possível.

**Tabela 7.** Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Figura 9

Intervalo de tempo (h)	G6F (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)
1 - 12	47	50
13 - 24	20	14
25 - 30	-	27

### 2. Conversão contínua da sacarose em ácido glicônico pela associação da GO com enzimas auxiliares (invertase e catalase)

A Figura 10 apresenta os dados obtidos para a conversão multienzimática contínua da sacarose, conforme descrita em “Aplicação das Enzimas”, item 2.



**Figura 10.** Variação da quantidade de açúcares redutores totais (ART) [●] e de água oxigenada [■] na conversão contínua da sacarose (64g/L) pela ação conjunta da invertase 777 U, glicose oxidase (7.000U) e catalase (236.000)

Da citada figura infere-se que o rendimento da conversão, da ordem de 92%, foi muito bom, sendo que o processo ainda requer alguns ajustes, visando alcançar a conversão total do substrato. Será necessário, logicamente, submeter o meio de reação no final do processo a uma separação cromatográfica para separar a frutose e o ácido glicônico. Porém, desta última etapa os dois produtos já sairão na forma de soluções – xarope com alto teor em frutose, acima de 90%, e solução aquosa de ácido glicônico 50% (p/p) -, as quais são de comercialização direta.

### CONCLUSÕES

Os fatores pH e temperatura nas respectivas faixas selecionadas mostraram efeitos claros e distintos sobre as

atividades da GO, G6PDH e GLUDH. Os valores nos quais são observadas as maiores atividades das enzimas devem ser adotados, quando se procede à aplicação delas em processos. Assim, os pares pH/temperatura para a GO, G6PDH e GLUDH seriam, respectivamente, iguais a pH(5,0)/37°C, pH(7,5)/30°C [NADP]<sub>G6PDH</sub> - pH(7,5)/35°C [NAD]<sub>G6PDH</sub> - e pH(7,0)/45°C. Considerando os parâmetros de reação pH e temperatura simultaneamente, observou-se que a atividade das desidrogenases (G6PDH e GLUDH) foi mais afetada pelo pH do que pela temperatura. Em termos das aplicações exemplificadas, observou-se conversão da sacarose superior

a 90% usando a GO em associação com a invertase e a catalase, além de ter sido possível demonstrar a manutenção por 30h de processo, em reator com membrana, a interconversão das formas oxidada e reduzida da coenzima ao se empregar o sistema G6PDH/GLUDH.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Agências CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS

- TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Inverted sugar syrup attained from sucrose hydrolysis using a membrane reactor. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.46, n.3, p.571-577, 2010.
- VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M.; FREIRE, A. P. Catálise enzimática: alguns destaques na evolução da enzimologia. In: *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. BOM, P. S. E.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Eds. Editora Interciência, Rio de Janeiro, RJ, p.1-27, 2008.
- PURICH, L. D. *Enzyme kinetics: catalysis and control*. Elsevier, Londres, p.892, 2010.
- GODFREY, T.; WEST, S. *Industrial Enzymology*. 2<sup>nd</sup> Edition, London, UK, MacMillan Press LTD, p.609, 1996.
- ANDREOTTI, D. Z.; TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. The use of dehydrogenases for regenerating  $\beta$ -nicotinamide adenine coenzymes through discontinuous and continuous processes. In: *European Biomass Conference and Exhibition from Research to Industry and Markets*, Lyon, 2010. Proceedings, p.1367-1370, 2010.
- TOMOTANI, E. J.; Das NEVES, L. C. M.; VITOLO, M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucose oxidase in membrane bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.121-124, p.149-162, 2005.
- Da SILVA, A. R.; TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Invertase, glucose oxidase and catalase for converting sucrose to fructose and gluconic acid through batch membrane continuous reactor. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011 (no prelo).
- De QUEIROZ, A. A. A.; VITOLO, M.; OLIVEIRA, R. C.; HIGA, O. Z. Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets. *Radiation Physical Chemistry*, v.47, n.6, p.873-880, 1996.
- Da SILVA, A. R. Conversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico usando reatores descontínuo e contínuo. 2010, São Paulo, SP. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, p.75, 2010.
- TARABOULSI-Jr, F. A.; VITOLO, M. Quantificação da água oxigenada em presença ou ausência de açúcares redutores usando o método de Somogyi-Nelson. *Analytica*, ano 8, n.47, p.86-93, 2010.
- BAO, J.; FURUMOTO, K.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate. *Biochemical Engineering Journal*, v.8, p.91-102, 2001.
- RABA, J.; MOTTOLA, H. A. Glucose oxidase as an analytical reagent. *Critical Review Analytical Chemistry*, v.25, n.1, p.1-42, 1995.
- FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier, London, 1990.
- Das NEVES, L. C. M. Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando *S.cerevisiae* W303-181. 2002, São Paulo, SP. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, p.284, 2002.
- ROSSI, F. G.; SILVA, D. P.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; TAQUEDA, M. E.; VITOLO, M.; PESSOA-Jr, A. Effect of cultivation conditions on glucose 6-phosphate dehydrogenase production by genetically modified *S.cerevisiae*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.26, n.1, p.1-9, 2009.
- OWUSU, R. K.; MAKZOOM, J. Heat inactivation of lyase from psychotrophic *P.fluorescens* (P.38): Activation parameters and enzyme stability at low or ultra-high temperatures. *Food Chemistry*, v.44, p.261-268, 1992.
- BERGMEYER, H. U. *Methods of enzymatic analysis*. 3<sup>rd</sup> Ed., Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, v.2, p.539, 1984.
- PETERSON, E. P.; SMITH, T. J. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure*, v.7, p.769-782, 1999.
- TOMOTANI, E. J.; ARRUDA, P. V.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A. Obtainment of partial purified xylose reductase from *C.guilliermondii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p.631-635, 2009.

TECNOLOGIA E INOVAÇÃO  
PARA SEUS NEGÓCIOS



17ª edição

 **FCE  
PHARMA**

EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA  
PARA A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

O espaço ideal para a geração de grandes e importantes negócios da indústria farmacêutica.

Uma visão de futuro: inovações em produtos, equipamentos e serviços em um único lugar.

Tecnologia, lançamentos e conteúdo indispensáveis para o setor. Um ponto de encontro de profissionais altamente qualificados.

Venha para o evento mais completo do setor na América Latina.

**29 A 31**

**MAIO DE 2012**

*Das 13h às 20h*

Transamerica Expo Center  
São Paulo - SP / Brasil

[www.FCEPHARMA.com.br](http://www.FCEPHARMA.com.br)

Evento Paralelo:

Parceria Exclusiva:

Revista Oficial:

Congresso:

Organização:

 **FCE COSMETIQUE**

 **SINDUSFARMA**  
UNIDADE DE REGISTRO DE PRODUTOS  
FARMACÊUTICOS DO BRASIL

**Pharmaceutical  
Technology**  
BRASIL

**Pharma  
Congress**

**NÜRNBERG / MESSE**