

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:  
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL ALERGÊNICO DA  
BIOMASSA DE *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* PRODUZIDA  
POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Eng. Christiane Pontes Saraiva  
Autora

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana  
Orientadora

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas-São Paulo  
Abril - 2001

200116142

UNIDADE CE  
 N.º CHAMADA: UNICAMP  
Sa 71e  
 V. \_\_\_\_\_ Ex. \_\_\_\_\_  
 TOMBO BC/ 45720  
 PROC. 16.892/01  
 C  D   
 PREC. R\$ 99,00  
 DATA 04/08/04  
 N.º CPD \_\_\_\_\_

CM00158415-2

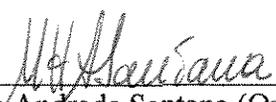
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

Sa71e Saraiva, Christiane Pontes  
 Extração de proteínas com potencial alergênico da  
 biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*  
 produzida por fermentação em estado sólido / Christiane  
 Pontes Saraiva. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadora: Maria Helena Andrade Santana.  
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
 Campinas, Faculdade de Engenharia Química

1. Lixiviação por percolação. 2. Fermentação. 3.  
 Proteínas. I. Santana, Maria Helena Andrade. II.  
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
 Engenharia Química. III. Título.

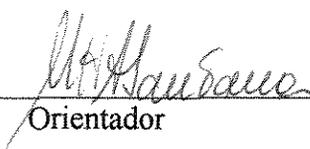
Dissertação de Mestrado defendida por Christiane Pontes Saraiva e aprovada em 27 de abril de 2001 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana (Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre (Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alvaro Alberto de Araujo (Titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



---

Orientador

Este trabalho é fruto do incentivo e amor que recebi de meus pais Raymundo e Licy, minhas irmãs Danielle e Lucianne e especialmente do meu esposo Rodinei, a quem tanto amo.

## Agradecimentos

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Andrade Santana pela orientação, amizade e incentivo..

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

As amigas Raquel e Helen, pela amizade e companheirismo.

Às colegas de Laboratório Salah, Elaine, Giuliana, Fernanda, Maria Helena, Paulo e Gilson.

Às amigos Rosileia, Guisherme, Daniel, Líbia, Elsimar, Adriana, Gláucia, Michelle, Alvaro, Tânia, Mauricio, pela ajuda e incentivo nas horas difíceis.

À Deus pela força e iluminação em minha vida.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
NOMENCLATURA .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1- INTRODUÇÃO .....	1
1.1- FUNGOS COMO ALÉRGENOS .....	1
1.2- EXTRATOS ALERGÊNICOS .....	2
1.3- EXTRATOS ALERGÊNICOS DE <i>DRECHSLERA (HELMINTHOSPORIUM) MONOCERAS</i> .....	3
1.4- CULTIVO DO <i>DRECHSLERA (HELMINTHOSPORIUM) MONOCERAS</i> .....	4
1.5- EXTRAÇÃO DE COMPONENTES CELULARES DA BIOMASSA PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO .....	5
1.6- JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	5
2- OBJETIVO.....	7
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
3.1- RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS – “DOWNSTREAM PROCESSING” .....	8
3.2- RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	9
3.2.1- <i>Extração por Fluido Supercrítico</i> .....	10
3.3- EFEITO DO PRODUTO NO PROCESSO DE RPB .....	11
3.3.1- <i>Produtos sem Necessidade de Processamento</i> .....	11
3.3.2- <i>Produtos que Necessitam de Processamento Simples</i> .....	11
3.3.3- <i>Produtos que Requerem Processamentos Extensivos</i> .....	11
3.4- SECAGEM DE PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO .....	12
3.5- LIXIVIAÇÃO DE PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO .....	13
3.5.1- <i>Fatores que Afetam a Eficiência da Lixiviação</i> .....	13
3.5.1.1- <i>Pré-tratamento do Sólido Fermentado</i> .....	13
3.5.1.2- <i>Seletividade do Solvente</i> .....	14
3.5.1.3- <i>Difusividade do Sólido no Solvente</i> .....	15
3.5.1.4- <i>Retenção do Solvente pelo Sólido</i> .....	15
3.5.1.5- <i>Mistura de Sólidos e Solventes</i> .....	16
3.5.1.6- <i>Relação sólido:solvente</i> .....	16
3.5.1.7- <i>Tempo de Contato Sólido Solvente</i> .....	16
3.5.1.8- <i>Efeito da Temperatura de Contato</i> .....	17
3.5.1.9- <i>Efeito do pH</i> .....	17
3.6- TÉCNICAS DE LIXIVIAÇÃO .....	17
3.6.1- <i>Percolação</i> .....	18
3.6.2- <i>Extrator com Fluxo Pulsado</i> .....	18
3.6.3- <i>Lixiviação em Contra Corrente</i> .....	18

3.6.4- <i>Taxa de Lixiviação Quando um Sólido é Dissolvido</i> .....	19
3.6.5- <i>Análise do Método dos Momentos</i> .....	20
4.6.5.1. Tempo de Residência e Dispersão Axial .....	21
3.7- PROCESSAMENTO DA RPB APÓS A LIXIVIAÇÃO .....	22
4- MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1- MICRORGANISMO .....	23
4.2- SUBSTRATO .....	24
4.3- FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	24
4.4- EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA BIOMASSA FÚNGICA.....	25
4.4.1- <i>Planejamento Experimental</i> .....	25
4.4.1.1- Planejamento Fatorial e “Screening Design” .....	26
4.4.1.1.1- Seleção das Variáveis Importantes do Processo .....	27
4.4.1.1.2- Determinação da Relação entre as Principais Variáveis e seus Melhores Níveis .....	29
4.5- IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NOS EXTRATOS.....	30
4.6- QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	31
4.7- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM LEITO FIXO.....	32
4.7.1- <i>Determinação do Tempo de Residência e Dispersão axial</i> .....	32
4.7.2- <i>Determinação do Coeficiente Global de Transferência de Massa (KLa)</i> .....	32
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1- PRODUÇÃO DA BIOMASSA DE <i>DRECHSLERA (HELMINTHOSPORIUM) MONOCERAS</i> POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	35
5.2- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA BIOMASSA FÚNGICA .....	36
5.2.1- <i>Extração em Batelada</i> .....	36
5.2.1.1- Seleção das Variáveis Importantes do Processo e seus Efeitos sobre a Concentração de Proteína Total .....	36
5.2.1.2- Determinação dos Melhores Níveis das Variáveis Operacionais do Processo de Extração.....	46
5.3- EXTRAÇÃO CONTÍNUA EM LEITO FIXO .....	55
5.3.1. <i>Tempo de Residência e Dispersão Axial</i> .....	55
5.3.2. <i>Coeficiente Global de Transferência de Massa Sólido-Líquido</i> .....	57
6- CONCLUSÕES .....	61
7- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	62
8- ANEXO.....	63
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Esquema da seqüência de operações do processo de RPB de produtos intra e extracelulares de processos de FES. ....	10
Figura 4.1: Fotografia da cultura do fungo <i>Drechslera (Helminthosporium) monoceras</i> após 14 dias de cultivo. (x400) .....	23
Figura 5.1. Fotografia do gel de eletroforese contendo as bandas características dos extratos brutos, obtidos por extração com Tris-HCl para os substratos bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo antes (imediatamente após a inoculação) e após a fermentação .....	36
Figura 5.2. Efeito das variáveis estudadas no Planejamento Plackett Burman para os extratos brutos obtidos do bagaço de cana-de-açúcar fermentado. Parâmetros: 1- Temperatura, 2- Relação sólido:solvente, 3- pH do meio, 4- Inibidor de protease e 5- Concentração de sais nos líquidos extratores. ....	44
Figura 5.3. Efeitos das variáveis estudadas no Planejamento Plackett Burman para os extratos Brutos obtidos do farelo de trigo fermentado. Parâmetros: 1- Temperatura, 2- Relação sólido:solvente, 3- pH do meio, 4- Inibidor de protease e 5- Concentração de sais nos líquidos extratores.....	44
Figura 5.4. Análise eletroforética das proteínas por SDS-PAGE. As faixas MM representam os marcadores de massa molecular (fosforilase b, 94KDa; albumina bovina, 67,0KDa; ovalbumina, 43,0KDa; anidrase carbônica, 30KDa; inibidor de tripsina, 20,1KDa; $\alpha$ -lacto-albumina, 14,4KDa). (a) As faixas T1 e T2 representam os extratos protéicos dos substratos com e sem inibidor de protease respectivamente. (b) A faixa BA representa o extrato protéico do bagaço de cana-de-açúcar sem inibidor de protease. ....	45
Figura 5.5: Superfícies de respostas para a concentração de proteína total do trigo em função da (a,b) temperatura e relação sólido:solvente (c,d) temperatura e pH (e,f) relação sólido:solvente e pH. ....	52
Figura 5.6: Superfícies de respostas para a concentração de proteína total do bagaço de cana-de-açúcar em função da (a,b) temperatura e relação sólido:solvente (c,d) temperatura e pH (e,f) relação sólido:solvente e pH. ....	53
Figura 5.7. Representação gráfica da concentração de BSA na saída da coluna versos o tempo em segundos. ....	57
Figura 5.8. Ajuste linear dos pontos, para obtenção da equação da reta e seu coeficiente angular $KL_a/1-\epsilon$ . ....	58
Figura 5.9: Valores de $C_A$ teórico ( $\blacklozenge$ ) e $C_A$ experimental ( $\blacksquare$ ) .....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Composição do meio de fermentação em estado sólido (Base de cálculo 40 g/L) .....	24
Tabela 4.2. Níveis das variáveis do planejamento não saturado .....	28
Tabela 4.3. Matriz do planejamento Plackett Burman para 12 ensaios.....	28
Tabela 4.4. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para o substrato farelo de trigo fermentado.....	29
Tabela 4.5. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para o substrato bagaço de cana de açúcar fermentado.....	29
Tabela 4.6. Matriz do planejamento fatorial composto central.....	30
Tabela 5.1. Produtividade (mg de proteína total por mg de sólido fermentado) dos substratos farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar fermentados .....	35
Tabela 5.2. Matriz com as respostas do planejamento Plackett Burman .....	37
Tabela 5.3. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do bagaço de cana de açúcar fermentado usando água como solução extratora.....	38
Tabela 5.4. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido de bagaço de cana de açúcar fermentado extraído com solução de NaCl.....	39
Tabela 5.5. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do bagaço de cana de açúcar fermentado extraído com solução de Tris-HCl.....	39
Tabela 5.6. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do bagaço de cana de açúcar fermentado extraído com solução de Coca.....	40
Tabela 5.7. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado extraído com água.....	41
Tabela 5.8. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado extraído com solução de NaCl.....	41
Tabela 5.9. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado extraído com solução de Tris-HCl.....	42
Tabela 5.10. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado extraído com solução de Coca.....	42
Tabela 5.11. Comparação dos efeitos das variáveis estudadas sobre a massa de proteína total nos extratos brutos.....	43
Tabela 5.12. Matriz com as respostas do planejamento completo.....	47

Tabela 5.13. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado utilizando água como líquido extrator. (L) coeficiente linear e (Q) coeficiente quadrático. ....	48
Tabela 5.14. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do bagaço de cana de açúcar fermentado utilizando água como líquido extrator. (L) coeficiente linear e (Q) coeficiente quadrático.....	48
Tabela 5.15. Análise de variância das respostas massa de proteína total para os extratos brutos obtidos do farelo de trigo fermentado usando água como líquido extrator. ....	49
Tabela 5.16. Análise de variância das respostas massa de proteína total para os extratos brutos obtidos do bagaço de cana de açúcar fermentado usando água como líquido extrator. ....	50
Tabela 5.17. Resultados da concentração de proteína (BSA) para o cálculo do tempo de retenção e a dispersão axial do solvente na coluna. ....	55
Tabela 5.18: Concentração de proteína total (CA e CA*) na solução extraída com água do farelo de trigo fermentado .....	58
Tabela 5.19: Concentração teórica de proteína no solvente.....	59

## NOMENCLATURA

FES: Fermentação em Estado Sólido

RPB: Recuperação e Purificação de Bioprodutos

ScFE: Extração do Fluido Supercrítico

FmS: Fermentação Submersa

$N_A$ : Taxa de transferência de soluto Kgmol dissolvido na solução por segundo

$K_{La}$ : Coeficiente de transferência de massa sólido:solvente ( $s^{-1}$ )

$C_{AS}$ : Quantidade total de proteína extraída do sólido ( $Kgmol/m^3$ )

$C_A$ : Concentração de proteína na solução em um tempo  $t$  ( $Kgmol/m^3$ )

$a$  = Área específica total de troca de massa no leito

$A_p$  = Área da partícula

$V_p$  = Volume da partícula

$V_p$  = Volume da partícula

$\varepsilon$  = Porosidade do leito

$\delta$  = Variância

$H$  = Altura do leito

$v_{t0}$  = Velocidade superficial

## RESUMO

Atualmente, várias pesquisas confirmam o envolvimento de fungos nos processos alérgicos. As técnicas de diagnóstico e imunoterapia específica de alergia causada por microrganismos necessitam de extratos alergênicos eficazes e bem caracterizados. Os extratos alergênicos são substâncias de natureza protéica, extraídas da biomassa de microrganismos. Dentre os fungos causadores de alergias destacam-se os da espécie *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. O meio sólido representa o habitat natural dessa espécie e, portanto, resíduos agrícolas como bagaço de cana de açúcar e farelos de cereais constituem excelentes meios para o cultivo em estado sólido (FES) desses microrganismos. Atualmente há poucos estudos, especialmente de engenharia, sobre a extração de componentes celulares da biomassa fúngica obtida por fermentação em estado sólido, principalmente quando os produtos são de natureza protéica.

Dentro deste contexto, este trabalho tem como objetivo estudar o processo de extração de proteínas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* produzida por FES usando como substratos farelo de trigo ou bagaço de cana de açúcar. O estudo envolveu a determinação estatística da relação entre as variáveis operacionais mais significativas do processo e a massa de proteína total extraída, bem como a identificação de regiões operacionais que conduzem à maximização da quantidade de proteína total nos extratos. A extração contínua em coluna de leito fixo permitiu a determinação do coeficiente global de transferência de massa sólido-líquido,  $K_{La}$ , importante para o aumento de escala do processo.

Os resultados experimentais mostraram que para a extração das proteínas da biomassa produzida com ambos os substratos, as variáveis mais importantes do processo são a temperatura, pH e relação sólido:solvente. O  $K_{La}$  para o sistema foi  $0,0388 \text{ s}^{-1}$ . As proteínas produzidas durante a fermentação e presentes nos extratos apresentaram massas moleculares nas faixas de 14,4; 30,0; 43,0; 67,0 e 94,0 KDa. Esses extratos podem ser considerados potencialmente alergênicos por conterem proteínas de massas moleculares idênticas àquelas obtidas por fermentação submersa com a mesma linhagem do microrganismo em questão, cuja alergenicidade já foi comprovada.

## ABSTRACT

Nowadays several researches confirm the role of molds on allergic processes. The protocols used for specific diagnosis and immunotherapy on allergy caused by microorganisms use efficient and well characterized allergenic extracts. These extracts are mixtures of compounds including proteic matter extracted from the biomass of microorganisms. Among the molds that cause allergy, *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* was identified as one of the more allergenic species. The solid environment represents the natural habitat of this species and therefore agriculture residues as sugar cane bagasses and cereal flour are excellent substrates for the growth of these microorganisms in solid medium. The literature about the extraction of proteic components from the biomass of molds cultivated in solid medium is not extensive, especially on engineering approach.

In this context, the objective of this work is to study the extraction process of proteins from the biomass of *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* produced by solid fermentation carried out with wheat flour or sugar cane bagasses as substrates. The approach of this study is the statistic determination of a relationship among the operational variables more significant on the extraction process and the total mass of extracted proteins. This relationship can be used for estimative of operational levels to maximize the total amount of extracted proteins. In addition, continuous extraction in a fixed bed column was carried out to collect experimental data for determination of the global liquid-solid mass transfer coefficient,  $K_{L,a}$ , an important parameter for scaling up of the process.

The experimental results showed that for both substrates, the more significant variables for the extraction process of proteins from the biomass produced by solid fermentation are temperature, pH and solid:liquid ratio. The  $K_{L,a}$  for this system is  $0,03888 \text{ s}^{-1}$ . The molecular weights of the extracted proteins were in the range of 14,4; 30,0; 43,0; 67,0 e 94,0 KDa. These extracts can be considered as potentially allergenic because contain proteins with the same range of molecular weight of that ones extracted from the biomass of this strain cultivated by submerge fermentation, to which allergenic effects were proved.

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- FUNGOS COMO ALÉRGENOS

As doenças alérgicas podem ser consideradas como problema de saúde pública mundial. Dentre suas manifestações clínicas destacam-se a asma brônquica e a rinite alérgica. Nos Estados Unidos da América, juntamente com o Brasil, estima-se que aproximadamente 35 milhões de pessoas possuem algum tipo de problema alérgico (Basomba, 1982).

Toda substância natural ou artificial, capaz de provocar reações de hipersensibilidade, pode ser considerada como alérgeno. Os alérgenos podem ser classificados de acordo com o local onde se manifesta a reação alérgica, tais como alérgenos epidérmicos, respiratórios e outros, ou quanto à sua origem, como aqueles oriundos de fungos, pólenes, ácaros, insetos, helmintos, protozoários, bactérias, medicamentos e alimentos. Todo esse conjunto de substâncias alergênicas tem sido objeto de investigação, sendo que a maioria dos pesquisadores dedica-se preferencialmente aos alérgenos inalantes e àqueles originários de insetos dando ênfase ao estudo e aplicação na imunoterapia (Basomba, 1982).

Desde 1873 tem-se o conhecimento de que a inalação de esporos de fungos, veiculados pelo ar atmosférico, desempenha um papel importante como elementos alergizantes das vias respiratórias ocasionando principalmente asma brônquica e rinite. Porém, somente a partir de 1930 é que houve avanços no sentido de conhecimento mais amplo do problema com os estudos de Feinberg & Little (1935), Prince (1944), Van Der Werf (1958). Mas foi a partir de 1966, com o descobrimento da imunoglobulina E, IgE, como responsável pelos fenômenos atópicos, que o estudo dos processos alérgicos de maneira geral, tiveram grandes avanços (Basomba, 1982). Com relação aos fungos, tem-se hoje na literatura inúmeras pesquisas que evidenciam esse vínculo. Wortman, 1982, assinalou a existência de 340 espécies de fungos, isolados do ar atmosférico, descritas como alergizantes das vias respiratórias, sendo os seguintes os gêneros mais comuns em nível mundial: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Segundo Yunginger (1988), esporos e fragmentos de micélio de fungos estão entre os mais ubíquos aeroalérgenos do mundo.

Dentre os tratamentos propostos para as doenças alérgicas, a imunoterapia ou dessensibilização específica vem sendo objeto de intensos estudos ao longo dos anos. A proposta de tolerância específica ao alérgeno é interessante, mas esbarra em dificuldades tais como: a qualidade dos extratos ou dos antígenos purificados, padronização inadequada, via de administração, além da escolha do melhor veículo para os imunoterápicos. Atualmente, várias pesquisas confirmam o envolvimento de fungos nos processos alérgicos e tentam aperfeiçoar as técnicas de diagnóstico e imunoterapia específica de alergia causada por estes microrganismos (Menezes, 1992). Seja qual for a técnica usada tanto para o diagnóstico como para a imunoterapia, a disponibilidade de extratos alergênicos eficazes e bem caracterizados são de fundamental importância.

## 1.2- EXTRATOS ALERGÊNICOS

Os extratos alergênicos são substâncias brutas extraídas da biomassa dos microrganismos. Esses extratos constituem-se de misturas heterogêneas de diferentes proteínas, carboidratos, lipídios e outras substâncias não identificadas, dentre as quais as proteínas são em geral de maior importância (Basomba, 1982).

Os extratos alergênicos utilizados para fins de diagnóstico são preparados atualmente a partir de micélio vegetativo e reprodutivo do fungo. Vários estudos com fungos demonstraram que não somente os esporos, mas também o micélio vegetativo é alergênico (Yunginger, 1988; Gambale *et al.* 1988; Croce *et al.* 1990).

Nos Estados Unidos há em torno de 200 extratos fúngicos produzidos por várias indústrias e disponíveis comercialmente em vários países, porém a sua padronização não é uniforme (Horner *et al.*, 1995). Por esse motivo, a utilização desses extratos em diagnóstico definitivo apresenta restrições e tem motivado os pesquisadores a tentativas de uma melhor caracterização e padronização. Além disso, ressalta-se que na maioria das vezes, os extratos disponíveis comercialmente para diagnóstico ou imunoterapia não têm importância em determinadas regiões simplesmente pela ausência do fungo ou mesmo pela sua baixa frequência no ambiente (Menezes *et al.* 1995).

Baseado nessas premissas, em 1973 o Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e o Serviço de Alergia do Hospital das Clínicas da USP iniciaram uma série de trabalhos que permitiram uma visualização da microbiota fúngica anemófila mais freqüente, sua periodicidade diária, variação sazonal e influência de fatores abióticos em sua freqüência. Esses estudos foram realizados com amostras colhidas da grande São Paulo (Gambale, 1976; Gambale *et al.*, 1977; Gambale *et al.*, 1981; Gambale *et al.*, 1983).

Em uma segunda fase dos estudos do mesmo grupo, foi demonstrada a necessidade da utilização de grande número de alérgenos fúngicos na verificação da sensibilização por meio de provas cutâneas, e a identificação dos fungos alergênicos mais importantes em nosso meio (Mohovic *et al.*, 1988). Esses estudos também demonstraram a importância do grupo de fungos não esporulantes em processos asmáticos (Gambale *et al.* 1988, Croce *et al.*, 1990), sendo proposta a utilização de complexo alergênico para diminuir o número de testes intradérmicos de triagem e aumentar a sensibilidade dos mesmos (Mohovic *et al.*, 1988). Os últimos autores também demonstraram que os extratos alergênicos que apresentavam maior positividade cutânea em pacientes alérgicos da cidade de São Paulo foram os de *Candida*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Phialophora* e *Curvularia*, gêneros que não correspondem àqueles isolados com maior freqüência na atmosfera dessa região. Verificaram também que o extrato de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* apresentou a maior positividade em relação à intensidade de reação, fato que não é citado em nível mundial.

Esses trabalhos iniciais permitiram a obtenção de alérgenos de 42 fungos, que apesar de produzidos em pequenas quantidades foram utilizados em vários serviços de alergia no diagnóstico e pesquisa de processos alérgicos ocasionados por fungos.

### **1.3- EXTRATOS ALERGÊNICOS DE *Drechslera (Helminthosporium) monoceras***

Numa terceira fase da pesquisa, Menezes *et al.*, 1995, avaliaram a composição bioquímica, antigenicidade e alergenicidade de extratos de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtidos por extração com Tris-HCl de várias fases de crescimento do fungo em fermentação submersa, usando meio Czapeck modificado. Na continuidade dos trabalhos do mesmo autor, foi estudado o fracionamento e a caracterização dos extratos, verificando-se que

nas condições de cultivo usadas, aquele obtido de 28 dias de crescimento era o que continha as frações alergênicas, posteriormente identificadas como duas proteínas de 60 e 14,4 kDa e uma glicoproteína de aproximadamente 36 kDa.

#### 1.4- CULTIVO DO *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*

*Drechslera (Helminthosporium) spp.* é um fungo filamentosos, que vive como saprófita no solo e está associado à patogenicidade em cereais como aveia, milho e gramíneas tais como grama, cana de açúcar e outros. Em geral esses fungos podem ser cultivados tanto em meio líquido como em meio sólido. Segundo Pandey, 1992, dentre os fungos filamentosos, as três classes que têm sido mais usadas em fermentações em meio sólido são: *Phycomycetes (Mucor e Rhizopus)*, *Ascomycetes (Aspergillus, Helminthosporium e Penicillium)* e *Basidiomycetes (Polysporus)*. O crescimento natural da classe *Helminthosporium* como patógeno de cereais e cana de açúcar induz à possibilidade de utilização desses materiais como substrato para o cultivo desses fungos em meio sólido.

Estudos do cultivo de *Helminthosporium* em meios sólidos constituídos de bagaço de cana de açúcar, farelo de milho e farelo de trigo, com a mesma linhagem usada nos estudos de Menezes *et al.*, 1995, foram realizados recentemente pelo nosso grupo, no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (Hasan *et al.*, 2000). Os resultados mostraram que o fungo cresceu bem em todos os substratos, chegando a produzir cerca de 15 mg de proteína total/g de substrato seco, e os extratos produzidos contiveram frações protéicas com massas moleculares idênticas àquelas obtidas anteriormente por cultivo submerso, de acordo com identificação feita através de eletroforese SDS-PAGE.

Esses resultados mostram a viabilidade do cultivo dessa linhagem de *Helminthosporium* em meio sólido e obtenção das proteínas com potencial alergênico além de outras que podem também ser importantes.

## 1.5- EXTRAÇÃO DE COMPONENTES CELULARES DA BIOMASSA PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

Nos processos de fermentação em estado sólido (FES) a maioria dos produtos obtidos é geralmente usada associada ao substrato. Embora a extração de produtos a partir de sólidos quer com líquidos ou gases seja bem descrita na literatura, no caso particular de produtos intracelulares da FES os processos de extração não são extensamente estudados, principalmente em termos de engenharia. No caso particular de componentes celulares tais como proteínas ou enzimas, a necessidade de estudos torna-se mais premente, devido às condições especiais requeridas para o processo, tendo em vista a natureza química dessas moléculas.

## 1.6- JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Este trabalho constitui-se no estudo do processo de extração por meio de líquidos, de componentes da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* produzida por fermentação em estado sólido, usando como substratos farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar, e a caracterização das proteínas do extrato obtido.

O estudo do processo de extração foi projetado em três etapas, sendo a primeira a seleção das variáveis importantes no processo de extração através de planejamento estatístico. Na segunda etapa foi determinada uma relação entre essas variáveis e a massa de proteína total, bem como os níveis das variáveis que conduzem à maximização da quantidade de proteínas no extrato bruto. Em uma terceira etapa foi feito um estudo da extração em coluna de leito fixo, onde se determinou o coeficiente global de transferência de massa sólido-líquido,  $K_L a$ . A caracterização dos extratos obtidos por eletroforese SDS-PAGE permitiu a identificação da massa molecular das proteínas.

Dentre os vários fatores que justificam o desenvolvimento deste trabalho destacam-se a escassez de estudos, especialmente de engenharia, sobre a extração de componentes celulares da biomassa fúngica produzida por fermentação em estado sólido, e o potencial

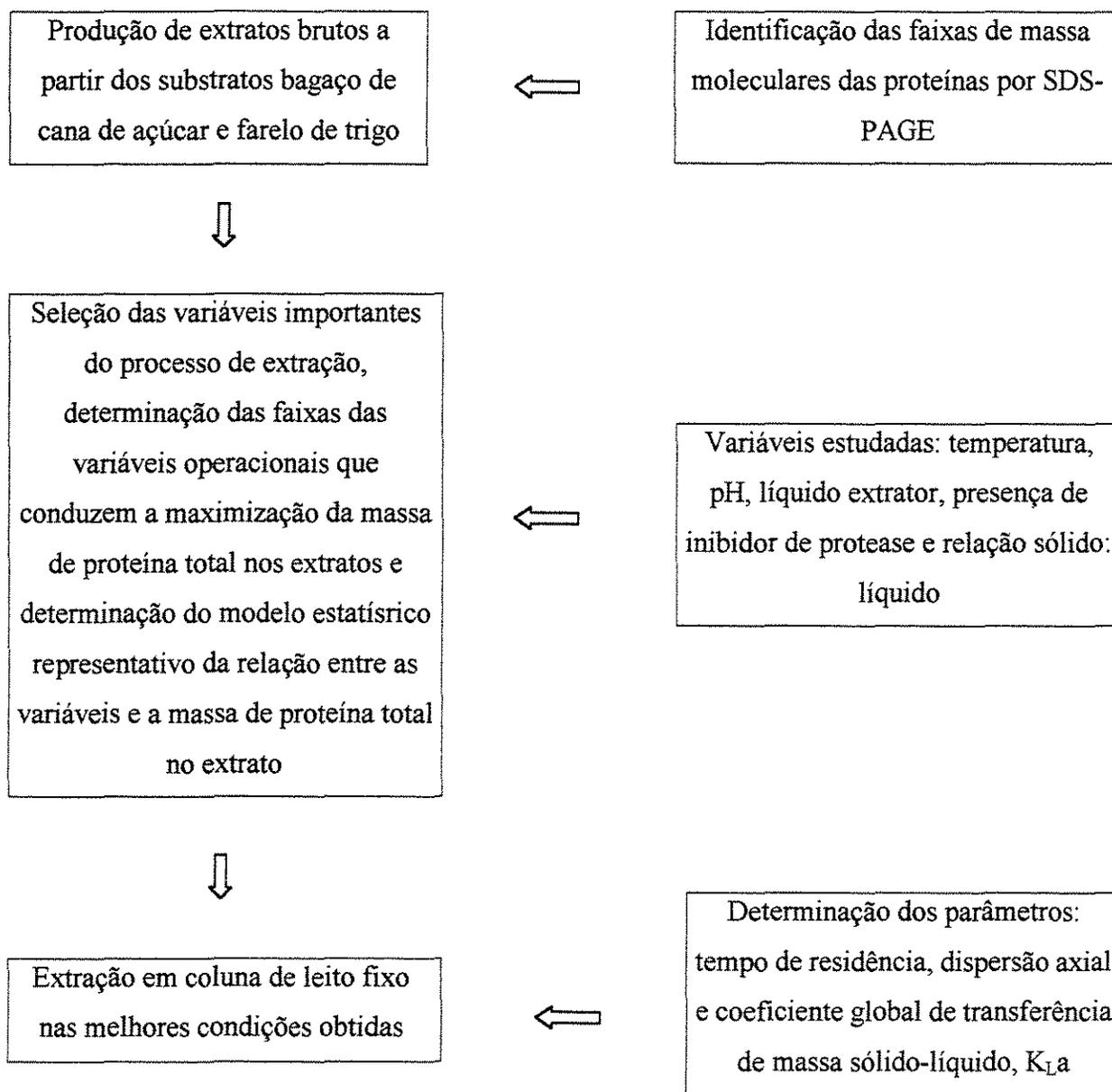
alergênico das proteínas extraídas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* cultivada em meio sólido.

A relevância do assunto está na contribuição para a produção de extratos com potencial alergênico, obtidos de biomassa fúngica produzida por fermentação em meio sólido a partir de produtos agrícolas abundantes no nosso país.

## 2- OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo o estudo do processo de extração de componentes celulares da biomassa fúngica de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*, produzida por fermentação em estado sólido usando farelo de trigo ou bagaço de cana de açúcar como substrato para a obtenção de extratos brutos com potencial alergênico.

O assunto foi abordado de acordo com o seguinte esquema:



### 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1- RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS – “DOWNSTREAM PROCESSING”

A recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) na biotecnologia têm o objetivo de desenvolver operações unitárias que levem a um produto final com purificação satisfatória, forma aceitável para o mercado, seja o mais estável possível e tenha uma longa vida de prateleira (Aunstrup, 1979).

De uma maneira geral, a RPB de processos de fermentação submersa para recuperação de produtos extracelulares envolve as seguintes operações unitárias:

1. Separação de células ou sólidos suspensos;
2. Isolamento do produto;
3. Purificação do produto;
4. Formulação comercial do produto;
5. Controle do efluente.

Para a extração de produtos intracelulares é requerida uma etapa adicional de rompimento das células.

Segundo Doelle *et. al.* (1992) a economia do processo de RPB é determinada pelo capital investido em equipamentos e maquinarias e pelo custo dos materiais usados durante o processo. Estes são determinados pelo tipo do produto. Outros fatores que influenciam na economia são:

1. A eficiência individual das operações unitárias;
2. A quantidade de perdas em cada etapa;
3. O grau de destruição ou degradação do produto durante o processo;
4. O estado físico do produto ao término de cada etapa de processo;
5. O custo do tratamento dos resíduos, já que estes não podem ser deixados de lado.

Coletivamente estes fatores determinam o custo da produção do metabólito microbiano e também a economia global do processo. A contribuição do processo de RPB no custo global da produção varia com o tipo do produto. A alta purificação requerida, para produtos tais como antibióticos e outros fármacos, no processo de RPB contribui com mais da metade do custo global da produção.

O tempo da retirada do material fermentado do meio de cultura, a força iônica do meio de cultura, o suprimento de aditivos e o grau de pigmentação ou produção de metabólitos durante a cultura, têm grande efeito na economia das operações do processo de RPB (Doelle *et. al.*, 1992).

Embora muitos dos aspectos discutidos acima sejam bem estabelecidos para a fermentação submersa (FmS), há poucos exemplos para o processo de fermentação em estado sólido. Porém, alguns trabalhos têm mostrado que altas concentrações de produtos e pequenos volumes de efluentes no processo de FES podem levar a custos menores no processo de RPB, quando comparado com a FmS (Lonsane *et. al.*, 1985; Kumar e Lonsane, 1989).

### **3.2- RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

A pequena quantidade de água presente na fermentação em estado sólido traz dois benefícios para a RPB, como produtos com altas concentrações, o que reduz os custos do processo sendo esta característica muito atrativa comercialmente e a redução do volume de efluentes, que reduz os custos do tratamento de água (Ramesh & Lonsane, 1987a).

Além das operações unitárias citadas no parágrafo 3.1, a RPB para a fermentação em estado sólido geralmente envolve uma operação adicional, que é a lixiviação do produto associado ao sólido. Uma vez que o produto é recuperado em solvente adequado, o extrato é similar ao caldo líquido produzido no processo de fermentação submersa.

A Figura 3.1 mostra o esquema convencionalmente usado para recuperação do produto de processos de FES



Figura 3.1. Esquema da seqüência de operações do processo de RPB de produtos intra e extracelulares de processos de FES.

O número e as etapas requeridas no processo de RPB depende do tipo de produto e das características físicas do sólido fermentado. Em alguns casos o processo de RPB representa mais da metade da planta de produção em termos de espaço, capital, bem como custo de operação.

### 3.2.1- Extração por Fluido Supercrítico

Para temperaturas e pressões próximas ao ponto crítico, os solventes aumentam seu poder de extração, o que é explorado na extração do fluido supercrítico (ScFE). Ele oferece uma alternativa poderosa e eficiente para a destilação convencional e processos de extração com o solvente e simplifica os passos de separação do RPB. Então os componentes desejáveis e não desejáveis podem ser removidos do meio de reação por volatilização ou precipitação de uma fase do fluido supercrítico (Doelle *et. al.*, 1992).

A técnica de ScFE tem sido empregada comercialmente na indústria química e um grande número de aplicações potenciais ocorre nas várias fases do desenvolvimento. Equipamentos satisfatórios estão disponíveis comercialmente, entretanto, ScFE envolve alto

capital e custos de operação e então algumas aplicações desta no processo de FES será restrito a produtos de alto valor (Doelle *et. al.*, 1992).

### **3.3- EFEITO DO PRODUTO NO PROCESSO DE RPB**

A extensão e o tipo de processo de RPB varia significativamente com a natureza e a qualidade do produto, a qual é influenciada pelos requerimentos do mercado. Portanto a estratégia do processo de RPB deve atender a estas necessidades (Doelle *et. al.*, 1992).

#### **3.3.1- Produtos sem Necessidade de Processamento**

Alguns produtos da FES não necessitam do processo de RPB. Estes produtos são retirados no final da fermentação e diretamente usados e consumidos na indústria. As sementes de Koji são bons exemplos – elas são produzidas através de técnicas de FES em grande quantidade nos países Asiáticos como fonte de inóculo para várias fermentações. Outros produtos dessa categoria são os resíduos agro-industriais, enzimas e alguns alimentos fermentados (Doelle *et. al.*, 1992).

#### **3.3.2- Produtos que Necessitam de Processamento Simples**

O processamento simples na RPB envolve secagem e/ou lixiviação do sólido fermentado. O esquema do processo tem poucas etapas quanto possíveis e alcança em pouco tempo um produto de qualidade comercial. Por exemplo, se a semente de Koji não é utilizada imediatamente após a sua produção ela pode ser seca sob condições controladas e estocadas para uso posterior (Cannel e Moo-Yung, 1980*a.b*).

A aplicação da secagem não é usualmente viável quando os produtos provêm de fermentação submersa, devido à diluição dos caldos de fermentação, os quais contêm metabólitos ou células na faixa de 1 – 3 % ou 0,002 – 12% em casos extremos.

#### **3.3.3- Produtos que Requerem Processamentos Extensivos**

Poucos produtos do processo de FES comercialmente usados requerem um extensivo processo de RPB, determinado pelo uso do produto final e sua aplicação. Isto pode ser

ilustrado com o ácido cítrico, o qual é comercialmente usado em diferentes graus de purificação. Para suprir esta demanda comercial, o ácido cítrico produzido pelo processo de FES tem sido lixiviado do sólido fermentado e purificado.

Outro produto que requer extenso processo de RPB é a aflotoxina. Devido ao seu uso em pesquisas e estudos toxicológicos, é essencial que seja altamente puro. O ácido giberélico, hormônio de crescimento vegetal, tem sido recentemente produzido em FES (Kumar e Lonsane, 1987a) e requer alta pureza. Além disso, este ácido deve ser livre de substâncias as quais são tóxicas ou inibidoras para as plantas (Kumar e Lonsane, 1989).

As proteínas e enzimas também se enquadram nas classes de produtos anteriormente citadas, dependendo da sua aplicação. No caso de produtos que necessitam de tratamentos extensivos para maior purificação, as proteínas podem ser precipitadas do extrato bruto obtido por lixiviação. O precipitado é então separado, podendo ser seco, embalado e vendido na forma de pó. Alternativamente o precipitado pode ser dissolvido em uma quantidade limitada de água para se obter um líquido concentrado.

### **3.4- SECAGEM DE PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO**

Muitos produtos são simplesmente secos antes de serem comercializados, a secagem é uma importante operação unitária no processo de RPB. Porém, é dada pouca atenção à secagem de produtos da FES. Parâmetros importantes incluem o projeto de equipamentos, a temperatura do ar, umidade e taxa de fluxo, a área da superfície exposta do substrato, a natureza física e o conteúdo de umidade do sólido (Doelle *et. al.*, 1992). Segundo este autor a temperatura de secagem é especialmente importante para produtos instáveis na presença de calor. Temperaturas de até 50 ou as vezes de 60°C tem sido usadas para muitas preparações enzimáticas. Alguns processos são melhores conduzidos a baixas temperaturas tal como a temperatura ambiente. O conteúdo de umidade do sólido seco é determinado pelo armazenamento e pelas exigências de estabilidade. Valores de 8 até 15% de umidade são comuns. O farelo de trigo fermentado seco à 12 - 15% pode ser estocado por vários meses sem considerável perda em suas características. Secagem excessiva desperdiça energia e deve conduzir à uma degradação desnecessária do produto.

### 3.5- LIXIVIAÇÃO DE PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

Segundo Treybal (1981) a lixiviação é uma importante operação unitária em vários processos e consiste na separação do soluto de um sólido na forma de extrato bruto usando um solvente apropriado. Muitas substâncias orgânicas, inorgânicas e biológicas ocorrem em mistura no interior de sólidos. Para separar um soluto desejado ou remover um componente indesejado da fase sólida, esse é colocado em contato com a fase líquida, de modo a permitir a difusão do soluto para a fase líquida produzindo a separação do componente. Esse processo é chamado de lixiviação sólido-líquido ou simplesmente lixiviação. O termo extração também é usado para descrever essa operação unitária. Na lixiviação, quando um componente indesejado é removido de um sólido com água, o processo é chamado de lavagem.

Nas indústrias de processamento de alimentos, produtos biológicos e farmacêuticos são separados da sua estrutura natural através da lixiviação sólido-líquido. A distribuição do produto no sólido é importante. Produtos extracelulares estão presentes na forma solúvel no filme fino da água presente na superfície das partículas do substrato sólido. Em alguns casos o produto pode estar presente no interior do sólido, quer seja por serem intracelulares ou por supersaturação da água da superfície das partículas. É essencial para a lixiviação retirar a maior quantidade possível de produto do sólido, pois isto determina a economia do processo de FES. A seleção da técnica mais adequada de lixiviação e de suas condições ótimas é crítica (Doelle *et. al.*, 1992).

Segundo Kumar e Lonsane (1987c) o solvente utilizado na lixiviação é retido até certo ponto através de sorção do sólido. É desejável que a concentração do soluto no solvente retido seja a menor possível.

#### 3.5.1- Fatores que Afetam a Eficiência da Lixiviação

Diferentes fatores influenciam significativamente no processo de lixiviação e conseqüentemente na sua eficiência.

##### 3.5.1.1- Pré-tratamento do Sólido Fermentado

A estrutura do sólido e suas interações com substâncias difundidas influenciam o padrão e a taxa de difusão (Treybal, 1981). O pré-tratamento ou o pré-processamento do

sólido resulta em propriedades físicas desejadas, por isso são extensamente usados pela indústria de alimentos e química para melhorar a eficiência da lixiviação. Este fenômeno pode também ser aplicado a lixiviação do produto do sólido fermentado seco ou úmido obtido no processo de FES.

Os procedimentos de pré-processamento que podem ser aplicados no sólido fermentado incluem o esmagamento e a moagem, que aumenta a difusão durante a lixiviação. Secar o sólido antes da lixiviação pode conduzir a um extrato mais concentrado. O pré-processamento do sólido fermentado úmido tem sido conduzido para eliminar as células microbianas e os esporos presentes no produto (Doelle *et. al.*, 1992).

### 3.5.1.2- Seletividade do Solvente

Produtos tais como enzimas, ácidos orgânicos, micotoxinas e etanol são extracelulares em natureza e então podem ser lixiviador do sólido fermentado pelo uso de solventes apropriados. Um solvente ideal deve ser capaz de lixiviar o produto seletivamente e completamente a temperatura ambiente com o mínimo tempo de contato e preferencialmente no pH do sólido fermentado seco ou úmido. Além disso, o solvente usado deve render um extrato com poucas impurezas químicas (Ramesh & Lonsane, 1990). A seleção do solvente no processo de lixiviação é governada pelos seguintes fatores:

1. A natureza e característica de solubilização do produto;
2. A difusividade do solvente através do sólido;
3. Presença de compostos interferentes no substrato sólido;
4. A estabilidade do produto no solvente;
5. A perda ou alteração nas propriedades desejável do produto devido ao solvente;
6. A simplicidade como também a facilidade no processo de RPB do produto.

A maioria das informações sobre o tipo de solvente usado e a sua eficiência é limitada à produção de enzimas solúveis em água no processo de FES. Solventes tais como solução de glicerina e salina diluída, soluções tampão de diferentes tipos e forças iônicas, solução de etanol diluído, água saturada de tolueno, água destilada, têm sido consideradas como solventes de lixiviação para enzimas de sólidos fermentados. Vários autores compararam a eficiência da lixiviação de diferentes solventes tal como tampão fosfato 0,01M (pH 7), água destilada e

solução de NaCl 1% ou glicerol para a recuperação de  $\alpha$ -amilase bacteriana do farelo de trigo fermentado seco. Para um tempo de contato de 5 min a 28°C, a eficiência da lixiviação foi de aproximadamente 89,6% (para NaCl 1%) e 111,2% (para 1% de glicerol), quando comparada com a da água (Doelle *et. al.*, 1992).

Outros solventes usados incluem uma mistura de clorofôrmio e água para lixiviar a aflatoxina do milho fermentado, água destilada para lixiviar a tetraciclina do resíduo de batata doce fermentada, acetato de etila ou 5 – 10% de solução aquosa de etanol para lixiviar o ácido giberélico do farelo de trigo fermentado seco (Kumar e Lonsane, 1987c.). No último caso, uma solução aquosa de 10% de etanol foi o melhor agente e lixiviou 5% a mais do ácido giberélico em relação de 1:5 de sólido e solvente comparado a uma solução aquosa de acetato em relação de 1:5 ou etilacetato em relação de 1:25. A eficiência de extração com etanol foi 96,8% (Kumar e Lonsane, 1987c.).

#### **3.5.1.3- Difusividade do Sólido no Solvente**

A difusão é relativamente lenta na fase sólida quando comparada aos sistemas líquidos e gasosos. A taxa de difusão é influenciada predominantemente pelos gradientes de concentração, embora a temperatura seja também importante (Treybal, 1981).

Os sólidos usados em FES têm estrutura interna complexa, na qual a tortuosidade e a porosidade influenciam fortemente a difusão interna, que é a etapa limitante do processo. Apesar da importância do fenômeno da difusão no processo de lixiviação, a literatura ainda é muito escassa em dados experimentais que permitam a elucidação dos seus efeitos (Doelle *et. al.*, 1992).

#### **3.5.1.4- Retenção do Solvente pelo Sólido**

A habilidade das partículas do substrato sólido de reter água é altamente desejável para a etapa de fermentação, pois a água absorvida é a única disponível para o microrganismo. De fato os tratamentos físicos e químicos são aplicados para aumentar a porosidade e a capacidade dos substratos para retenção de água. Entretanto, a alta capacidade de retenção de água causa problemas na etapa de lixiviação do produto. Durante a lixiviação, os sólidos secos retêm uma porção de solvente aquoso igual à sua capacidade de retenção de água. Este solvente retido contém solutos a uma concentração igual ao do extrato retirado na etapa de

lixiviação, sendo altamente impraticável e caro remover completamente o solvente retido. Então, os sólidos provenientes da lixiviação sempre conterão uma quantidade significativa de solvente e sólidos dissolvidos associados (Treybal, 1981; Kumar e Lonsane, 1987c.).

### **3.5.1.5- Mistura de Sólidos e Solventes**

A agitação durante a lixiviação assegura um bom contato do substrato com o solvente aumentando assim a eficiência do processo. Por exemplo, um sistema de lixiviação agitado para recuperar a amilglicosidase do farelo de trigo fermentado seco recupera 8,5% a mais de enzima que um sistema estático. Em escala de laboratório uma boa qualidade de agitação pode ser obtida em agitador recíproco ou com agitação mecânica (Doelle *et. al.*, 1992).

### **3.5.1.6. Relação sólido:solvente**

A relação do solvente com o sólido é de grande importância no processo de lixiviação, cuja eficiência aumenta quando esta relação é elevada. Um aumento na relação do solvente:sólido de 2:1 para 9:1 melhorou a eficiência da lixiviação da  $\alpha$ -amilase de 41% a 100%. Segundo Kumar e Lonsane (1987c) a eficiência de lixiviação para recuperação do ácido giberélico aumentou até uma relação de 5:1 solvente:sólido, entretanto permaneceu constante com aumento adicional na relação.

Altas relações sólido:solvente também induzem a diluição do soluto no extrato final. O aumento na eficiência de lixiviação conseguida com a alta relação deve ser equilibrada contra o esforço extra requerido para a concentração do extrato diluído. Em alguns casos pode não ser possível alcançar um balanço econômico satisfatório (Doelle *et. al.*, 1992).

As informações disponíveis das relações usadas no processo de FES são limitadas à lixiviação de enzimas, micotoxinas, tetraciclina e ácido giberélico. As relações geralmente usadas na lixiviação de enzimas são na faixa de 1:1 à 10:1, para extração do ácido giberélico 8:1, 10:1 e 25:1, (Kumar e Lonsane, 1987c.), enquanto que para a tetraciclina e micotoxinas foram de 6,25:1 e 5:1 (Doelle *et. al.*, 1992).

### **3.5.1.7- Tempo de Contato Sólido Solvente**

Uma melhor lixiviação pode ser alcançada se assegurado um tempo de contato suficiente entre o solvente e o sólido. O tempo de contato ótimo para um processo eficiente de

lixiviação é determinado por muitos fatores tal como a afinidade do solvente pelo soluto, distribuição do soluto na matriz sólida, fatores físicos prevalecendo no sistema de lixiviação e a presença de alguns compostos com atividade de superfície no sólido (Treybal, 1981). Maiores tempos de contato requerem maiores equipamentos para uma mesma quantidade de solvente alimentada, o que deve ser considerado na economia do processo (Doelle *et. al.*, 1992).

#### **3.5.1.8- Efeito da Temperatura de Contato**

A temperatura de contato é de grande importância para a lixiviação, pois altas temperaturas aumentam a taxa de difusão do soluto, mas podem também desativar produtos tais como enzimas e proteínas.

A temperatura de contato que têm sido usadas para a lixiviação de enzimas varia das mais baixas até 30°C. Para a  $\alpha$ -amilase bacteriana a temperatura de 28-30°C favoreceu uma lixiviação mais eficiente do que as temperaturas de 4-5°C, quando glicerol 0,5% ou etanol 10% foi usado como solvente. Na presença de tolueno 0,5% e clorofórmio 0,1% em água destilada, observou-se o comportamento inverso para a eficiência da lixiviação.

#### **3.5.1.9- Efeito do pH**

O pH influencia na solubilidade do soluto no solvente e, portanto é um parâmetro importante no processo de extração. A lixiviação do ácido giberélico do farelo de trigo fermentado é máxima em pH 2,5 e diminui gradualmente com o aumento de pH, sendo 66,5% eficiente a pH 7,5 (Doelle *et. al.*, 1992).

### **3.6- TÉCNICAS DE LIXIVIAÇÃO**

A etapa de lixiviação pode determinar a economia do processo de FES, o que torna essencial à seleção da técnica mais adequada, sendo que as técnicas de lixiviação em contracorrente e percolação são freqüentemente usadas. Muitas das técnicas que têm sido usadas e desenvolvidas para a lixiviação do produto na indústria química e de alimentos pode também

ser efetivas na lixiviação dos solutos dos sólidos fermentados pelo processo de FES (Doelle *et. al.*, 1992).

### 3.6.1- Percolação

Na técnica de percolação o solvente é alimentado no topo do percolador, passa através do sólido e o extrato é descarregado continuamente na base do equipamento. Os sólidos são suportados por um material filtrante, formando um leito fixo de partículas. Múltiplas etapas de percolação podem ser executadas com alimentação de solvente fresco ou com recirculação.

O método de percolação é o mais simples de todas as técnicas de lixiviação usadas nas operações de FES e é também razoavelmente eficiente, uma vez que este método envolve custos menores de capital e equipamento (Doelle *et. al.*, 1992).

### 3.6.2- Extrator com Fluxo Pulsado

O extrator de coluna com fluxo pulsado é uma técnica de percolação modificada. Em escala de laboratório o extrator consiste de uma coluna de vidro com uma válvula na saída. O solvente é pulsado com taxa de fluxo apropriada, usando uma bomba dosadora eletrônica e adicionado ao sólido via um dispositivo de spray, sendo o extrato coletado continuamente em um receptor na saída da coluna. Devido à compressão do sólido no leito, a taxa de fluxo na saída não é igual a da alimentação do solvente na coluna. O sólido comprimido oferece resistência ao fluxo do solvente pelo leito, aumentando assim o tempo de contato e a eficiência da lixiviação (Doelle *et. al.*, 1992).

### 3.6.3- Lixiviação em Contra Corrente

Na lixiviação em contra corrente o sólido e o solvente se movem em direções opostas. Inicialmente o solvente puro entra em contato com o sólido lixiviado, e nos estágios subsequentes, o contato é feito com sólidos progressivamente enriquecidos de soluto, até que no final o solvente entra em contato com os sólidos frescos, ou seja, ainda não lixiviados (Doelle *et. al.*, 1992).

O contato inicial do solvente fresco com os sólidos contendo baixa concentração de soluto aumenta a eficiência da lixiviação possibilitando a obtenção de extratos com maiores concentrações de soluto do que na técnica de percolação (Kumar e Lonsane, 1987c.) Então a

relação sólido:solvente deve ser tão baixa quanto 1 L/Kg de sólido seco. Vários processos de FES utilizam esse método para lixiviação dos seus solutos.

Para evitar dificuldades no movimento do sólido, o processo de lixiviação em contra corrente é dividido em 2 – 5 estágios de contato. Os tanques de extração e seus acessórios são similares aos usados na técnica de percolação, sendo que para a técnica de lixiviação em contra corrente esses são equipados com bombas para recirculação de solvente dentro de cada estágio e também para transferência de solvente de um estágio para o outro. É possível aumentar a eficiência de lixiviação pelo aumento do número de estágios de contato. Como o sólido retém duas partes de solvente baseada em seu peso e a concentração do soluto em tal solvente retido é igual ao do extrato que sai do estágio de contato, cada estágio de contato adicional somente recuperará 1/3 do soluto total retido no solvente aderido ao sólido. Entretanto, empregar um grande número de estágios de contato é impraticável, pois consome mais tempo e necessita de trabalho e energia intensivos. Para alcançar uma concentração constante considerável de produto no extrato vindo de cada estágio de contato, é necessário que o sistema seja estabilizado para alcançar completamente um equilíbrio. Os fluxos de extrato e sólidos nos vários estágios, bem como a qualidade uniforme dos extratos em termos de concentrações de produtos é usualmente monitorada como critério para obtenção do equilíbrio do sistema (Doelle *et. al.*, 1992).

### 3.6.4- Taxa de Lixiviação Quando um Sólido é Dissolvido

Quando um material é dissolvido do sólido para a solução solvente, a taxa de transferência de massa da superfície do sólido para o líquido é a etapa controladora do processo. Essencialmente, tratando-se de um material puro, não há resistência à transferência de massa na fase sólida.

Para um processo em batelada, a Equação (3.1) descreve o fluxo de material do sólido para a solução. Essa mesma equação pode ser usada no caso da taxa de difusão no sólido ser muito maior quando, comparada com a taxa de difusão a partir da superfície da partícula (Geankopolis, 1983).

Para um soluto designado como A, dissolvendo-se em um volume V de solução, tem-se:

$$\frac{N_A}{A} = K_L(C_{AS} - C_A) \quad (3.1)$$

onde  $N_A$  (Kgmol de A dissolvido na solução por seg) é a taxa de dissolução de A,  $A$  ( $m^2$ ) é a área superficial da partícula,  $K_L$  é o coeficiente de transferência de massa em m/s,  $C_{AS}$  é a solubilidade de saturação do soluto sólido A na solução em Kgmol/ $m^3$  e  $C_A$  é a concentração de A na solução a um tempo  $t$  em Kgmol/ $m^3$ .

A taxa de acúmulo de A na solução pode ser expressa pela Equação (3.2):

$$\frac{Vdc_A}{dt} = N_A = AK_L(C_{AS} - C_A) \quad (3.2)$$

A integração da Equação (3.2) de  $t = 0$  e  $C_A = C_{A0}$  para  $t = t$  e  $C_A = C_A$ , resulta na Equação (3.4), que fornece a evolução da concentração de A na solução extratora com o tempo, a qual aproxima-se exponencialmente de uma condição de saturação.

$$\int_{C_{A0}}^{C_A} \frac{dc_A}{C_{AS} - C_A} = \frac{AK_L}{V} \int_{t=0}^t dt \quad (3.3)$$

$$\frac{C_{AS} - C_A}{C_{AS} - 0} = e^{-\left(\frac{KLa}{1-\varepsilon}\right)t} \quad \therefore \quad \ln \frac{C_{AS} - C_A}{C_{AS}} = -\frac{KLa}{1-\varepsilon} \times t \quad (3.4)$$

### 3.6.5- Análise do Método dos Momentos

A análise dos momentos é aplicada devido as dificuldades matemáticas na resolução da equação de transporte. A normalização estatística do momento  $\mu_n'$  do perfil de concentração da curva de eluição  $C(z,t)$  é definida pela Equação 3.5:

$$\mu_n = \frac{\int_0^{\infty} t^n c(z,t) dt}{\int_0^{\infty} c(z,t) dt} \quad (3.5)$$

#### 4.6.5.1. Tempo de Residência e Dispersão Axial

O momento é simplesmente a área normalizada da curva de eluição. O primeiro momento gera o tempo de retenção do soluto na coluna. Particularmente, o segundo momento gera a variância do pico o qual é relativo a eficiência da coluna e a sua dispersão axial (Nakanishi *et. al*,1977)

$$\mu_1 = \frac{\int_0^{\infty} c(z,t) t dt}{\int_0^{\infty} c(z,t) dt} = \frac{\sum_{i=1}^n c(t) t dt}{\sum_{i=1}^n c(t) dt} = tr \quad (3.6)$$

$$\mu_2 = \frac{\int_0^{\infty} c(z,t) t^2 dt}{\int_0^{\infty} c(z,t) dt} = \frac{\sum_{i=1}^n c(t) t^2 dt}{\sum_{i=1}^n c(t) dt} \quad (3.7)$$

Determinado-se  $\mu_1$  e  $\mu_2$ , pode-se calcular a variância, seguindo a relação:

$$\delta = \frac{\mu_2}{\mu_1^2} \quad (3.8)$$

Com os dados obtidos anteriormente, calcula-se a dispersão axial ( $m^2/s$ ) da coluna, através da Equação (3.9)

$$D_{ax} = \frac{\delta \cdot v_{t0} \cdot H}{2} \quad (3.9)$$

Onde:  $\delta$  = variância

$v_{t0}$  = velocidade superficial

H = altura do leito

### 3.7- PROCESSAMENTO DA RPB APÓS A LIXIVIAÇÃO

O extrato obtido da lixiviação pode ser sujeito a um processo adicional de RPB, dependendo do requerimento do produto no mercado. O extrato bruto contém vários sólidos solúveis bem como o produto de interesse, co-metabólitos e constituintes solúveis do meio. Ele contém também uma variedade de sólidos suspensos tal como finas partículas, células microbianas e esporos. Muitas das operações do processo de RPB são similares as usados no processo de SmF (Doelle *et. al.*, 1992).

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- MICRORGANISMO

Foi utilizada a cepa do fungo *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* (ICB USP K-1-16, FM USP 405 e CBS 154.26), mantida em ágar-Czapeck adicionado de óleo mineral (Nujol). O fungo foi repicado e mantido em ágar-Czapeck, modificado por Yunginger *et al.* (1980), à temperatura de 25°C.

Para preparar o inóculo, a cultura foi propagada à 25°C em frascos de Erlenmeyers de 500 mL inclinados contendo 200 mL de ágar-Czapeck, juntamente com uma quantidade de substrato, por um período de 14 dias. Após, foi adicionado água destilada para auxiliar na raspagem do meio formando assim uma suspensão de micélio e esporos.

Ágar-Czapeck, modificado por Yunginger *et al.* (1980): 2,0 g NaNO<sub>3</sub>; 1,0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>; 0,5 g KCl; 0,01 g FeSO<sub>4</sub>; 15,0 g Maltose; 15,0 g Dextrose; 10,0 g Tryptona e 1000 mL H<sub>2</sub>O destilada. Após o ajuste de pH entre 6,8 a 7,0 o meio é autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

A Figura 4.1 mostra a foto do fungo *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* após 14 dias de cultivo. Como é característico deste fungo, observa-se uma predominância de micélio.

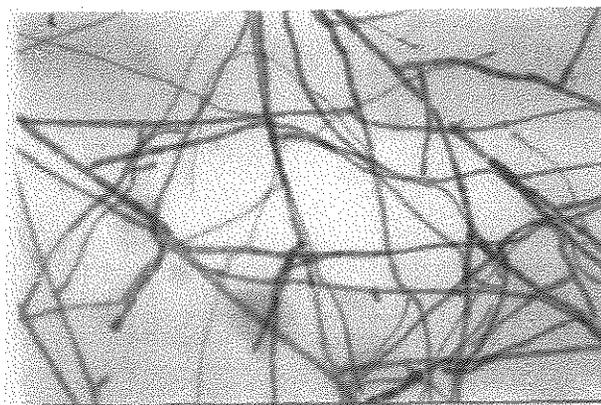


Figura 4.1: Fotografia da cultura do fungo *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* após 14 dias de cultivo. (x400)

## 4.2- SUBSTRATO

Os substratos, bagaço de cana de açúcar e o farelo de trigo foram moídos numa faixa granulométrica de 0,351 a 0,589 mm e pré-tratados em autoclave à 121°C, por 20 min, para gelatinização do amido e esterilização (Costa, 1996).

## 4.3- FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em meio sólido para a produção da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* foi feita segundo procedimento experimental e condições determinadas anteriormente por Hasan, 2000.

Os constituintes dos meios (substrato e nutrientes) foram inicialmente misturados uniformemente em embalagens de polipropileno. Na Tabela 4.1 são apresentados os sais (nutrientes) que compõe o meio de fermentação. As embalagens foram autoclavadas à 121°C, por 15 minutos. Após o resfriamento, o meio foi inoculado com a suspensão de microrganismos com concentração inicial igual a 0,4 mg/mL. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar, para prevenir contaminação, então o pH foi ajustado com KOH 0,5N a 9,0 e o meio transferido para os frascos de Erlenmeyers ou para bioreatores (colunas de Raimbault) onde ocorreram as fermentações. A temperatura de fermentação utilizada foi de 25°C e tempo de fermentação 7 dias.

Tabela 4.1. Composição do meio de fermentação em estado sólido (Base de cálculo 40 g/L)

Sais	Concentração (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	0,144
MgSO <sub>4</sub>	0,036
KCl	0,036
FeSO <sub>4</sub>	0,00072
ZnSO <sub>4</sub>	0,0008
CuSO <sub>4</sub>	0,0004
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,072
Maltose	1,08
Dextrose	1,08
Peptona	0,8

#### 4.4- EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA BIOMASSA FÚNGICA

Após a fermentação a extração das proteínas da biomassa fúngica foi feita através da técnica de lixiviação simples descrita no item 3.6.1.

Para a obtenção do extrato bruto de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* foi utilizada a seguinte metodologia, que foi adaptada segundo a técnica descrita por YUNGINGER *et al.* (1980), com algumas modificações.

1- Ao término da fermentação, a massa fermentada foi seca a 35°C e após triturada com auxílio de graal e pistilo;

2- O extrato bruto foi obtido mantendo-se o triturado fúngico com líquido extrator em condições pré-determinadas de pH, temperatura e relação de sólido solvente e sob agitação constante por uma noite (16 h);

3- As misturas foram inicialmente filtradas e, após, centrifugadas à velocidade de 12000 rpm durante 15 minutos, para remoção de sólidos em suspensão,

4- O extrato bruto foi conservado sob refrigeração.

A metodologia de extração, juntamente com o planejamento experimental foi utilizada para determinar as melhores condições de operação. A extração foi feita com líquidos extratores, os quais foram os mais citados na literatura para extração de proteínas de meio líquido, tais como as soluções de Coca (solução bicarbonatada), Tris-HCl, e NaCl em diferentes concentrações e água destilada (Menezes *et al.*, 1995), bem como o pH do meio, adição de inibidor de proteases (PMSF), temperatura de contato e relação sólido:solvente.

##### 4.4.1- Planejamento Experimental

A metodologia do planejamento experimental fatorial associada à análise de superfície de resposta é uma ferramenta fundamental na teoria estatística, por fornecer informações muito mais seguras do processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativas e erro (Box *et. al.*, 1978).

Através desta técnica sistemática de condução de experimentos é possível avaliar os efeitos principais das variáveis nas respostas desejadas, bem como a interação entre elas. A partir da análise de variância pode-se propor um modelo probabilístico adequado que correlaciona as respostas em função das variáveis estudadas, construindo-se as superfícies de

resposta para determinar as faixas ótimas de operação. Nem sempre o objetivo do trabalho em estudo é a otimização do processo, mas sim um melhor conhecimento sobre as respostas do sistema frente às variações ou perturbações que podem ocorrer dentro das faixas de operação estabelecidas. Assim, outra informação muito importante que pode ser obtida através do planejamento fatorial é a verificação das variáveis que apresentam nenhuma ou pouca influência nas respostas, fornecendo subsídios fundamentais quanto à flexibilidade e robustez do sistema e conseqüentemente na definição da melhor estratégia de controle operacional.

#### ***4.4.1.1- Planejamento Fatorial e “Screening Design”***

A análise univariável ou o estudo de uma variável por vez mantendo as outras constantes, dificulta grandemente a discussão dos resultados, além do tempo gasto, material, e principalmente da falta de uma conclusão baseada numa metodologia científica. A maior falta de informação no estudo univariável relaciona-se ao efeito sinérgico ou antagônico entre as variáveis, que só podem ser obtidas pela determinação dos efeitos de interação entre as variáveis através de um planejamento fatorial. Uma outra vantagem do planejamento fatorial é a possibilidade de otimizar várias respostas ao mesmo tempo.

Para se aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa é usual um planejamento fatorial com dois níveis (-1 e +1) para cada variável. Uma particularidade muito grande em processos bioquímicos é o grande número de variáveis envolvidas. Os planejamentos fatoriais fracionados são muitos úteis nas etapas prévias de um desenvolvimento de processo, por exemplo, para identificação das variáveis mais relevantes que devem entrar num planejamento completo numa etapa posterior. Assim, este procedimento é muito interessante em termos qualitativos, mas não se deve a partir de um planejamento fracionado otimizar o processo. Isto porque os efeitos principais, na verdade contrastes, estão confundidos com interações de 2ª ou 3ª ordem ou superiores conforme o tipo de resolução do fracional.

Quando o número de variáveis aumenta, a utilização do planejamento fracionado começa a dificultar a análise dos contrastes das variáveis. Uma alternativa muito interessante

que reduz drasticamente o número de ensaios a serem realizados é o planejamento fatorial proposto por Plackett e Burman em 1946, citado por Rodrigues *et. al.*, 1998. São planejamentos saturados, muito úteis como avaliação prévia de variáveis (“screening desing”), etapa preliminar à otimização de processos. As frações propostas por Plackett Burman (PB) permitem estimar “efeitos principais” (contrastes) com variância mínima. Nos planejamentos de PB as colunas são todas ortogonais. Esta simetria permite que os “efeitos principais” de cada variável sejam determinados individualmente, admitindo-se que os efeitos de interação sejam desprezíveis (Barros Neto *et. al.*, 1995). Os planejamentos propostos por PB com maior potencial de uso para 12, 16, 20, 24, 28 e 36 ensaios, existindo porem para sistemas superiores a 100 variáveis. Eles podem ser usados por qualquer número de fatores ou variáveis de entrada, desde que estes fiquem pelo menos em 1 abaixo do número de ensaios. Apesar disto, é conveniente utilizar um planejamento que fique com o número de ensaios um pouco superior ao número de variáveis, para se ter graus de liberdade que possibilitem estimar o erro padrão e assim definir as variáveis estatisticamente significativas. As colunas do planejamento do PB que são relacionadas com as variáveis são chamadas de variáveis inertes, utilizadas para determinar o erro padrão. Embora os planejamentos de PB apresentem as vantagens citadas acima, ele é pouco utilizado na literatura (Rodrigues *et. al.*, 1998).

#### 4.4.1.1.1- Seleção das Variáveis Importantes do Processo

O planejamento de Plakett Burman foi usado na avaliação das variáveis mais importantes do processo. Para isto, foram utilizadas no processo de extração 5 variáveis independentes a serem analisadas através do software Statistica 5.0.

As variáveis independentes estudadas foram: temperatura de contato (°C), relação sólido:solvente, pH do meio, inibidor de protease ( $\mu\text{L}$ ) e a concentração de sais do líquido extrator (solvente) (M). A resposta determinada (variável dependente) para cada ensaio foi expressa em termos de massa de proteína total.

A Tabela 4.2 apresenta os valores reais das variáveis correspondentes ao nível inferior (-1) e superior (+1) e a Tabela 4.3 o planejamento de PB na forma codificada para 12 ensaios com 3 pontos centrais, para o cálculo do erro puro.

Tabela 4.2. Níveis das variáveis do planejamento não saturado

<b>Variáveis</b>	<b>Níveis</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
Temperatura de contato (°C)		4	14,5	25
Relação sólido: líquido		1:15	1:20	1:25
pH do meio		5	6,2	7,4
Inibidor de protease (µL)		0	20	40
Conc. de sais no líquido extrator		0,05	0,125	0,2

Tabela 4.3. Matriz do planejamento Plackett Burman para 12 ensaios.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura de contato</b>	<b>Relação sólido:solvente</b>	<b>pH do meio</b>	<b>Inibidor de protease</b>	<b>Conc. de sais no líquido</b>
1	+1	-1	+1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	+1	+1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	+1	-1
8	-1	-1	+1	+1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0

#### 4.4.1.2- Determinação da Relação entre as Principais Variáveis e seus Melhores Níveis

Nos experimentos subseqüentes, as variáveis temperatura, pH e relação sólido:solvente foram selecionadas para a realização de um planejamento fatorial completo com  $2^3$  ensaios mais seis pontos axiais e três pontos centrais, ou seja planejamento estrela.

As Tabelas 4.4 e 4.5 apresentam os níveis dos fatores utilizados no planejamento, tanto para o farelo de trigo como para o bagaço de cana de açúcar.

Tabela 4.4. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para o substrato farelo de trigo fermentado.

Fatores	Níveis				
	- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
Temperatura de contato (°C)	15	19	25	31	35
Relação sólido:solvente	1:10	1:12	1:15	1:18	1:20
pH do meio	5,8	6,5	7,4	8,4	9

Tabela 4.5. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para o substrato bagaço de cana de açúcar fermentado.

Fatores	Níveis				
	- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
Temperatura de contato (°C)	4	8,5	15	21,5	26
Relação sólido:solvente	1:10	1:12	1:15	1:18	1:20
pH do meio	5,8	6,5	7,4	8,4	9

A matriz do planejamento fatorial composto central é apresentada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Matriz do planejamento fatorial composto central.

Ensaio	Temperatura	Relação sólido:solvente	pH
1	- 1	- 1	- 1
2	+ 1	- 1	- 1
3	- 1	+ 1	- 1
4	+ 1	+ 1	- 1
5	- 1	- 1	+ 1
6	+ 1	- 1	+ 1
7	- 1	+ 1	+ 1
8	+ 1	+ 1	+ 1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	- 1,68	0	0
13	+ 1,68	0	0
14	0	- 1,68	0
15	0	+ 1,68	0
16	0	0	- 1,68
17	0	0	+ 1,68

#### 4.5- IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NOS EXTRATOS

A identificação das proteínas nos extratos brutos foi feita através de seus pesos moleculares usando a técnica de eletroforese SDS-PAGE.

As proteínas, quando apresentam estruturas terciárias e quaternárias, são desnaturadas na forma de suas sub-unidades de polipeptídeos por SDS e  $\beta$ -Mercaptanol. As subunidades se ligam a quantidades de SDS por unidade de peso (4g de SDS por g de proteína) e ficam carregadas negativamente. Todos os polipeptídios adquirem a mesma densidade de carga e a separação dependerá, na maior parte, do seu tamanho.

Para os ensaios de eletroforese as amostras, extratos protéicos brutos, passaram por várias etapas anteriores de precipitação e centrifugação, para remoção de sais e algumas impurezas. As precipitações foram feitas com álcool 70% e acetona 1:1.

1. Para cada 2 mL de amostra adicionar 3 mL de álcool 70%;
2. Colocar as amostras em banho a 0°C por 1h sob lenta agitação;
3. Centrifugar por 20 min, 10000 rpm a 4°C, descartar o sobrenadante;
4. Ressolubilizar o precipitado com 3 mL de tampão acetato 100µL, pH 5, agitar bem;
5. Centrifugar por 10 min para remover sólidos insolúveis,
6. No sobrenadante (volume conhecido) adicionar acetona na proporção de 1:1;
7. Agitar 1h, 0°C;
8. Centrifugar por 20 min, 10000 rpm a 4°C, descartar o sobrenadante;
9. Ressolubilizar o precipitado em solução tampão Tris-HCl 30 mM, pH 7,5;
10. Centrifugar por 10 min, para remover insolúveis;
11. Passar o sobrenadante (2,5 mL) em uma coluna de PD - 10

Os ensaios de eletroforese foram realizados com os extratos brutos pré-tratados em equipamento PhastSystem da Pharmacia. As proteínas foram inicialmente desnaturadas com SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) e eluídas em gel do tipo PhastGel IEF, de gradiente médio 8-25, produzido pela Pharmacia Biotech. Foram usados marcadores padrões de peso molecular médio conhecido. A revelação das proteínas no gel foi feita por fixação em solução de glutaraldeído, seguida de reação com nitrato de prata e revelação com ácido acético.

#### **4.6- QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS**

A quantificação das proteínas foi feita por dosagem de proteína total, segundo o método colorimétrico de Bradford (1976) cuja faixa de linearidade varia de 0 a 1,1 mg/mL .

A quantificação das proteínas foi feita em relação à proteína albumina de soro bovino (BSA) usada como padrão. A curva padrão foi construída a partir de diversas diluições das concentrações de proteína padrão (mg/mL) versus a leitura de absorbância à 595 nm que está apresentada no Anexo 1.

O ensaio envolve as seguintes etapas:

1. Calcular o volume necessário do reagente de Bradford (1 mL para cada amostra);
2. Filtrar o reagente com papel filtro Whatmam tipo 1;
3. Diluir o reagente na proporção de 1:4 com água deionizada;
4. Transferir 5 mL do reagente diluído a um tubo de ensaio;
5. Adicionar 100 mL da amostra;
6. Agitar e deixar reagir por aproximadamente 10 min;
7. Ler a absorbância a 595 nm.

#### **4.7- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM LEITO FIXO**

##### **4.7.1- Determinação do Tempo de Residência e Dispersão axial**

Para a determinação do tempo de residência e da dispersão axial do solvente a coluna de extração de leito fixo, com diâmetro de 5 cm, foi empacotada com 50 g de farelo de trigo fermentado previamente homogeneizado, o que correspondia a uma altura de leito de 13 cm. O farelo de trigo foi lavado com água em abundância, passando este solvente através da coluna. Foi colocado um anteparo (tela) para fixar o leito. Após a preparação da coluna adicionou-se 10 mL de solução de BSA 5% à uma vazão de  $2 \text{ cm}^3/\text{s}$  e temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , a primeira amostra foi coletada no momento em que a solução começou a sair da coluna, retirando as frações seguintes em intervalos de 10 s.

Os dados foram analisados pelo Método dos Momentos descrito no item no item 3.6.5, através das Equações

##### **4.7.2- Determinação do Coeficiente Global de Transferência de Massa (KLa)**

Para a determinação do coeficiente global de transferência de massa sólido líquido, relativo à extração das proteínas do meio sólido proveniente da FES, a coluna de extração foi empacotada com farelo de trigo fermentado previamente homogeneizado, e mantida à temperatura a  $30^\circ\text{C}$  através de banho termostático. O pH da água (solvente) foi ajustado em 9,0 e a vazão ajustada em  $2 \text{ cm}^3/\text{s}$ . O solvente foi alimentado continuamente pelo topo da coluna e as amostras retiradas em volumes iguais, de 10 em 10 min na base da coluna.

Posteriormente, essas amostras eram centrifugadas por 15 min. a 12000 rpm e quantificadas quanto à concentração de proteína total pelo método de Bradford.

Os dados experimentais foram analisados através do modelo descrito pela Equação (3.4) do item 3.6.4, considerando que a devido à natureza do micélio formado durante o crescimento do fungo, e a sua característica aeróbia, a biomassa situa-se associada somente à superfície do sólido. Portanto, o processo de extração das proteínas da biomassa pode ser descrito pela equação da difusão do soluto da superfície de partículas sólidas para a solução líquida.

Neste caso, a Equação (3.2) do item 3.6.4 pode ser escrita como:

$$\frac{dC_A}{dt} = K_L \frac{A_P}{V_P} (C_{AS} - C_A) \quad (4.1)$$

Onde:  $C_{AS}$  é a quantidade total de proteínas extraída do sólido, tomada como concentração cumulativa em todas as soluções de extrato.  $A_P$  e  $V_P$  são a área e o volume da partícula respectivamente.

Considerando o leito com  $n$  particular, tem-se que o volume total de sólido  $V_s$ , é:

$$V_S = nV_P \quad (4.2)$$

Em termos de porosidade do leito,  $\varepsilon$ , tem-se:

$$V_S = (1 - \varepsilon) \cdot V_T \quad (4.3)$$

Onde:  $V_T$  é o volume total do leito

Substituindo a Equação (4.2) em (4.3), tem-se:

$$V_p = \frac{1-\varepsilon}{n} V_T \quad (4.4)$$

A área total de troca de massa no leito, correspondente a  $n$  partículas, é:

$$nA_p = A_T \quad (4.5)$$

$$A_p = \frac{A_T}{n} \quad (4.6)$$

Substituindo (4.6) e (4.4) em (4.1) obtém-se:

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{K_L \cdot A_T}{(1-\varepsilon)V_T} (C_{AS} - C_A) \quad (4.7)$$

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{K_L}{(1-\varepsilon)} \cdot a \cdot (C_{AS} - C_A) \quad (4.8)$$

Onde  $a$  é área específica total de troca de massa no leito, e  $K_L a$  o coeficiente de transferência de massa sólido-líquido.

Integrando a Equação (4.8) com os limites de  $C_A = C_{A0}$  e  $t = 0$  para  $C_A = C_A$  e  $t = t$

$$\int_{C_{A0}}^{C_A} \frac{dc_A}{C_{AS} - C_A} = \frac{K_L a}{(1-\varepsilon)} \int_{t=0}^t dt \quad (4.9)$$

$$\ln \frac{C_{AS} - C_A}{C_{AS}} = -\frac{K_L a}{1-\varepsilon} \times t \quad (4.10)$$

A Equação (4.10) foi usada para determinar o  $K_L a$ , através do ajuste linear das variáveis  $\ln(C_{AS} - C_A / C_{AS})$  versus tempo.

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- PRODUÇÃO DA BIOMASSA DE *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A produção da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* por fermentação em meio sólido foi conduzida conforme procedimento descrito no item 4.3, usando como substratos farelo de trigo ou bagaço de cana de açúcar.

As produtividades obtidas, expressas em mg de proteína total por grama de sólido fermentado seco são apresentadas na Tabela 5.1. Pode-se observar que essa produtividade é bem maior para o farelo de trigo do que para o bagaço de cana usado como substrato na FES.

Tabela 5.1. Produtividade (mg de proteína total por mg de sólido fermentado seco) dos substratos farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar fermentados

Substrato	Produtividade (mg/mgs)
Farelo de trigo	23,59
Bagaço de cana de açúcar	8,33

Na Figura 5.1 é apresentada uma fotografia do gel de eletroforese contendo as bandas características dos extratos brutos, obtidos por extração com Tris-HCl para ambos os substratos antes (imediatamente após a inoculação) e após a fermentação. Embora as bandas dos extratos brutos não apresentem boa definição, devido à presença de vários interferentes no meio, pode-se observar que diferentes proteínas foram produzidas em decorrência do crescimento da biomassa fúngica. As bandas obtidas para os extratos de farelo de trigo fermentado e mais nitidamente para o bagaço de cana de açúcar fermentado situam-se nas mesmas faixas de massas moleculares de 94,0; 67,0; 43,0; 30,0; 20,1 e 14,4, identificadas a partir dos padrões. Três dessas faixas de massas moleculares, 67,0; 30,0 e 14,4, são idênticas às obtidas da biomassa dessa mesma cepa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*

cultivada em fermentação submersa por Menezes *et al.* (1995), as quais foram designadas como Dre1, Dre2 e Dre3 e tiveram sua alergenicidade comprovada em testes *in vivo* e *in vitro*.

Esses resultados indicam que os extratos brutos obtidos da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* cultivada em meio sólido contêm proteínas potencialmente alergênicas, devendo essa alergenicidade ser comprovada através de testes imunológicos específicos como “immunoblotting”.

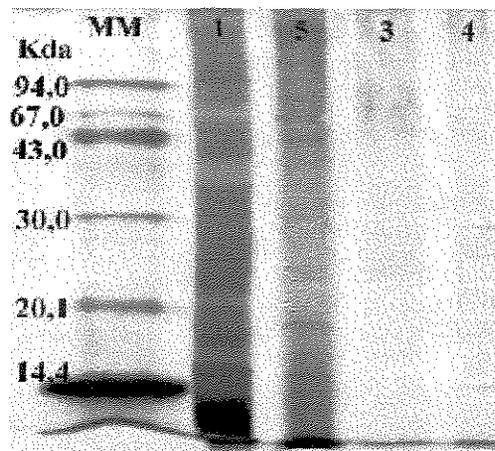


Figura 5.1. Fotografia do gel de eletroforese contendo as bandas características dos extratos brutos, obtidos por extração com Tris-HCl para os substratos bagaço de cana de açúcar (3,4) e farelo de trigo (1,5) antes (imediatamente após a inoculação) e após a fermentação

## 5.2- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA BIOMASSA FÚNGICA

### 5.2.1- Extração em Batelada

#### 5.2.1.1- Seleção das Variáveis Importantes do Processo e seus Efeitos sobre a Concentração de Proteína Total

A extração das proteínas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* produzida por fermentação em meio sólido foi feita inicialmente em batelada, em frascos de Erlenmeyers agitados, usando os solventes água, e soluções de NaCl, Coca e Tris-HCl, para

seleção do melhor solvente, determinação das variáveis importantes do processo e dos seus efeitos sobre a massa de proteína total.

Os resultados obtidos do planejamento fatorial proposto por Plackett Burman, que é uma avaliação prévia das variáveis “screening desing” são apresentados na Tabela 5.2 em termos de massa de proteína total, para os substratos bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo fermentados.

Tabela 5.2. Matriz com as respostas do planejamento Plackett Burman

Ensaio (*)	RESPOSTAS – Massa de Proteína Total (mg)							
	Bagaço de cana de açúcar				Farelo de trigo			
	Água	NaCl	Tris-HCl	Coca	Água	NaCl	Tris-HCl	Coca
1	10,66	12,06	12,26	10,19	30,60	23,28	25,107	26,48
2	8,87	10,49	10,14	8,69	24,85	18,19	28,45	20,05
3	13,03	12,95	11,50	10,70	30,67	24,81	28,21	23,33
4	9,45	11,58	12,28	11,31	36,82	21,39	26,55	26,72
5	6,88	7,24	8,37	9,28	24,99	12,02	20,53	17,65
6	13,59	10,05	11,58	12,36	35,45	17,90	27,33	25,22
7	12,60	11,52	13,37	13,42	31,24	25,98	31,56	29,85
8	13,50	12,46	10,69	10,62	29,94	21,76	24,93	18,91
9	8,38	7,86	7,55	8,13	22,65	20,47	17,92	17,79
10	8,68	8,76	9,27	7,63	25,55	20,54	19,91	18,99
11	9,68	10,14	11,14	9,41	24,90	34,59	21,46	20,42
12	7,32	7,91	8,69	6,22	21,20	23,69	21,37	20,07
13	11,74	11,02	11,34	12,31	29,28	27,41	28,10	27,39
14	12,24	12,18	11,36	12,21	29,31	27,32	29,06	28,04
15	11,88	11,76	11,42	11,97	30,64	27,21	27,19	28,19

(\*) As condições experimentais dos ensaios estão descritas na Tabela 4.3.

Analisando os resultados para os vários níveis de condições operacionais, observa-se que o solvente que resultou em um maior rendimento de proteínas, tanto para o bagaço de cana de açúcar como para o farelo de trigo fermentados foi a água. A extração foi portanto fortemente influenciada pela força iônica do meio, dentre outros fatores. A água foi o solvente selecionado para os experimentos subsequentes de determinação dos melhores níveis das variáveis operacionais do processo.

As Tabelas 5.3 a 5.6 apresentam os valores dos efeitos estimados para a resposta massa de proteína total (mg), juntamente com os parâmetros estatísticos erro padrão e distribuição normal padrão t(2), correspondentes aos extratos obtidos de bagaço de cana de açúcar fermentado. Os números em vermelho são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5.3. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do bagaço de cana de açúcar fermentado usando água como solução extratora.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	10,56	0,0666	158,6587	0,000040
Temperatura de contato	-1,06	0,1489	-7,1402	0,019056
Relação sólido:solvente	1,11	0,1489	7,4536	0,017528
pH da solução	3,83	0,1489	25,7629	0,001503
Inibidor de protease	-0,54	0,1489	-3,6708	0,066855

R = 0,8758

Erro puro = 0,0665

Tabela 5.4. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido de bagaço de cana de açúcar fermentado extraído com solução de NaCl.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>P</b>
Média	10,53200	0,1516	69,45266	0,000207
Temperatura de contato	-0,44333	0,3390	-1,30745	0,321155
Relação sólido:solvente	0,29333	0,3390	0,86508	0,478183
pH da solução	3,03667	0,3390	8,95551	0,012240
Inibidor de protease	-0,12000	0,3390	-0,35389	0,757244
Conc.da solução extratora	-0,73000	0,3390	-2,15286	0,164201

R = 0,8025

Erro puro = 0,3449

Tabela 5.5. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do bagaço de cana de açúcar fermentado extraído com solução de Tris-HCl.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	10,73067	0,010750	998,2315	0,000001
Temperatura de contato	0,16000	0,024037	6,6564	0,021833
Relação sólido:solvente	0,89333	0,024037	37,1649	0,000723
pH da solução	2,75333	0,024037	114,5456	0,000076
Inibidor de protease	-0,34000	0,024037	-14,1449	0,004961
Conc.da solução extratora	-1,48667	0,024037	-61,8491	0,000261

R = 0,9357

Erro puro = 0,00173

Tabela 5.6. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do bagaço de cana de açúcar fermentado extraído com solução de Coca.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	10,29667	0,045117	228,2208	0,000019
Temperatura de contato	0,16000	0,100885	1,5860	0,253635
Relação sólido:solvente	1,62667	0,100885	16,1240	0,003824
pH da solução	3,20667	0,100885	31,7854	0,000988
Inibidor de protease	0,82333	0,100885	8,1611	0,014684
Conc.da solução extratora	-0,08667	0,100885	-0,8591	0,480830

R = 0,8352

Erro puro = 0,0305

Os valores dos efeitos significantes obtidos mostram que as variáveis mais importantes do processo de extração do bagaço de cana de açúcar com líquido extrator água foram: temperatura, pH e relação sólido:solvente

Analogamente, as Tabelas 5.7 a 5.10 apresentam os efeitos estimados para a resposta massa de proteína total (mg), juntamente com os parâmetros estatísticos erro padrão, distribuição normal padrão t(2), correspondentes aos extratos obtidos do farelo de trigo fermentado. Os números em vermelho são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5.7. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado extraído com água.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	28,53933	0,1644	173,5944	0,00000
Temperatura de contato	2,94333	0,3676	8,0066	0,004067
Relação sólido:solvente	0,89000	0,3676	2,4210	0,094084
pH da solução	8,43000	0,3676	22,9316	0,000182
Inibidor de protease	0,35333	0,3676	0,9612	0,407380

R = 0,9347

Erro puro = 0,40542

Tabela 5.8. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado extraído com solução de NaCl.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	23,08267	0,025863	892,502	0,000001
Temperatura de contato	-6,38333	0,057831	-110,379	0,000082
Relação sólido:solvente	0,34000	0,057831	-5,879	0,027733
pH da solução	0,99000	0,057831	17,119	0,003395
Inibidor de protease	-4,22000	0,057831	-72,971	0,000188
Conc.da solução extratora	-4,99000	0,057831	-86,286	0,000134

R = 0,8001

Erro puro = 0,0100333

Tabela 5.9. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado extraído com solução de Tris-HCl.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	25,17800	0,241445	104,2806	0,000092
Temperatura de contato	0,40333	0,057831	0,7471	0,532909
Relação sólido:solvente	3,62667	0,057831	6,7175	0,021451
pH da solução	5,67333	0,057831	10,5084	0,008935
Inibidor de protease	1,09333	0,057831	2,0251	0,180128
Conc. da solução extratora	-2,61000	0,057831	-4,8343	0,040224

R = 0,8442

Erro puro = 0,8744

Tabela 5.10. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado extraído com solução de Coca.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	23,27333	0,109798	211,9654	0,000022
Temperatura de contato	0,79000	0,245515	3,2177	0,084519
Relação sólido:solvente	1,26000	0,245515	5,1321	0,035934
pH da solução	5,92333	0,245515	24,1261	0,001714
Inibidor de protease	-0,59000	0,245515	-2,4031	0,138163
Conc. da solução extratora	-3,61667	0,245515	-14,7309	0,004577

R = 0,7637

Erro puro = 0,18083

Os resultados obtidos mostram que para o solução extrator água, os efeitos mais importantes estão nas variáveis pH da solução e temperatura. Para as demais extrações as variáveis que apresentaram efeito significativo foram: o pH do meio, relação sólido:solvente e concentração de sais no líquido extrator quando utilizou-se a solução de Tris-HCL e Coca

(solução bicarbonatada) e pH do meio, relação sólido:solvente, temperatura, concentração de sais quando utilizou-se como líquido extrator a solução de NaCl.

A Tabela 5.11 apresenta de forma comparativa os efeitos das variáveis estudadas sobre a massa de proteína total, variável resposta analisada.

Tabela 5.11. Comparação dos efeitos das variáveis estudadas sobre a massa de proteína total nos extratos brutos.

Variável	Bagaço de cana de açúcar				Farelo de trigo			
	Água	NaCl	Tris-HCl	Coca	Água	NaCl	Tris-HCl	Coca
Temperatura de contato	-1,06	-0,4433	0,1600	0,1600	2,9433	-6,3833	0,4033	0,7900
Relação sólido:solvente	1,11	0,2933	0,8933	1,6266	0,8900	0,3400	3,6266	1,2600
pH do meio	3,83	3,0366	2,7533	3,2066	8,4300	0,9900	5,6733	5,9233
Inibidor de protease	-0,54	-0,1200	-0,3400	0,8233	0,3533	-4,2200	1,0933	-0,5900
Conc. solução extratora	-	-0,7300	-1,4866	-0,0866	-	-4,9900	-2,6100	-3,6166

Dos resultados da Tabela 5.11, pode-se concluir que as variáveis temperatura, pH do meio e relação sólido:solvente exercem influência sobre as respostas, sendo significativas nos casos onde se utilizou a água como líquido extrator com exceção da variável relação sólido:solvente para o farelo de trigo. Já, a variável inibidor de protease não foi significativa quando utilizou-se este líquido tanto para o farelo de trigo quanto para o bagaço de cana de açúcar. Estes resultados podem ser melhor visualizados nas Figuras 5.2 e 5.3.

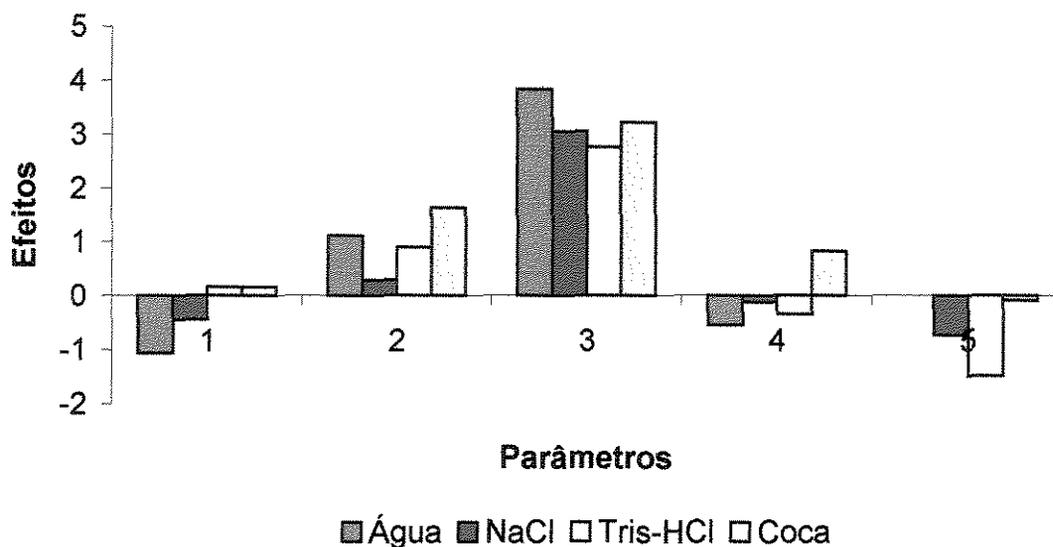


Figura 5.2. Efeito das variáveis estudadas no Planejamento Plackett Burman para os extratos brutos obtidos do bagaço de cana-de-açúcar fermentado. Parâmetros: 1- Temperatura, 2- Relação sólido:solvente, 3- pH do meio, 4- Inibidor de protease e 5- Concentração de sais nos líquidos extratores.

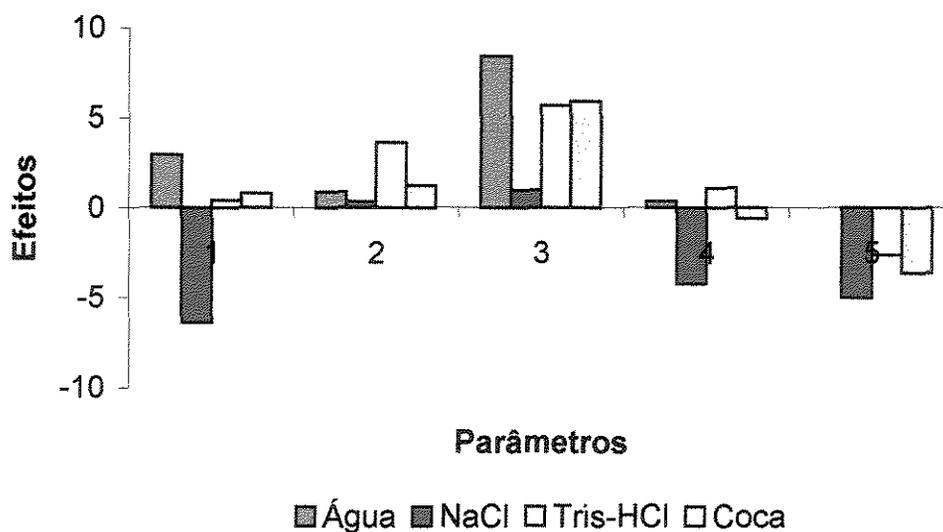


Figura 5.3. Efeitos das variáveis estudadas no Planejamento Plackett Burman para os extratos Brutos obtidos do farelo de trigo fermentado. Parâmetros: 1- Temperatura, 2- Relação sólido:solvente, 3- pH do meio, 4- Inibidor de protease e 5- Concentração de sais nos líquidos extratores

A insignificância da variável presença de inibidor de protease foi verificada também através da fotografia dos géis de eletroforese, Figura 5.4, onde as bandas presentes são semelhantes as dos extratos obtidos com e sem a presença de inibidor de protease, indicando que não houve hidrólise das proteínas durante o processo de extração.

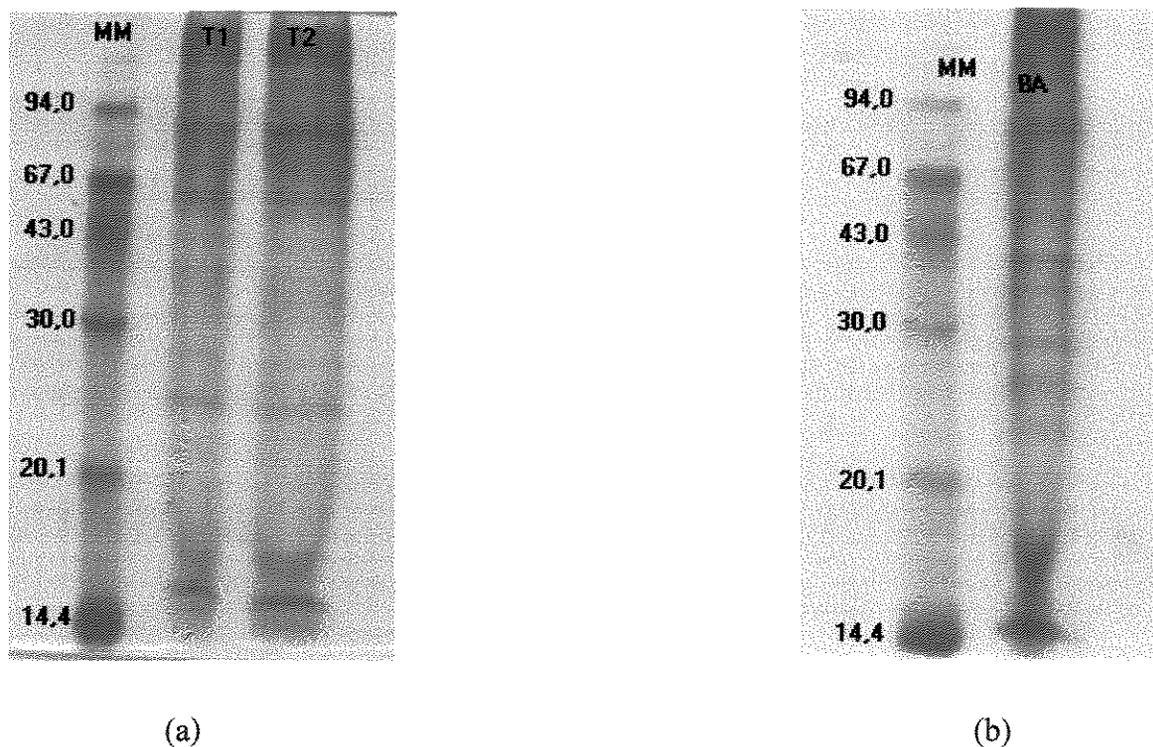


Figura 5.4. Análise eletroforética das proteínas por SDS-PAGE. As faixas MM representam os marcadores de massa molecular (fosforilase b, 94KDa; albumina bovina, 67,0KDa; ovalvumina, 43,0KDa; anidrase carbônica, 30KDa; inibidor de tripsina, 20,1KDa;  $\alpha$ -lactoalbumina, 14,4KDa). (a) As faixas T1 e T2 representam os extratos protéicos dos substratos com e sem inibidor de protease respectivamente. (b) A faixa BA representa o extrato protéico do bagaço de cana-de-açúcar sem inibidor de protease.

Dos resultados obtidos pode-se concluir que para aumentar a massa de proteína total nos extratos brutos de bagaço de cana de açúcar fermentado, este planejamento indica que se deve diminuir a temperatura e aumentar a relação sólido:solvente e o pH. Para os extratos obtidos do farelo de trigo fermentado, o aumento da temperatura, pH e relação sólido:solvente devem aumentar a concentração de proteína total.

### ***5.2.1.2- Determinação dos Melhores Níveis das Variáveis Operacionais do Processo de Extração***

A partir das informações obtidas do planejamento de Plackett Burman, utilizou-se a técnica de superfície de resposta através da realização de um planejamento fatorial composto central, com o objetivo de determinar os níveis das variáveis operacionais que resultem maiores valores de massa de proteína total no processo de extração. Neste tipo de planejamento o número de níveis aumenta de 3 para 5, em relação ao planejamento de Plackett Burman, possibilitando assim verificar efeitos de segunda ordem na resposta, além de aumentar a faixa de estudo das variáveis e permitir verificar efeitos de interações entre os fatores.

A Tabela 5.12 apresenta de forma comparativa as respostas em termos de massa de proteína total, obtidas através do planejamento fatorial completo para os vários conjuntos de condições operacionais para os extratos brutos obtidos do bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo fermentados.

Tabela 5.12. Matriz com as respostas do planejamento completo.

Ensaio	Níveis dos fatores			Massa de Proteína Total (mg)	
	Temperatura	Sólido:solvente	pH	Farelo de trigo	Bagaço de cana de açúcar
1	- 1	- 1	- 1	20,74	7,69
2	+ 1	- 1	- 1	19,35	6,62
3	- 1	+ 1	- 1	23,00	7,56
4	+ 1	+ 1	- 1	23,23	9,63
5	- 1	- 1	+ 1	25,06	8,35
6	+ 1	- 1	+ 1	24,47	9,57
7	- 1	+ 1	+ 1	32,16	7,76
8	+ 1	+ 1	+ 1	25,76	7,75
9	0	0	0	24,53	8,72
10	0	0	0	24,30	8,90
11	0	0	0	24,02	7,47
12	- 1,68	0	0	24,30	7,75
13	+ 1,68	0	0	22,87	10,67
14	0	- 1,68	0	20,09	7,77
15	0	+ 1,68	0	24,52	8,22
16	0	0	- 1,68	20,97	7,91
17	0	0	+ 1,68	29,03	10,25

As Tabelas 5.13 e 5.14 apresentam os valores dos efeitos estimados para a resposta massa de proteína (mg), juntamente com os parâmetros estatísticos erro padrão e distribuição normal padrão t(2). Os números em vermelho são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5.13. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do farelo de trigo fermentado utilizando água como líquido extrator. (L) coeficiente linear e (Q) coeficiente quadrático.

		<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média		24,24535	0,148499	163,2698	0,000038
Temperatura de contato	L	-1,54706	0,139554	-11,0857	0,008039
	Q	-0,21229	0,153744	-1,3808	0,301390
Relação sólido:solvente	L	3,21922	0,139554	23,0679	0,001874
	Q	-1,12021	0,153744	-7,2862	0,018320
pH do meio	L	5,08128	0,139554	36,4108	0,000753
	Q	0,78845	0,153744	5,1284	0,035983
Temp. x sol:sln		-1,04855	0,182256	-5,7532	0,028909
Temp. x pH		-1,45925	0,182256	-8,0066	0,015243
Sol:sln x pH		0,56215	0,182256	3,0844	0,090994

R = 0,9660

Erro puro = 0,0664342

Tabela 5.14. Efeitos estimados para a resposta massa de proteína total no extrato bruto obtido do bagaço de cana de açúcar fermentado utilizando água como líquido extrator. (L) coeficiente linear e (Q) coeficiente quadrático.

		<b>Efeito</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média		8,41121	0,449561	18,70985	0,002844
Temperatura de contato	L	1,03745	0,422482	2,45561	0,133435
	Q	0,29736	0,465439	0,63888	0,588307
Relação sólido:solvente	L	0,18097	0,422482	0,42835	0,710119
	Q	-0,56255	0,465439	-1,20864	0,350307
pH do meio	L	0,86114	0,422482	2,03829	0,178391
	Q	0,20701	0,465439	0,44476	0,699993
Temp. x sol:liq		0,47800	0,551756	0,86633	0,477635
Temp. x pH		0,05320	0,551756	0,09642	0,931979
Sol:liq x pH		-1,32350	0,551756	-2,39871	0,138570

R = 0,7978

Erro puro = 0,6088687

Para se obter um modelo estatístico que descreva o comportamento do sistema sobre diversas condições, é necessário realizar a análise de variância do processo cujos resultados são apresentados nas Tabelas 5.15 e 5.16.

Tabela 5.15. Análise de variância das respostas massa de proteína total para os extratos brutos obtidos do farelo de trigo fermentado usando água como líquido extrator.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F calc.</b>	<b>F (0,95,-4,-12)</b>
Regressão	145,3987	4	36,3496	38,80	3,26
Resíduos	11,2411	12	0,936		
Falta ajuste	11,1106	10			
Erro puro	0,1305	2			
Total	156,6398	16			

$R^2 = 0,9282$

F calc./F tab. = 11,9

O modelo estatístico que representa a relação entre as variáveis massa de proteína total (P), temperatura (T), relação sólido:solvente (R) e pH, obtido para o extrato bruto de farelo de trigo fermentado, usando água como líquido extrator, é apresentado na Equação 5.1.

$$P = 24,24 - 0,77.(T) + 1,61.(R) - 0,56.(R)^2 + 2,54.(pH) + 0,39.(pH)^2 - 0,52.(T*R) - 0,73.(T*pH) \quad (5.1)$$

A análise da variância para a massa de proteína total dos extratos brutos obtidos do bagaço de cana de açúcar usando água como líquido extrator é apresentada na Tabela 5.16.

Tabela 5.16. Análise de variância das respostas massa de proteína total para os extratos brutos obtidos do bagaço de cana de açúcar fermentado usando água como líquido extrator.

	SQ	GL	MQ	F calc.	F (0,95,-5,-9)
Regressão	12,06	4	3,015	5,25	3,26
Resíduos	6,88655	12	0,574		
Falta ajuste	5,66881	10			
Erro puro	1,21774	2			
Total	18,94614	16			

R = 0,7978 F calc./F tab. = 1,61

O modelo estatístico que representa a relação entre as variáveis massa de proteína total (P), temperatura (T), relação sólido:solvente (R) e pH, obtido para o extrato bruto do bagaço de cana de açúcar fermentado, usando água como líquido extrator, é apresentado na Equação 5.2.

$$P = 8,41 + 0,52.(T) + 0,15.(T)^2 + 0,09.(R) - 0,28.(R)^2 + 0,43.(pH) + 0,10.(pH)^2 + 0,24.(T*R) + 0,03.(T*pH) - 0,66.(R*pH) \quad (5.2)$$

Um modelo estatístico para ser válido deve possuir uma correlação elevada e uma relação entre o F calculado e F tabelado superior a 4 vezes. Na Tabela 5.14 pode-se verificar que estas condições foram satisfeitas ao nível de 95% de confiança, sendo que a relação de F calculado e F tabelado foi de 11,90, levando em consideração apenas os efeitos que foram significativos, e o coeficiente de determinação 0,92824 validando assim os parâmetros de estudo. Obteve-se então o modelo quadrático que representa o comportamento da massa de proteína total dentro de uma determinada faixa de temperatura, pH do meio e relação sólido:solvente. Já na Tabela 5.15 pode-se visualizar que estas condições não foram alcançadas, pois a relação do F tabelado com o F calculado foi de 1,61, mesmo nestas condições, obteve-se o modelo quadrático, pois mesmo a relação sendo menor o F calculado foi superior ao calculado, validando assim os parâmetros neste tipo de processo de

fermentação em estado sólido, pois este processo é complexo devido a alguns fatores como a heterogeneidade do meio e dificuldade no controle de algumas variáveis.

As Figuras 5.5 e 5.6 apresentam as superfícies de respostas obtidas neste estudo. Na Figura 5.5, (a) e (b) observa-se que diminuindo a temperatura e aumentando o pH do meio a massa de proteína total extraída aumenta, já em (c) e (d) observa-se que se o pH é alto e a relação sólido:solvente diminui a massa de proteína extraída é elevada, (e) e (f) indicam que uma maior massa de proteína total é obtida quando se diminui a relação sólido:solvente (1:15 a 1:18) e se aumenta o pH (9).

Na Figura 5.6, (a) e (b), pode se observar que para o substrato bagaço de cana de açúcar a massa de proteína total extraída aumenta diminuindo a relação sólido:solvente e aumentando a temperatura, enquanto que em (c) e (d) observa-se que se a temperatura e o pH forem aumentados ocorre um pequeno aumento na massa de proteína total extraída, enquanto que em (e) e (f) a relação entre as variáveis pH e razão sólido:solvente não indica uma única região onde a massa de proteína total é maior.

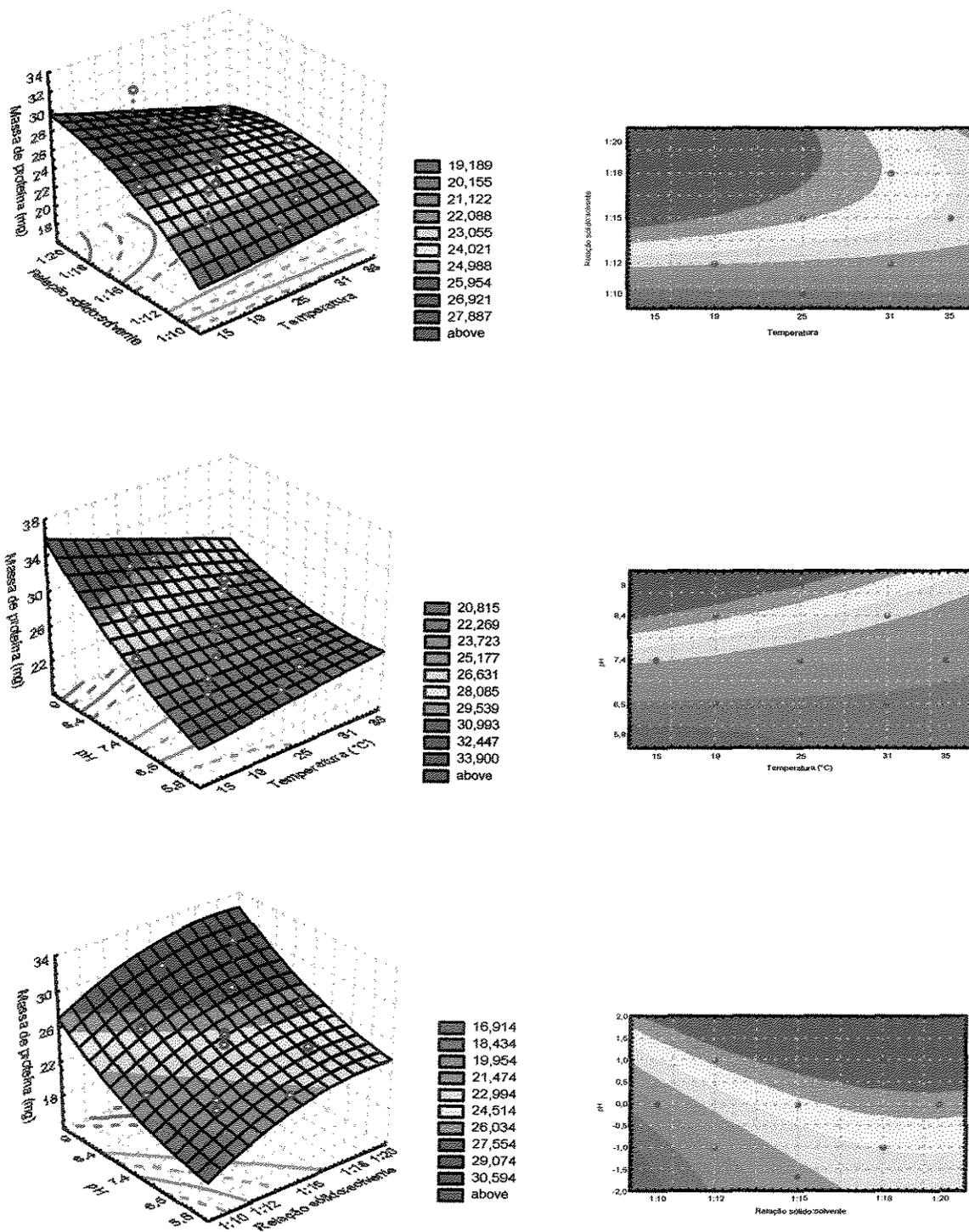


Figura 5.5: Superfícies de respostas para a massa de proteína total do trigo em função da (a,b) temperatura e relação sólido:solvente (c,d) temperatura e pH (e,f) relação sólido:solvente e pH.

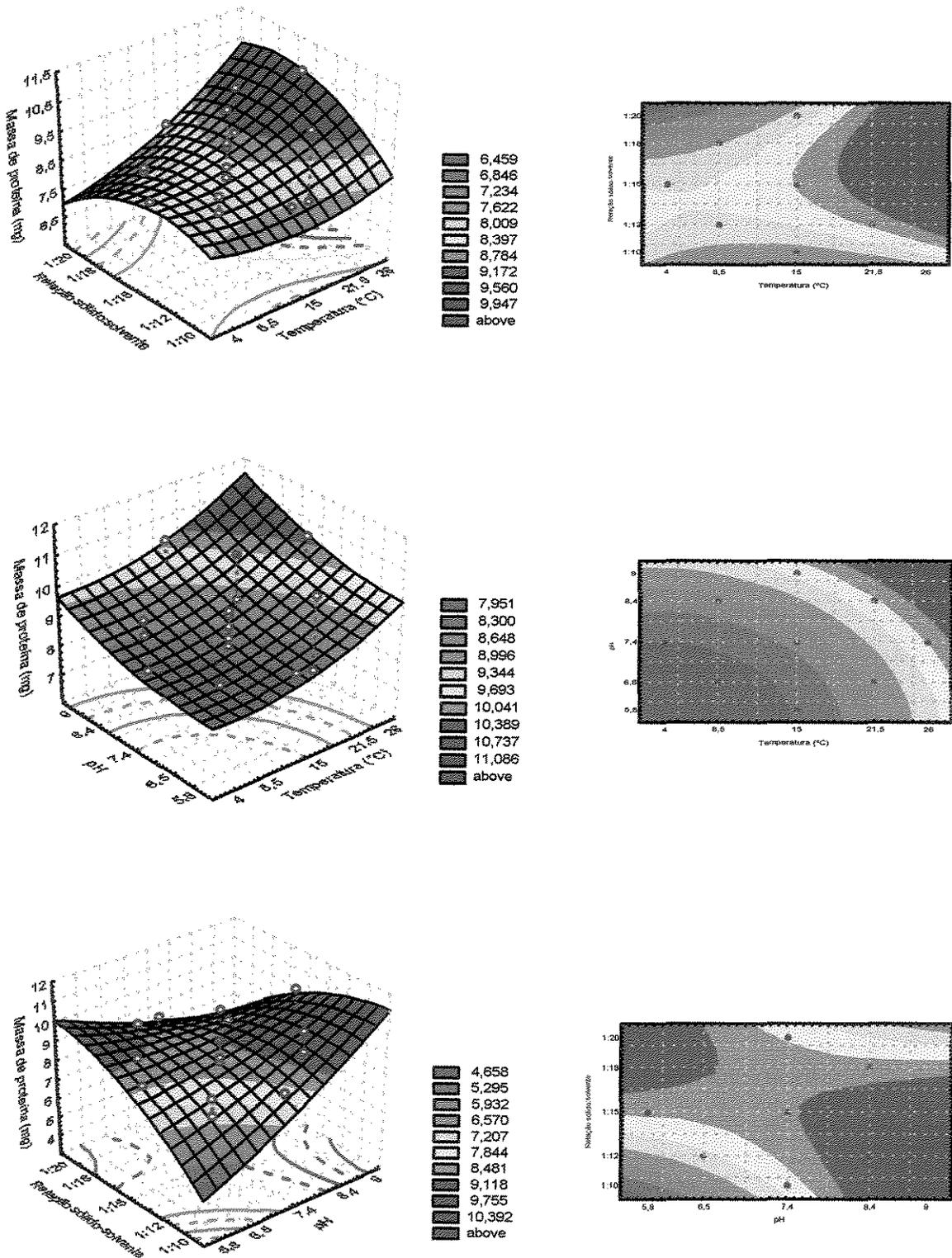


Figura 5.6: Superfícies de respostas para a massa de proteína total do bagaço de cana de açúcar em função da (a,b) temperatura e relação sólido:solvente (c,d) temperatura e pH (e,f) relação sólido:solvente e pH.

Analisando-se esses resultados e considerando a natureza dos soluto (proteína), no processo de extração, tem-se que para o farelo de trigo o direcionamento estatístico indicado para o nível da variável pH que conduz às maiores massas de proteína no extrato envolve pH's maiores que 9,0. Apesar das maiores produtividades em biomassa no processo de FES serem obtidas a pH's próximos à 9,0 (Hasan, 2000), considera-se que maiores níveis dessa variável representa condições muito drásticas para que as proteínas livres se mantenham estáveis nas soluções dos extratos. Por outro lado, relações sólido:solvente menores que 1:18, representam extratos muito diluídos, o que economicamente seria indesejável.

No caso do bagaço de cana, as maiores massas foram obtidas nos extremos da faixa de pH estudada, quando se variou a razão sólido:solvente, e às maiores temperaturas. Considerando-se que maiores temperaturas podem comprometer as proteínas, e os extremos da razão sólido: solvente representam ou soluções muito diluídas ou com pouco líquido o contato do líquido torna-se limitado, nessas condições as limitações físicas do sistema não justificam a continuidade dos experimentos para a otimização dos níveis das variáveis operacionais. Porém a proposição de um modelo estatístico que relacione as variáveis operacionais com a massa de proteínas no extrato, representativo das melhores condições operacionais das variáveis dentro das limitações do sistema físico em questão, será útil para aplicações do processo.

Tendo em vista que a produtividade da FES expressas em mg de proteína total por grama de sólido fermentado seco usando o farelo de trigo como substrato é bem maior que a do bagaço de cana, e que os extratos obtidos do farelo de trigo nas várias condições operacionais contêm maiores quantidades de proteínas, as etapas seguintes do trabalho foram feitas somente com o farelo de trigo.

### 5.3- EXTRAÇÃO CONTÍNUA EM LEITO FIXO

#### 5.3.1. Tempo de Residência e Dispersão Axial

Para a caracterização do leito de substratos através do tempo de residência e dispersão axial do solvente, os experimentos foram conduzidos conforme descrito no item 4.7.1, usando a proteína padrão BSA. A Tabela 5.17 mostra os resultados de concentração de BSA com o tempo.

Tabela 5.17. Resultados da concentração de proteína (BSA) para o cálculo do tempo de retenção e a dispersão axial do solvente na coluna.

Tempo (s)	Concentração (mg/mL)	dt	c*t*dt	c*dt	c*t <sup>2</sup> *dt
20	0,104	10	2,08 x 10 <sup>1</sup>	1,04	4,16 x 10 <sup>2</sup>
30	0,128	10	3,85 x 10 <sup>1</sup>	1,28	1,15 x 10 <sup>3</sup>
40	0,302	10	1,21 x 10 <sup>2</sup>	3,02	4,84 x 10 <sup>3</sup>
50	0,409	10	2,05 x 10 <sup>2</sup>	4,09	1,02 x 10 <sup>4</sup>
60	0,453	10	2,72 x 10 <sup>2</sup>	5,53	1,63 x 10 <sup>4</sup>
70	0,411	10	2,88 x 10 <sup>2</sup>	4,11	2,01 x 10 <sup>4</sup>
80	0,334	10	2,67 x 10 <sup>2</sup>	3,34	2,14 x 10 <sup>4</sup>
90	0,263	10	2,37 x 10 <sup>2</sup>	2,63	2,13 x 10 <sup>4</sup>
100	0,227	10	2,27 x 10 <sup>2</sup>	2,27	2,27 x 10 <sup>4</sup>
110	0,191	10	2,10 x 10 <sup>2</sup>	1,91	2,31 x 10 <sup>4</sup>
120	0,156	10	1,88 x 10 <sup>2</sup>	1,56	2,25 x 10 <sup>4</sup>
130	0,138	10	1,79 x 10 <sup>2</sup>	1,38	2,33 x 10 <sup>4</sup>
140	0,118	10	1,65 x 10 <sup>2</sup>	1,18	2,31 x 10 <sup>4</sup>
150	0,117	10	1,75 x 10 <sup>2</sup>	1,17	2,62 x 10 <sup>4</sup>
160	0,114	10	1,83 x 10 <sup>2</sup>	1,14	2,93 x 10 <sup>4</sup>
$\Sigma = 1,5 \times 10^2$			$\Sigma = 1,78 \times 10^3$	$\Sigma = 3,47 \times 10^1$	$\Sigma = 2,66 \times 10^5$

Como o Momento 1 é igual ao tempo de retenção temos que:

$$\mu_1' = tr = \frac{\sum_{i=1}^n c(t)tdt}{\sum_{i=1}^n c(t)dt} = 8,01 \times 10^1$$

Portanto, o tempo de retenção calculado de 80 s é o tempo necessário para que o solvente passe através da coluna de extração.

Para o cálculo do coeficiente de dispersão axial em leito fixo, considerou-se os seguintes dados para o sistema:

Área da coluna – 19,63 cm<sup>2</sup>

Vazão de solvente - 2 cm<sup>3</sup>/s

Velocidade do solvente – 0,101 cm/s

Altura do leito na coluna – 13 cm

Com esses dados, a variância, que é a razão do momento 2 pelo quadrado do momento 1, foi calculada pelas Equações 6 e 7, considerando que não há adsorção da proteína no sólido. Obteve-se o valor 1,2, que foi usado para o cálculo do coeficiente de dispersão axial do sistema,  $D_{ax}$ :

$$D_{ax} = \frac{\delta \cdot v_{t0} \cdot H}{2} = 7,878 \times 10^{-5}$$

A ordem de grandeza,  $10^{-5}$ , do valor obtido para a dispersão axial na coluna de leito fixo é maior do que encontrados na literatura, da ordem de  $10^{-7}$  característicos de leitos empacotados usados convencionalmente em processos como os de cromatografia. Tendo em vista a complexidade do sistema e a heterogeneidade das partículas provenientes do farelo de trigo fermentado que não favorecem o empacotamento uniforme do leito, o coeficiente de dispersão obtido pode ser considerado representativo da dispersão do solvente (água) no leito

fixo de substrato, porém indicativo da presença de caminhos preferenciais decorrentes do crescimento não uniforme da biomassa no leito.

A Figura 5.7 apresenta o gráfico da concentração de proteínas com o tempo, no qual a largura do pico representa a influência da dispersão axial da água no leito.

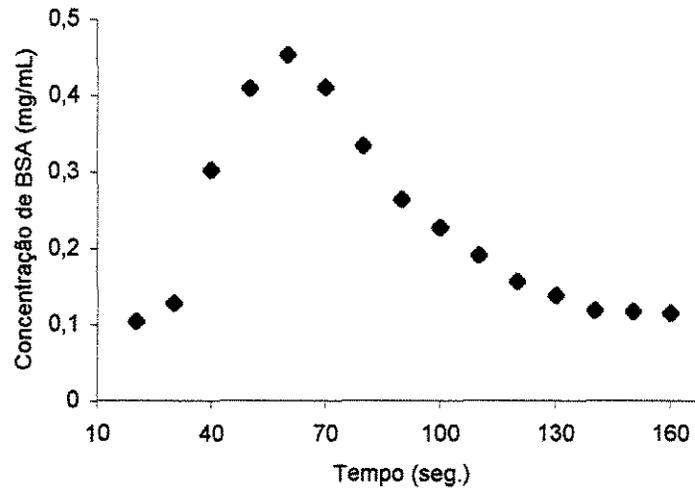


Figura 5.7. Representação gráfica da concentração de BSA na saída da coluna versus o tempo em segundos.

### 5.3.2. Coeficiente Global de Transferência de Massa Sólido-Líquido

Para a determinação do coeficiente global de transferência de massa sólido-líquido, os experimentos e a análise dos resultados foram feitos conforme descrito no item 4.7.2.

A Tabela 5.18 apresenta os resultados das análises da concentração de proteína total,  $C_{AS}$ , nas amostras coletadas na base da coluna no decorrer do tempo. O valor de  $C_{AS}$ , a máxima concentração obtida no extrato, foi calculado como a concentração cumulativa ( $C_A^*$ ), ou seja a soma das concentrações em todas as amostras coletadas.

Tabela 5.18: Concentração de proteína total (CA e CA\*) na solução extraída com água do farelo de trigo fermentado

X – Tempo (min)	C <sub>A</sub> (Kgmol/m <sup>3</sup> )	C <sub>A</sub> * (Kgmol/m <sup>3</sup> )	Y – ln (C <sub>A</sub> * - C <sub>A</sub> / C <sub>A</sub> *)
1,5	1,1653	1,1653	0,8526
11,5	0,5289	1,6942	1,7963
21,5	0,1856	1,8798	2,595
31,5	0,0759	1,9557	3,2898
41,5	0,0041	1,9598	3,345

A Figura 5.8, apresenta o gráfico obtido partir desses dados experimentais, tendo como coordenadas os tempos no qual foram recolhidas as amostras e a variável  $Y = \ln (C_A^* - C_A / C_A^*)$ . Pode-se observar o bom ajuste linear obtido com os dados experimentais, com coeficiente de correlação 0,9371. Do coeficiente angular da reta,  $K_{La}/1-\epsilon$ , o valor de  $K_{La}$  determinado para o sistema considerando a porosidade do leito 0,4 é:

$$K_{La} = 0,03888$$

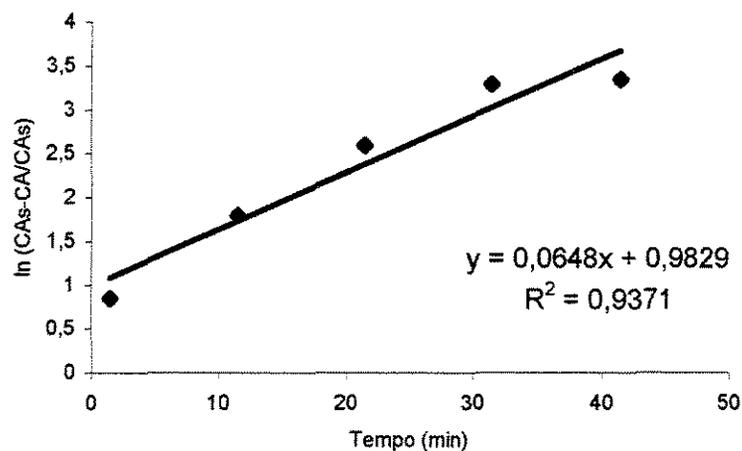


Figura 5.8. Ajuste linear dos pontos, para obtenção da equação da reta e seu coeficiente angular  $K_{La}/1-\epsilon$ .

Com o valor de  $K_L a / 1 - \varepsilon = 0,0648$  experimental, calcula-se a concentração teórica de proteína na solução ponto a ponto, os resultados estão apresentados na Tabela 5.19 e Figura 5.9.

Tabela 5.19: Concentração teórica de proteína no solvente

Tempo (min)	$C_A$ teórico (Kgmol/m <sup>3</sup> )
1,5	0,1881
11,5	1,0672
21,5	1,5270
31,5	1,7675
41,5	1,8933

Na Figura 5.9, é apresentada a curva representativa dos valores das concentrações calculadas pela Equação 3.4, usando o  $K_L a$  determinado pelo modelo, e os dados experimentais obtidos. Pode-se observar que para tempos menores, no início do processo, os valores experimentais se distanciam dos estimados pelo modelo de difusão usado. Observa-se também que os valores experimentais são bem maiores que os calculados. Porém, para tempos maiores, observa-se uma tendência de ajuste do modelo aos dados experimentais. Isso deve-se provavelmente à remoção da biomassa situada nos interstícios do sólido, na região mais distante da superfície da partícula, durante a etapa de homogeneização que precede a alimentação dos sólidos na coluna. Devido à natureza do micélio, a camada formada nessa região é espessa porém pouco densa, o que a torna frágil e de fácil remoção. Nessas condições, o material sólido que constitui o leito contém além da biomassa associada ao substrato, também a biomassa livre, a qual é facilmente lavada e solubilizada na solução extratora nos tempos iniciais do processo de percolação. Para tempos maiores, a biomassa solubilizada no extrato corresponde àquela associada à superfície do sólido, a qual obedece ao modelo de difusão externa à partícula.

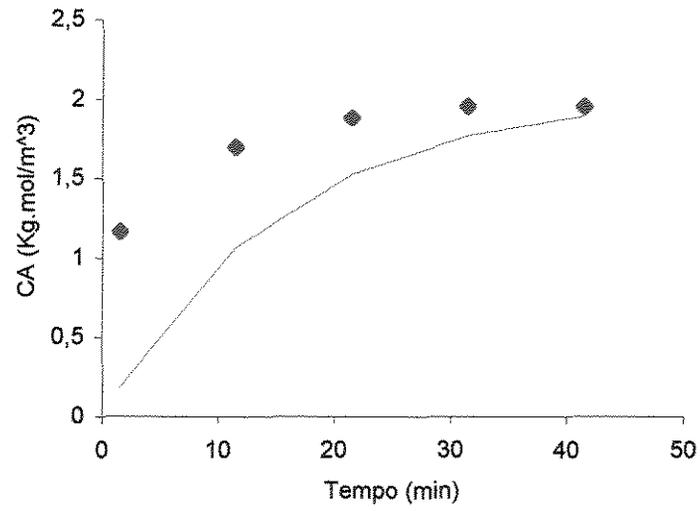


Figura 5.9: Valores de  $C_A$  experimental (◆) e  $C_A$  teórico (■)

## 6- CONCLUSÕES

Através da análise dos dados experimentais obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- os melhores resultados de produtividade foram obtidos para o farelo de trigo 23,59 mg de proteína/mgs, seguido do bagaço de cana de açúcar 8,33 mg de proteína/mgs, para qualquer condição de concentração inicial de inóculo ( $C_0$ ) e pH inicial do meio.

- os melhores resultados de massa de proteína total tanto para o bagaço de cana de açúcar como para o farelo de trigo foram alcançados utilizando-se como líquido extrator a água.

- com o estudo dos efeitos das variáveis no planejamento de Plackett Burman pode-se observar que o parâmetro inibidor de protease não foi significativo para os dois substratos, quando se utilizou o líquido extrator água. Já os parâmetros temperatura de contato, pH do meio, relação sólido:solvente foram significativos em todas as respostas.

- as análises de superfícies de respostas permitiram verificar que, para aumentar a massa de proteína total no extrato de farelo de trigo fermentado e bagaço de cana de açúcar deve-se diminuir a relação sólido:solvente e aumentar o pH.

- a região dos valores das variáveis, que resultou em maior massa de proteína total do farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar fermentado, está localizada entre o pH 8,35 e 9, e entre a relação sólido:solvente de 1:15 e 1:18,

- o tempo de retenção, ou seja, o tempo necessário para o solvente (água à 30°C e pH 9,0) passar pela coluna com uma altura de leito de 13 cm a uma vazão de 2 mL/s, é 80 s.

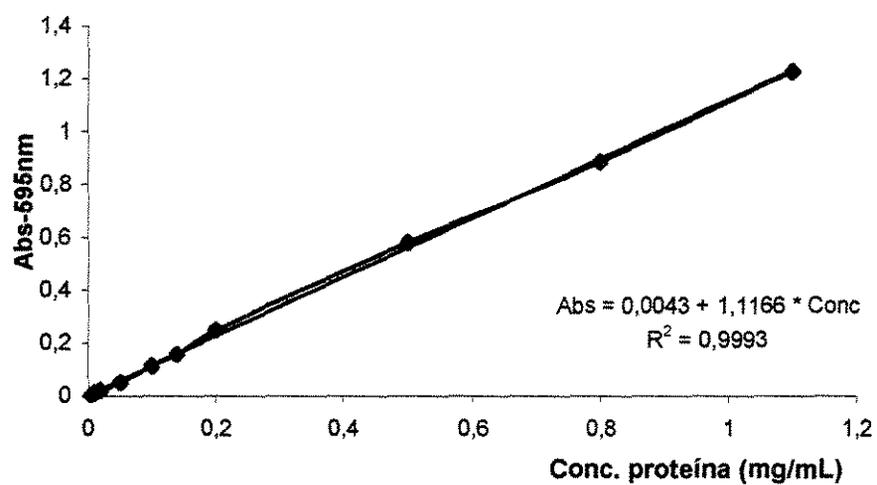
- a dispersão axial do solvente na coluna empacotada, com uma altura de leito de 13 cm de farelo de trigo à uma vazão do solvente (água à 30°C e pH 9,0) é de  $7,878 \times 10^{-5}$

- o coeficiente de transferência de massa na coluna empacotada com farelo de trigo fermentado, considerando a porosidade do leito ( $\epsilon$ ) igual a 0,4 é  $0,03888 \text{ s}^{-1}$ .

## **7- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Caracterização da alergenicidade dos extratos por “dot blotting” e “immunoblotting”
- Testar outros tipos de técnicas de lixiviação, a fim de comparar a eficiência dos processos.

## 8- ANEXO



Anexo1. Curva padrão do BSA, utilizada para cálculos da concentração de proteína total pelo Método de Bradford.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUNSTRUP, K. Production, isolation e economics of extracellular enzymes. **Appl. Biochem. Bioeng.** v.2, p.27-69.
- BASOMBA, A. Situación actual del empleo de antígenos en alergia. In: **Purificación y Estandarización de alérgenos**; Madri, 1982.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp. Campinas, SP, 1995.
- BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. **Tecnologia das Fermentações**, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda – USP, 1975.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. & HUNTER, J.S. Statistics for Experimenters – An Introduction to Design, **Data Anilysis and Model Building**. Jonhn Wiley & Sons, N. Y., 1978.
- BRADFORD, M. M. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248, 1976.
- CANNEL, E. & MOO-YOUNG, M. Solid-state Fermentation systems. **Process Biochemistry.** v.15, p.24-28, 1980a.
- CANNEL, E. & MOO-YOUNG, M. Solid-state Fermentation systems. **Process Biochemistry.** v.15, p.2-7, 1980b.
- CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. **Grain Storage**. University of Minnesota Press Minneapolis, 1968, 202p.

- COSTA, J.A.V. Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. **Tese de doutorado, UNICAMP**, 1996.
- CROCE, J. ; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; ZUPPI, L.J. Provocation of asthma by non-sporulating molds. In: Kobayashi, S. & Bellanti, J. A. eds. *Advances in Asthology*. Amsterdam, **Excerta Médica**, p. 401-404, 1990.
- DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid Substrate Cultivation**. Elsevier Science Publishers. England, 1992, 466p.
- FEINBERG, S. M. & LITTLE, H. T. Mould Allergens: Its importance in Asthma and hay fever. **Wis Med. J.** v.34, p. 254, 1935.
- FERNÁNDEZ-LAHOPE, H. M.; FRAILE, E. R.; CASCONO, O. Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. **J. of Biotechnology**. v.62, p.83-93, 1998.
- GAMBALE, W.; PURCHIO, A.; CROCE, J. Systematic isolation of the Genus *alternaria* in the atmosphere of the Grande São Paulo area (Brasil). **Allergol. Immunopathol.** v.4, p. 139, 1976.
- GAMBALE, W.; PURCHIO, A., CROCE, J. Flora Fúngica Anemófila da Grande São Paulo. **Rev. Microbiol.** v.8, p.74-79, 1977.
- GAMBALE, W.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. Periodicidade diária de fungos anemófilos na cidade de São Paulo, Brasil, **Rev. Microbiol.** V. 12, p. 177-81, 1981.
- GAMBALE, W.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. Influência de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de São Paulo, Brasil, **Rev. Microbiol.** V. 14, p. 204-14, 1983.

- GAMBALE W.; PURCHIO, A.; CROCE, J.; PAULA, C. R.; CORREA B. Provocation of Asthma by non sporulative molds (*Mycelia sterlia*). **Rev. Iberica de Micologia**. v. 5, p. 53, 1988.
- GEANKOPLIS, C. J. **Transport Processes and Unit Operations**. Second Edition, 1983.
- GUTIERREZ ROJAS, M.; HUERTA-OCHOA, S.; ULIBARRI, R. L.; CASTANEDA, G. S.; TORREZ, E. F.; GONZALEZ, G. V. **Solid State Fermentation in Bioconversion of Agro-Industrial Raw Materials**. França: l'Imprimiere ARTI à Nimes. 1992, 143 p.
- HASAN, S.D.M., Saraiva, C.P., Zollner, R.L. and Santana, M.H.A, Produção e caracterização de proteínas imunoterápicas da biomassa de *Drechsler (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido, submetido à publicação nos anais do Simpósio Nacional das Fermentações, 2000.
- HORNER, W. E.; HELBLING, A.; SAVAGGIO, J. E.; LEHRER, S. B. Fungal Allergens. **Clin. Microbiol. Rev.** v.8, p.161-78, 1995.
- KUMAR, P. K. R.; LONSANE, B. K. Gibberellic acid by solid-state fermentation: consistent and improved yields. **Biotechnol. Bioeng.** V.30, p.267-271, 1987a.
- KUMAR, P. K. R.; LONSANE, B. K. Extraction of Gibberellic Acid from Dry Mouldy Bran Produced under Solid State Fermentation. **Process Biochemistry.** v. 22, p.139-143, 1987c.
- KUMAR, P. K. R.; LONSANE, B. K. Microbial production of gibberellic: State of Art. **Adv. Appl. Microbiol.** v.34, p. 29-139, 1989.
- LACAZ, C. S. **Micologia Médica**. São Paulo, editora Sarvier, 1991.

- LONSANE, P. K.; GHILDYAL, N. P.; BUBIATMAN, S. & RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme fermentation system**. v.7, p.258-265, 1985.
- MENEZES, E. A., Avaliação Bioquímica, Antigênica e Alergênica de Extratos Brutos de *Helminthosporium monoceras*. São Paulo, 1992. [Dissertação de Mestrado Inst. de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- MENEZES, E. A.; GAMBALE, W.; MACEDO, S. M.; ABDALLA, D. S. P.; PAULA, R. C. ; CROCE, J. Biochemical antigenic and allergenic characterization of crude extracts of *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. **Mycopathol**. v.131, p.75-81, 1995.
- MOHOVIC, J.; GAMBALE, W.; CROCE, J. Cutaneous positivity in patients with respiratory allergens to 42 allergenic extracts of air borne fungi isolated in São Paulo, Brasil. **Allergol. Immunopathol**. v. 16, p. 397-402, 1988.
- NAKANISHI, K.; YAMAMOTO, S.; MATSUNO, R. Analysis of Dispersion Mechanism in Gel Chromatography. **Agric. Biol. Chem**. v.41, p.1465-1477, 1977.
- NELSON, H. Diagnostic procedures in allergy. I. Allergy Skin Testing. **Ann. Allergy**. v. 51, p. 411-17, 1983.
- PANDEY, A. & RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**, v.14, p.486-488, 1992.
- PHARMACIA BIOTECH. Expanded Bed Adsorption Principles and Methods
- PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. **J. Agric. Food Chem**. v.25, p.1268-1273, 1977.

- PRINCE, H. E.; Mold fungi in the etiology of respiratory allergy diseases. Immunological studies with mold extracts. Skin tests with broth and washings from mold pellicles. **Ann. Allergy**, v. 2, p. 500-4, 1944.
- RAMESH, M. V. & LONSANE, B. K. A novel bacterial thermostable alpha-amylase system produced under state fermentation. **Biotechnol. Lett.** v.9, p.501-504, 1987a.
- RAMESH, M. V. & LONSANE, B. K. Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid state fermentation system. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.33, p.501-505, 1990.
- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**, v.1, Pelotas: Editora Universitária-UFPel, 1996, 344p.
- RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI, F. Planejamento Fatorial e “Screening Design” como Ferramenta para Otimização de Pcessos Bioquímicos. **Anais XII SINAFERM**, Seção Técnica C2, Uberlândia, agosto de 1998.
- SALES, A. M.; SALVA, T. J. G.; MENEZES, T. J. B. Incorporação de Biomassa Fúngica em Resíduos Agroindustriais por fermentação Submersa. **Coletânea ITAL**, Campinas, 17(2), p. 141-146, 1988.
- SALVAGGIO, J. & AUKRUST, L. Mold induced asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.68, p. 327-346, 1981.
- TREYBAL, R.W. **Mass-Transfer Operations**. Kin Keong Printing Co. Ltd, Singapore, p.737-765, 1981.
- VAN DER WERF, P. J.; Mould fungi in Bronchial asthma. H. E. Sterfert Kroese, N. V. Leiden, 1958.

WORTMAN, F. Diagnostico y tratamiento de las alergias de Tipo I producidas por los esporas fungicas. In: **Reacciones inmunologicas frente a los antigenos fungicos**. Division de alergia, Merck-Igoda, Espana, v. 4, p. 43, 1982.

YUGINGER, J. W.; JONES, R. T.; NESHEIM, M. E.; GELLER. M. Studies on *Alternaria* allergens III. Isolation of a major allergenic fraction (alt-I). **J. Allergy Clin. Immunol.** v.66, p. 138-147, 1980.

YUNGINGER, J.W. Allergens: recent advances. **Pediatric. Clin. N. Ann.** V. 35, p. 981-93, 1988.