

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E
INFORMÁTICA

ESTUDO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA BROMELINA POR MICELAS REVERSAS EM SISTEMA DESCONTÍNUO

Autor : Heloísa Maria Pitaro Borracini

Orientador : Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

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

JULHO/ 2006
CAMPINAS – SÃO PAULO

IDADE 28C
CHAMADA 7171 UNICAMP
B645e
EX
VBO BC/ 70045
DC 16.123-06
D X
CO 11,00
A 2.2109106
CPD
Bul ID 387612

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

B645e Borracini, Heloísa Maria Pitaro
Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo / Heloísa Maria Pitaro Borracini.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Elias Basile Tambourgi
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Equilíbrio líquido-líquido. 2. Extração (Química). 3. Biotecnologia. 4. Bromelina. 5. Micelas. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Bromelain extraction process using reversed micelles

Palavras-chave em Inglês: Liquid-liquid extraction, Separation processes, Biotechnology, Bromelain, Reversed micelles

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Ana Maria Frattini Fileti e Ana Paula Brescancini Rabelo

Data da defesa: 26/07/2006

Dissertação de Mestrado defendida por Heloisa Maria Pitaro
Borracini , em 26 de julho de 2006 , e aprovada pela banca constituída pelos
seguintes doutores:



Ana Paula Brescancini Rabelo

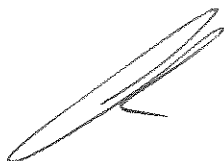


Ana Maria Frattini Fileti



Elias Basile Tambourgi

Esta versão corresponde à final da Dissertação de Mestrado
defendida por Heloisa Maria Pitaro Borracini , em 26 de julho de 2006.



Elias Basile Tambourgi



Dedico:

À minha família que eu tanto amo.

Agradecimentos

A Deus,

A minha família, sempre tão próxima e tão essencial na busca dos meus objetivos.

Ao meu querido orientador, professor Elias Basile Tambourgi, pelo incentivo, dedicação e amizade.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química pelo apoio dispensado para realização desse trabalho.

Aos meus amigos, que direta ou indiretamente contribuíram nessa minha conquista.

A CNPq pelo suporte financeiro.

Resumo

Bromelina é o nome dado a um conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica. Com a necessidade de desenvolver novos processos de purificação e concentração desses compostos, a extração líquido-líquido por micela reversa mostra-se como uma técnica atrativa, pois a micela reversa possui a capacidade de solubilizar biomoléculas específicas de uma solução aquosa, como o extrato bruto do abacaxi.

O objetivo desse trabalho foi estudar a recuperação da enzima bromelina através da técnica de extração líquido-líquido por micelas reversas. Para tanto, utilizaram-se três sistemas micelares distintos formados a partir de BDBAC (agente tensoativo catiônico), AOT (agente tensoativo aniônico) e CTAB (agente tensoativo catiônico).

Foram realizados planejamentos estatísticos com o intuito de realizar uma triagem das variáveis significativas em cada processo. A metodologia de superfície de resposta foi empregada para quantificação dos níveis das variáveis significativas à extração.

No presente trabalho são apresentados estudos da influência conjunta que alguns parâmetros exercem sobre a extração líquido-líquido da bromelina com micelas reversas, nas etapas de extração e re-extração, para fins de caracterização, modelagem e otimização.

Palavras-chaves: Bromelina, micelas reversas, extração.

Abstract

Bromelain is a set of proteolytic enzymes found in vegetables of the *Bromeliaceae* family, from which pineapple is known more. Bromelain has several uses, all based on its proteolytic activity. There is the necessity to develop new processes for purification and concentration of these compounds, the liquid-liquid extraction by reversed micelles reveals as one attractive technique, therefore it has had the specific capacity of getting soluble biomolecules of an aqueous solution, as the crude extract of the pineapple.

This is a study on the recovery of bromelain through liquid-liquid extraction by reversed micelles. Three distinct micellar systems formed from BDBAC (cationic surfactant), AOT (anionic surfactant) and CTAB (cationic surfactant) were employed.

Statistical designs were used to select the most significant variables for each process. Surface response methodology was used to quantify the levels of the significant variables.

In this work systematic studies are performed on the influence that certain parameters have on the recovery of bromelain through liquid-liquid extraction by reversed micelles, concerning forward and back extraction. The goal is the system mathematical characterization and optimization.

Key words: Bromelain, reversed micelles, extraction.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABELAS	5
ABREVIATURAS	6
1. Introdução.....	7
2. Objetivos	9
3. Revisão da Literatura e Fundamentos	10
3.1. Abacaxi.....	10
3.2. Proteínas	11
3.2.1. Desnaturação	11
3.2.2. Enzimas	12
3.2.3. Bromelina	13
3.3. Processos de Recuperação e Purificação de Proteínas	17
3.4. Extração Líquido-Líquido	18
3.4.2. Extração Líquido - Líquido por Micela Reversa.....	18
3.5. Micelas	19
3.5.1. Mecanismo de Formação de Micelas Reversas.....	23
3.6. Partição de Proteínas em Sistemas Micelares	25
3.6.1. Coeficiente de Partição.....	28
3.7. Influência dos Parâmetros do Sistema.....	29
3.7.1. Surfactante.....	29
3.7.2. Solvente Orgânico	32
3.7.3. Sal.....	33
3.7.4. pH.....	34

3.8. Extração	35
3.9. Re-Extração	35
3.10. Métodos Estatísticos	36
3.10.1 Planejamento Fatorial	36
3.10.2 Análise por Superfície de Resposta	38
4. Materiais e Métodos	39
4.1. Preparo das Amostras	39
4.1.1. Preparação da Amostra a Partir do Extrato Bruto	39
4.1.2. Preparo das Soluções Micelares	39
4.1.3. Preparo das Soluções de Re-Extração	39
4.2. Procedimento da Extração e Re-Extração	40
4.2.1. Extração	40
4.2.2. Re-Extração	41
4.3. Métodos Analíticos	42
4.3.1. Determinação de Proteínas	42
4.3.2. Método para a Determinação da Atividade Proteolítica	42
4.4. Metodologia de Cálculo	42
5. Resultados e Discussões	43
5.1 Extração da Bromelina em Batelada com tensoativo AOT	44
5.2 Extração da Bromelina em Batelada com tensoativo CTAB	46
5.3 Extração da Bromelina em Batelada com tensoativo BDBAC	51
5.3 Otimização do Processo de Extração em Batelada da Bromelina por Micela Reversa do Tensoativo BDBAC	56
6. Conclusões	63
7. Bibliografia	65

APÊNDICE A	74
Descrição do método para determinação de proteínas totais - Método de Lowry (1951)	74
APÊNDICE B.....	75
Descrição do método para a determinação da atividade proteolítica – Caseína	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Representação esquemática do tensoativo e das estruturas micelares em diferentes solventes.	20
Figura 3.2: Mecanismo de Formação de Micelas Reversas (Adaptado de Dungan et al., 1991).....	24
Figura 3.3: Representação esquemática de uma proteína englobada por uma micela reversa.....	26
Figura 3.4: Representação esquemática da localização de proteínas em micelas reversas. a) proteína hidrofílica; b) proteína de interface; c) proteína hidrofóbica.....	27
Figura 3.5- Diagrama de fases para o sistema AOT/água/isooctano, com as várias estruturas possíveis para os agregados.	30
Figura 4.1 - Representação esquemática da etapa de extração da bromelina por micelas reversas.	40
Figura 4.2 - Representação esquemática da etapa de re-extração da bromelina por micelas reversas.	41
Figura 5.1 - Gráfico de Pareto para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico CTAB.	48
Figura 5.2 - Gráfico das superfícies de resposta para análise dos fatores que influenciam a extração batelada da bromelina com tensoativo catiônico CTAB.....	49
Figura 5.3 - Gráfico de Pareto para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.	53
Figura 5.4 - Gráfico das superfícies de resposta para análise dos fatores que influenciam a extração batelada da bromelina com tensoativo BDBAC.....	54
Figura 5.5 - Gráfico de Pareto para otimização da extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.....	58
Figura 5.6 - Gráfico das superfícies de resposta para otimização da extração em batelada da bromelina com tensoativo catiônico BDBAC.	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial para a extração da Bromelina com tensoativo aniônico AOT.	44
Tabela 5.2 – Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para extração da Bromelina em batelada com tensoativo aniônico AOT e resposta (Fator de Purificação- FP) após a reextração.	45
Tabela 5.3 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial para a extração da Bromelina com tensoativo catiônico CTAB.	46
Tabela 5.5 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial fracionário 2^{5-1} para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.	51
Tabela 5.6 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC e resposta (Fator de Purificação- FP) após a reextração.	52
Tabela 5.7 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial 2^3 com face centrada para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.	56
Tabela 5.8 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central para extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC e resposta (Fator de Purificação- FP) após a Reextração.	57
Tabela 5.9 – Efeitos para otimização da extração em batelada da bromelina por micela reversa de BDBAC.	59
Tabela 5.10 – Parâmetros da Análise de Variância (ANOVA) para Fator de Purificação	59
Tabela 5.11 – Tabela comparativa entre os valores de Fator de Purificação determinados experimentalmente e calculados pelo modelo encontrado.	60

ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

AOT – di-octil sulfosuccinato de sódio

AP – Porcentagem de atividade enzimática recuperada

BDBAC – cloreto de benzil dodecil bis(hidroxietil) amônio

BSA – “Bovine serum albumine”; albumina de soro bovina

CMC – Concentração micelar crítica

CTAB – Brometo de cetiltrimetil amônio

D - dados experimentais

DSP – “Downstream Processing”, recuperação de produtos biotecnológicos

FP – Fator de Purificação

PEG- Polietileno Glicol

MQE – Média quadrática dos erros

Nag – Número de moléculas de tensoativos agregadas na micela

PT - Porcentagem de proteína total recuperada

pI – Ponto isoelétrico

Rm – Raio micelar

SQE - Soma quadrática dos erros

SQP - Soma quadrática dos pesos

TOMAC – Cloreto de trioctilmetil amônio

Wo – “Water in oil”, quantidade de água presente no interior da micela

1. Introdução

A Bromelina é um conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. Ela apresenta diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc.

Com a necessidade de desenvolver novos processos de purificação e concentração desse composto, a extração líquido-líquido por micela reversa mostra-se como uma técnica atrativa, pois possui a capacidade de solubilizar biomoléculas específicas de uma solução aquosa, como o extrato bruto do abacaxi.

Essa técnica baseia-se na propriedade que os agentes tensoativos tem de auto-organizar-se quando em solução. Quando em um meio apolar, as micelas apresentam sua orientação inversa em relação à formação da estrutura micelar em água.

Apesar do interesse de vários grupos de pesquisa em desenvolver e aplicar a técnica de extração por micelas reversas para separação e purificação de enzimas sabe-se que o processo pode ser modificado por um grande número de variáveis que alteram a solubilização da proteína. As variáveis mais importantes são aquelas que regulam as interações entre as proteínas e os outros componentes formadores das micelas reversas. São o pH, a força iônica do meio e outras variáveis que definem a forma e tamanho das micelas reversas, como por exemplo, a concentração do agente tensoativo.

Assim, devido ao grande número de variáveis importantes para o processo de extração por micela reversa, o uso de ferramenta estatística com a utilização de planejamentos experimentais, torna-se de extrema importância para identificação da significância de cada variável do processo estudado.

Neste trabalho, foram estudados três diferentes tensoativos (AOT, BDBAC e CTAB) variando-se os seguintes itens que atuam sobre o rendimento da

extração líquido-líquido da bromelina por micela reversa: pH de extração e re-extração, concentração do tensoativo, concentração do solvente e co-solvente e concentração do sal.

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho é estudar a recuperação da bromelina, presente na polpa do abacaxi, através de sistemas micelares (micelas reversas) em operação descontínua.

Com os estudos realizados pretende-se:

- ✓ Determinar a influência do pH, força iônica e concentração do tensoativo, em estudos de batelada.
- ✓ Comparar os três tensoativos estudados (AOT, BDBAC e CTAB) e melhores condições para extrair a bromelina do suco obtido a partir da polpa do abacaxi através do sistema de micelas reversas.

3. Revisão da Literatura e Fundamentos

3.1. Abacaxi

O abacaxizeiro é uma planta muito sensível ao frio, mas resiste bem à seca. Exige, por isso, clima quente ou mesotérmico, onde não há perigo de ocorrência de geadas. A temperatura média favorável situa-se entre 21 a 27°C. Quando a temperatura se mantém acima de 32°C, verificam-se danos à planta devido à transpiração excessiva, quando a temperatura cai abaixo de 20°C, a planta entra em estado de inatividade (Medina, 1978).

As colheitas das frutas de um abacaxizal não podem ser feitas por meios mecânicos, pois as frutas não amadurecem todas ao mesmo tempo. No Brasil, o trabalho de colheita geralmente é feito com auxílio de um facão, com o coletor tendo as mãos protegidas por luvas de lona grossa. Enquanto com a mão esquerda segura o fruto pela coroa, com a direita secciona, com o facão, a haste a 5-6 cm abaixo da fruta.

O abacaxi apresenta uma variação muito grande na sua composição química, de acordo com a época em que é produzido. De modo geral, a sua produção ocorre no verão, sendo sua colheita uniformizada através da indução química do seu florescimento. Neste caso, as frutas apresentam maior teor de açúcares e menor acidez. Por outro lado, as frutas produzidas fora de época, ou seja, as frutas temporãs, apresentam alta acidez e baixo teor de açúcares, visto a produção ocorrer nos meses que a temperatura ambiente é baixa.

O valor nutricional do abacaxi depende, principalmente, dos seus açúcares solúveis, das vitaminas e dos sais minerais que contém, uma vez que os teores de proteínas e de lípidos são relativamente baixos. O teor de açúcares varia em geral em torno de 12 a 15%, dos quais aproximadamente 66% são de sacarose e 34% de açúcares redutores. As cinzas, que apresentam 0,4 a 0,6% do peso total, são ricas principalmente em potássio, ao qual seguem o magnésio e o cálcio, geralmente em partes iguais, e essas características permanecem em sua maioria nos resíduos triturados do abacaxi para o processamento da bromelina,

sendo então este resíduo de grande interesse por suas características de alta riqueza nutricional.

3.2. Proteínas

Berzelius cunhou a palavra proteína em 1838, para salientar a importância dessa classe de moléculas. Proteína vem do grego *Proteios*, que significa “o que vem em primeiro lugar”, sendo responsável pelo funcionamento das funções vitais dos organismos animais, nos quais as proteínas são alguns dos principais constituintes.

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células e constituem 50% ou mais de seu peso seco. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada em determinada função biológica diferente.

3.2.1. Desnaturação

Quando uma solução de proteína, como a albumina do ovo, é aquecida lentamente até 60^o ou 70^o C, a mesma torna-se gradualmente leitosa e logo forma um coágulo. Isto é comum já que ocorre quando fervemos ovos em água. A clara do ovo, que contém albumina, coagula pelo aquecimento num sólido branco. Depois que o calor coagulou a clara, esta não sofre redissolução pelo resfriamento, nem forma outra vez uma solução límpida como a original. Portanto, o aquecimento transformou a ovoalbumina e, aparentemente, de forma irreversível. Esse efeito do aquecimento ocorre virtualmente com todas as proteínas, não importando seu tamanho ou função biológica, embora a temperatura exata para provocá-lo varie. A mudança irreversível provocada pelo calor e outros agentes é conhecida como *desnaturação*.

Há outra importante consequência da desnaturação de uma proteína, ela, quase sempre, perde sua atividade biológica característica. Assim, quando uma solução aquosa de uma enzima, por exemplo, é aquecida até seu ponto de

ebulição por uns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica.

A desnaturação de proteínas pode ser provocada não apenas pelo calor, mas também por valores inadequados de pH, por solventes orgânicos, por solutos como a uréia, pela exposição da proteína a alguns tipos de detergentes, pela agitação vigorosa da solução protéica até formação abundante de espuma, presença de certos íons ou sais caotrópicos na solução que contém as proteínas, oxidação, força iônica, entre outros. Cada uma das formas citadas como causa de desnaturação pode ser considerada como tratamento relativamente suave, isto é, a desnaturação pode ocorrer em condições amenas, não há necessidade de ocorrer em condições drásticas. As moléculas de proteína nativa são frágeis e facilmente desorganizadas pelo calor e outros tratamentos aparentemente suaves (Yao et. al., 2002).

3.2.2. Enzimas

A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica foi inicialmente descrita e reconhecida no início do século XIX, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Na década de 50, do século XIX, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos. Ele postulou que esses fermentos, depois nomeados de enzimas, eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, uma hipótese que prevaleceu por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner descobriu que extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até o álcool, provando que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas da estrutura das células vivas. Desde então, numerosos estudos vêm sendo realizados na tentativa do isolamento das numerosas enzimas diferentes e o estudo de suas propriedades catalíticas.

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas. A maioria das moléculas biológicas são muito estáveis no ambiente aquoso de pH

neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação (Lehninger, 1995).

As reações necessárias para digerir alimentos, enviar sinais através de nervos, ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem em velocidade útil sem catálise.

Uma enzima contorna estes problemas fornecendo um ambiente específico dentro do qual uma reação dada é energeticamente mais favorável. A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamado sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada substrato. O complexo enzima-substrato tem papel central na reação enzimática, ele é o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos.

3.2.3. Bromelina

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido.

Rowan et. al. (1990) descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína. A bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos e sua atividade é máxima em pH 8,0 e a temperatura de 70°C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0. A forma da bromelina comercialmente encontrada é a bromelina do talo, apesar da grande quantidade de resíduos de abacaxi fruto proveniente das indústrias de conserva de abacaxi (César, 2005).

As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e têm o número sistemático EC 3.4.22.4 e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem o número sistemático EC 3.4.22.5. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. A bromelina do talo é uma enzima sulfidrílica e este grupamento é essencial para a sua atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6 e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 (Murachi, 1976).

A enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece. Diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto (César, 2005).

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc.

Para a utilização de bromelina, a indústria alimentícia não se apresenta como um mercado atrativo, pois, vem sendo largamente utilizada a papaína no amaciamento de carnes e a grande barreira seria romper o cartel de indústrias

produtoras da enzima, pois o consumidor só compra a carne amaciada ou o amaciante de carnes sem preocupar-se com o princípio ativo do produto. Também, atualmente a África do Sul vem produzindo e exportando papaína a preços sem concorrência a princípio.

A indústria de cervejas, onde a bromelina pode ser usada como clarificante, aboliu a utilização da mesma, alegando que esta enzima produz resíduos de difícil retirada dos tanques de armazenagem do produto.

As preparações de bromelina são impuras e geralmente as principais enzimas contaminantes são outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulasas e outras glicosidases (Murachi, 1976).

Suh et. al. (1992) purificou a bromelina do fruto e do talo até a homogeneidade (18 e 46 vezes de aumento de pureza respectivamente) por cromatografia de gel-filtração e determinou as massas molares em 32.5 e 37 kDa respectivamente, com rendimento de 23% em atividade enzimática total.

César (2000) estudou a extração da bromelina, utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por PEG/sal (fosfato de potássio). Foram obtidos resultados favoráveis e promissores. Obteve-se o coeficiente de partição de aproximadamente 3,9 com pH 9,0, PEG 1500 e concentração de 17,5% PEG e 15% de sal.

César (1999) realizou as análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática de amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para a caracterização do meio inicial. O fruto e talo apresentam o mesmo teor de proteína total, porém o talo apresenta cerca de 60% menor quantidade de enzimas proteolíticas. Foi observado que por meio da precipitação em um estágio com 80% (%v/v) de etanol a 5°C, é possível recuperar praticamente toda a enzima originalmente presente, aumentando de 3 a 5 vezes a atividade específica inicial.

Segundo Baldini et. al. (1993), a bromelina é uma enzima sulfídrica e como característica das enzimas pertencentes a esse grupo, requer grupamentos sulfídricos livres para sua atividade catalítica. Agentes redutores como a cisteína, sulfetos, sulfitos e também cianetos atuam como ativadores da ação enzimática de acordo com diversos autores citados em seu trabalho.

Arroyo-Reyna et. al. (1995) estudaram a desnaturação térmica da bromelina, que é uma proteína globular. Estudos cinéticos da desnaturação da bromelina a uma temperatura constante foram realizadas a pH 3,40. A análise da fração de proteína nativa (fN) mostra que esta varia com o tempo, sendo que a temperaturas elevadas, esta diminui mais rapidamente. Por exemplo, a 30,5°C, fN diminui de 1 a aproximadamente 0,2 em 300 min; a 36,1°C, fN diminui a aproximadamente 0,1 em 300 min; a 42,3°C, fN diminui de 1 a 0 em 150 min e a 46,1°C, fN diminui de 1 a 0 em 50 min. Foram realizadas análises entre 30 e 50°C. Este estudo indica que a desnaturação térmica da Bromelina segue um modelo de dois estados irreversível com cinética de 1ª ordem. Neste estudo a desnaturação é determinada por mudanças na conformação da enzima.

El-Gharbawi e Whitaker (1963) separaram cinco componentes proteoliticamente ativos da bromelina do talo por cromatografia e eletroforese. Esses componentes apresentaram absorbância similar a 280 nm e atividade específica similar em caseína em pH 7. Eles diferem entre outras características, na absorbância a 260 nm e 292 nm, estabilidade térmica e variação na atividade em caseína em diferentes valores de pH. Todos os cinco componentes tiveram aproximadamente a mesma atividade específica em pH 7 (aproximadamente 1,02 ou 1,03). Todos os componentes parecem ter ponto isoelétrico de aproximadamente 9,6.

Segundo Rowan et al (1990) para a azocaseína a atividade específica relativa à bromelina de talo é 1,00 e bromelina do fruto 1,49.

Fossum (1970) comparou diferentes métodos (Kunitz e reação de precipitação da caseína em Agar-Gel) para determinar a atividade de enzimas proteolíticas, além de analisar inibidores de atividade proteolítica; ambos os métodos mostraram-se satisfatórios.

3.3. Processos de Recuperação e Purificação de Proteínas

O processo de separação e purificação de bioprodutos, chamado também de *dowstream processing*, é atualmente um segmento muito importante na indústria biotecnológica, representando 80 a 90% do custo de produção. Portanto, o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema importância (Belter et al.,1988).

A grande questão ao se iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a proteína. Proteínas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para as enzimas aplicadas em processos industriais. Em uma purificação em larga escala o processo consiste de 4 a 6 etapas divididas em dois grupos. O primeiro formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo, o objetivo é purificar a proteína, através das seguintes etapas: pré-tratamento, purificação e refinamento do produto final (Asenjo,1994).

As técnicas mais utilizadas para a separação das células presentes no caldo fermentado são: filtração rotativa à vácuo e centrifugação. Para o rompimento das células as técnicas mais comuns são: diálise por choque térmico, por solvente, ultrassonificação, homogeneizador e triturador mecânico. A remoção das células pode ser feita por extração em duas fases, já que estas tendem a ficar na interface. A purificação pode ser feita por: destilação, precipitação, extração em duas fases, cromatografia e cristalização. O tratamento do produto final pode ser feito por filtração estéril, remoção de pirogênio e secagem (Asenjo,1994).

A escolha do método depende das propriedades da proteína e do grau de pureza desejado. Com relação à cromatografia, por exemplo, existem vários princípios de separação que são selecionados de acordo com as propriedades físico-químicas de cada substância de interesse. Assim, para uma amostra que contém uma mistura de proteínas de diversas massas moleculares, pode-se aplicar a gel filtração que utiliza o princípio de separação por tamanhos. Quando o fator é a hidrofobicidade, a melhor opção é a cromatografia por interação hidrofóbica (Asenjo, 1994).

A purificação de proteínas encontra muitas dificuldades e exige um elevado número de etapas, como exemplo a remoção dos fragmentos da célula devido ao pequeno tamanho das partículas e à viscosidade da solução. Além disso, as etapas de precipitação podem levar a baixos rendimentos, reprodutibilidade limitada e o uso de procedimentos cromatográficos, em muitos casos, é limitado pela escala e custos operacionais (Husted et al., 1985). Por isso, a extração líquido - líquido tem despertado o interesse de pesquisadores como mais uma etapa no processo de purificação e separação de proteínas.

3.4. Extração Líquido-Líquido

Uma situação muito comum na Engenharia Química é a separação dos constituintes de uma mistura líquida homogênea composta de dois ou mais componentes. Para realizar esta separação existem vários métodos cuja aplicação é limitada pelas características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada, pelos custos de processo de separação e pelas condições disponíveis para a implantação do processo escolhido.

A extração líquido - líquido tornou-se um dos principais procedimentos de separação adotados industrialmente. Quanto à viabilidade econômica dos processos que empregam a extração líquido - líquido, esta é fortemente influenciada pelos custos do equipamento e pelos custos de recuperação e reposição de solventes. O custo de operação de um extrator líquido - líquido (consumo de energia mais manutenção) é geralmente negligenciável comparado aos outros fatores (Rabelo, 1999).

3.4.2. Extração Líquido - Líquido por Micela Reversa

Em biotecnologia existe a necessidade de desenvolver novos processos de purificação e concentração de compostos biotecnologicamente ativos, tais como as proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e células. Esses processos devem combinar alta seletividade e biocompatibilidade, além de uma fácil ampliação de escala (Kilikian et al., 2000).

O processo de extração líquido - líquido, consiste na separação dos componentes de uma mistura de uma fase na outra por contato entre duas fases líquidas imiscíveis, ou parcialmente miscíveis. Esse processo tem sido usado em diferentes setores da indústria química e farmacêutica, tais como, na separação de antibióticos ou na recuperação de ácidos orgânicos diretamente do meio de fermentação. Entretanto, a aplicação dessa técnica na separação, concentração e purificação de proteínas ainda é limitada, principalmente porque estas são insolúveis no solvente orgânico utilizado, ou porque este não tem a devida seletividade e/ou capacidade, ou ainda, porque a exposição direta da proteína ao solvente pode causar desnaturação, inviabilizando a sua aplicação posterior como um biocatalisador (Aires-Barros et al., 1994).

A extração líquido-líquido por micela reversa pode servir a essas propostas, pois possui a capacidade de solubilizar biomoléculas específicas de uma solução aquosa, como exemplo os meios de fermentação e cultura de células, sendo apontada como uma ferramenta útil e versátil para a recuperação de biomoléculas, especialmente de proteínas (Kilikian et al., 2000).

Essa técnica baseia-se na propriedade que os agentes tensoativos (moléculas que possuem em sua estrutura uma extremidade hidrofóbica e outra hidrofílica) têm de auto-organizar-se quando em solução, em presença de água, na forma de estruturas esféricas ou elipsoidais, que são chamadas de micelas.

3.5. Micelas

O termo “micela” foi utilizado pela primeira vez por McBain, em 1913, para descrever os agregados de eletrólitos anfifílicos (substâncias que possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica) em soluções aquosas.

Surfactantes são moléculas que possuem características anfifílicas, ou seja, possuem na mesma molécula uma porção hidrofílica ou polar, denominada cabeça, e uma porção hidrofóbica ou apolar, a qual é referida como cauda (Shipovskov et. al., 2005).

Quando em meio aquoso, tendem em determinadas condições e concentrações, a naturalmente autoorganizarem-se formando estruturas esféricas ou elipsoidais denominadas micelas; expondo suas porções hidrofílicas ao meio,

e, por conseguinte retraindo sua porção hidrofóbica ao interior das micelas (Volpe e Silva Filho, 1995).

Em um meio apolar, as micelas apresentam sua orientação inversa em relação à formação da estrutura micelar em água. Nesta situação, temos a chamada micela reversa; aglomerados moleculares analogamente elipsoidais ou esféricos, cujo núcleo por suas características hidrofílicas pode em determinadas condições reter água, a qual fica parcialmente protegida do contato com o solvente orgânico pelo agregado de moléculas de surfactante, conforme ilustrado na Figura 1. É neste núcleo, ou piscina como se referem muitos autores, que a proteína pode ser acondicionada sem perda de atividade (Brandini et al., 1994; Jolival et al, 1993; Meyer ,1992; Luise et al., 1988).

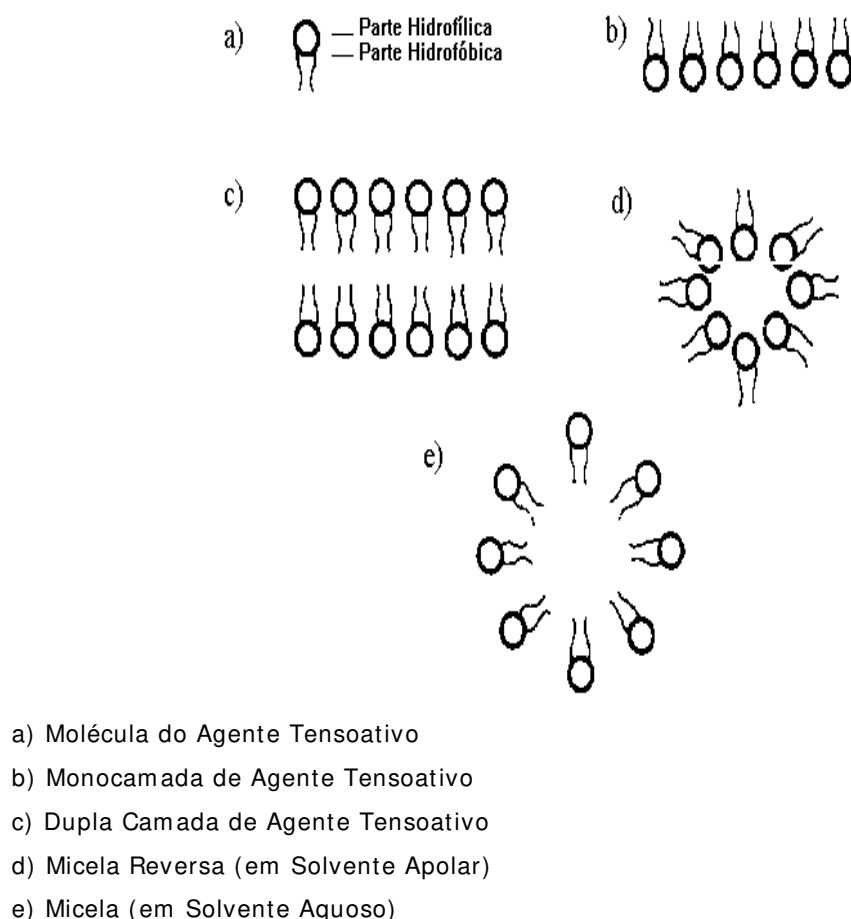


Figura 3.1: Representação esquemática do tensoativo e das estruturas micelares em diferentes solventes.

A micela reversa é composta por 3 regiões, sendo que a primeira é formada pela cauda hidrofóbica do tensoativo, que fica em contato direto com o solvente apolar; a segunda é a periferia micelar onde as moléculas de água estão fortemente ligadas aos núcleos polares das moléculas do tensoativo; e a terceira é o centro micelar, formado pela água contida no interior da micela que está ligada ao tensoativo ou água livre (Aires-Barros e Cabral, 1991).

Do ponto de vista estrutural, define-se as micelas invertidas como sendo aglomerados moleculares relativamente ordenados, caracterizadas por um raio médio, um número de agregação e densidade de empacotamento bem definidos (Martinek et. al. 1989, Bordi e Cametti 1998). São estruturas dinâmicas e não rígidas; que ao colidirem trocam moléculas de tensoativo e componentes do interior da micela entre si e entre a solução, com elevada velocidade (Luisi et. al. 1988). Apesar desta mobilidade, o tensoativo forma uma interface bem definida tornando o centro hidrofílico praticamente impermeável ao solvente orgânico (Martinek et. al., 1986; Luisi et. al., 1988).

A autoorganização do surfactante em sistemas micelares para a purificação de proteínas depende basicamente do equilíbrio em um sistema ternário constituído pelo solvente orgânico, água e surfactante; variando-os de maneira a atingir-se a concentração micelar crítica (CMC) ou seja, a faixa de concentrações onde ocorre a formação de micelas (Seoud et al., 1999).

A característica de retenção de água na micela também é importante podendo-se medi-la através de um parâmetro conhecido como W_o , ou seja “water in oil”; definido como sendo a relação entre a concentração de água presente na piscina pela concentração de tensoativo:

$$W_o = \frac{[H_2O]}{[\text{tensoativo}]}$$

Para alguns autores, este parâmetro é de extrema importância no sistema de micelas invertidas, pois determina a maioria das propriedades físicas e estruturais das micelas. Do valor deste parâmetro podem ser determinados o número de moléculas de surfactante por micela e o raio micelar. Ruckenstein e Karpe (1990) e Luisi et. al. (1988), à partir de considerações como assumir as micelas invertidas possuindo uma geometria esférica, relacionam o parâmetro W_o

com outros parâmetros estruturais das micelas como o raio micelar médio(r , em Angstroms) o número de agregação (N_{ag}) e a concentração molar de micelas (CM , em Moles.dm³), a partir das equações abaixo:

$$r = 1,64W_o$$

$$N_{ag} = 0,611W_o$$

$$CM = 1,64 \frac{[AOT]}{W_o}$$

A validade destas equações foi testada por vários autores, apresentando boa aproximação. Castro e Cabral (1988) confirmaram os valores preditos através de análise com Raios-X, por espalhamento de luz “light scattering”, por ultracentrifugação e por ressonância magnética nuclear (RNM). Lundgren et. al. (1998) testaram através de métodos fluorimétricos e por espectroscopia.

Obtido o valor do tamanho da micela e conhecendo-se o tamanho da proteína pode-se verificar previamente se a mesma pode ser encapsulada; ou ainda em que condições teríamos a expulsão da mesma da micela, pelo encolhimento desta última, o qual constitui fator importante na re-extração da proteína na fase orgânica.

A natureza da água presente no núcleo micelar é de grande importância na solubilização de biomoléculas, uma vez que é desse componente que depende a manutenção das propriedades estruturais responsáveis pela funcionalidade de uma enzima encapsulada na micela reversa. A água intracelular pode ter propriedades físico-químicas distintas da água pura, assemelhando-se à água presente nas membranas e interfaces biológicas e pode ser classificada em 2 tipos principais: a água ligada ao tensoativo, de menor polaridade e maior viscosidade, e à água livre, com propriedades semelhantes as da água pura (Kilikian et al.,2000).

A água da periferia micelar é diferente da água que conhecemos porque existe uma força eletrostática devido à força de atração dos núcleos polares das moléculas do tensoativo com as moléculas de água. Portanto, quanto menor a quantidade de água no interior da micela menor será a extração do bioproduto para o seu interior, já que as condições não são favoráveis a ele (Krei e Hustedt, 1992).

Embora o mecanismo de solubilização e acondicionamento das proteínas nas micelas não esteja satisfatoriamente solucionado, alguns estudos e modelos já foram propostos (Martinek et. al., 1986; Dungan et. al., 1991; Paradkar e Dordik, 1994; Mandal et. al. 1998). Embora não expliquem satisfatoriamente o processo de solubilização como um todo; desde os trabalhos de Göklen e Hatton (1985,1987) sabe-se que as proteínas podem ser eficientemente separadas e recuperadas por extração líquido-líquido utilizando sistemas de micelas reversas, apenas manipulando-se parâmetros do processo (Ex: β -xilosidase, imilase, xilose redutase, amidase, tirosinase, glucose oxidase) (Yang e Robb, 2005, Cortez et. al., 2004, Hasmann et. al., 2003, Kamyshny et. al., 2002, Puchkaev et. al., 2002).

3.5.1. Mecanismo de Formação de Micelas Reversas

O mecanismo de formação das micelas reversas não está totalmente elucidado. No entanto, a teoria mais aceita descreve a formação da micela reversa como um mecanismo cooperativo entre proteína e tensoativo: a interface entre as duas fases (aquosa e micelar) se deforma em torno da proteína, formando a micela e transferindo-a para a fase orgânica (Dungan, et al.,1991).

A equação da força eletrostática auxilia no entendimento do mecanismo de formação de micelas reversas:

$$Fe = \pi - \frac{1}{2}\epsilon E^2$$

Onde: Fe = Força eletrostática

π = Pressão osmótica

ϵ = Constante dielétrica

E^2 = Campo elétrico

Quanto mais distante a proteína estiver da interface micelar, maior será a diferença de potencial entre elas, uma vez que a carga da proteína é oposta à do tensoativo. Assim, será maior também o segundo termo da equação ($\frac{1}{2}\epsilon E^2$), aumentando a força de atração e fazendo com que a proteína se aproxime da interface (Figura 3.2a). Devido à aproximação entre proteína e tensoativo, a concentração de cargas opostas aumenta e com isso ocorre a elevação da pressão osmótica do núcleo aquoso, que age em sentido contrário ao da força

eletrostática (Figura 3.2b). Este fenômeno faz com que haja ruptura da interface e, conseqüentemente, deslocamento da micela reversa formada em direção à fase orgânica (Figura 3.2c). Desse modo, a superfície interfacial é atraída para junto da proteína, fechando a micela reversa (Figura 3.2d).

A tensão superficial juntamente com a força eletrostática tendem a resistir às deformações das camadas superficiais e portanto, a interface deforma até que a tensão superficial e a força eletrostática fiquem equilibradas (Dungan et al., 1991).

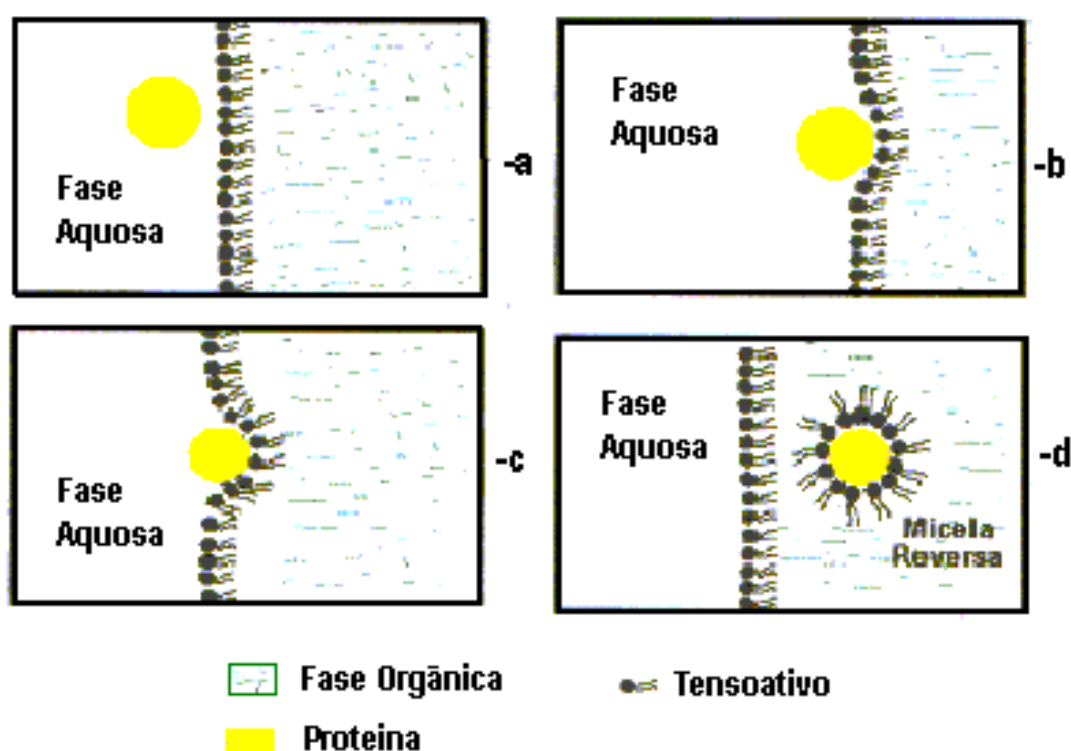


Figura 3.2: Mecanismo de Formação de Micelas Reversas (Adaptado de Dungan et al., 1991)

3.6. Partição de Proteínas em Sistemas Micelares

A partição de proteínas em sistemas micelares tem como principal força motriz a utilização de tensoativos iônicos especiais em solução orgânica; contatando-se com uma solução aquosa e regulando-se a transferência preferencial de proteína entre as fases pela alteração dos parâmetros do sistema.

A extração de proteínas por micelas reversas pode ser entendida como um processo de troca iônica, onde as interações eletrostáticas entre as proteínas e os grupos polares do tensoativo têm um papel fundamental, associado a um efeito de exclusão molecular (Krei e Husted, 1992). A transferência de fase das proteínas depende de muitos fatores relacionados às propriedades das biomoléculas. Dentre estes fatores temos o pH, a força iônica, o tipo e a concentração do tensoativo, o tipo de solvente orgânico, as propriedades físico-químicas das proteínas, como o seu ponto isoelétrico, a hidrofobicidade, o tamanho, a densidade e distribuição de cargas (Andrews e Haywood, 1994).

O método de extração por micela reversa envolve um procedimento simples, constituído de duas etapas. A primeira baseia-se na capacidade da micela reversa solubilizar as moléculas presentes em uma fase aquosa inicial para o interior do agregado micelar (Figura 3.3). Na segunda etapa, a molécula solubilizada é reextraída para uma nova fase aquosa, normalmente constituída por um tampão, de pH e força iônica conhecidos.

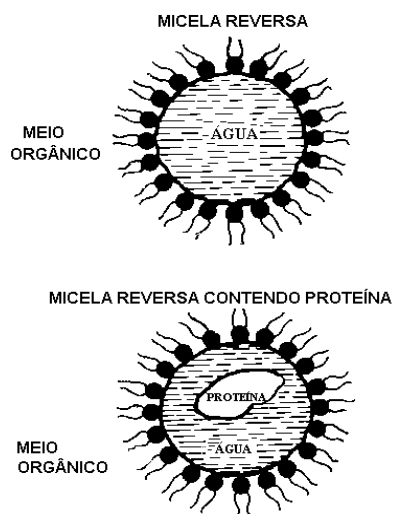


Figura 3.3: Representação esquemática de uma proteína englobada por uma micela reversa.

A estrutura microeterogênea do sistema de micelas reversas em solventes orgânicos possibilita a solubilização de proteínas num ambiente propício à manutenção da sua estrutura, pela manipulação dos vários fatores que atuam sobre a solubilização da proteína. O mecanismo de solubilização de biomoléculas em micelas reversas ainda não está esclarecido.

Levashov et al. (1984) e Luisi e Magid (1986), propuseram um modelo que está mostrado na Figura 3.4. Segundo esses autores, após o encapsulamento, a localização das proteínas no interior da micela dependerá da natureza da proteína e do tensoativo. As enzimas com características predominantemente hidrofílicas, localizariam-se no centro micelar, enquanto que as enzimas com características de ativação interfacial estariam associadas à interface. Certas enzimas, com alto caráter hidrofóbico poderiam mesmo contactar com o solvente orgânico. Entretanto, ainda outras situações podem ocorrer, como a solubilização de uma proteína por ação de diversas micelas via interações hidrofóbicas e a formação de uma rede de muitas micelas em torno das moléculas de proteína (Luisi et al., 1988).

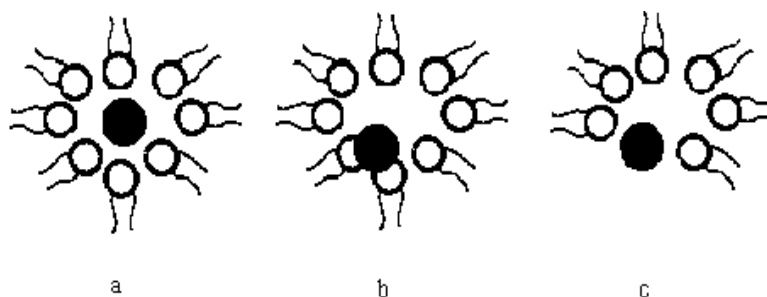


Figura 3.4: Representação esquemática da localização de proteínas em micelas reversas. a) proteína hidrofílica; b) proteína de interface; c) proteína hidrofóbica.

A recuperação de proteínas neste tipo de sistema se dá através do contato de uma solução salina em pH controlado contendo uma proteína com uma solução orgânica contendo tensoativo. Nesta primeira operação, de extração, a proteína irá migrar da fase aquosa para a orgânica, o que em termos práticos é muito interessante, pois esta fase aquosa poderia ser, por exemplo, o mosto aquoso de meio de fermentação. Assim em termos operacionais seria como se contactássemos o caldo fermentado diretamente com a fase orgânica, apenas acertando o pH e a força iônica do caldo aos níveis desejados (Brandini et al., 1996).

Sendo o sistema micelar relativamente seletivo, muitos aminoácidos e resíduos celulares indesejáveis já estão sendo descartados nesta operação. A etapa seguinte constitui-se em recuperar da fase orgânica a proteína com um grau de pureza maior ou mais concentrada. A esta segunda etapa denomina-se re-extração, e constitui-se do contato da fase orgânica enriquecida com proteína com uma nova fase aquosa com força iônica e pH controlados de maneira que preferencialmente a proteína migre a esta nova fase aquosa (Dekker et. al., 1986).

Para obter-se a transferência entre fases de maneira a caracterizar e otimizar o processo de extração; faz-se necessário a compreensão de como alterar as propriedades do sistema para promover a partição de proteínas e assim manipular estes fatores em prol de se obter a transferência para a fase desejada. Assim, é necessário primeiramente a investigação de como cada propriedade pode participar individualmente, contribuindo na modificação das características do sistema como um todo (Yang e Robb, 2005).

3.6.1. Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição (K) é uma grandeza que representa a relação de concentração da substância de interesse na fase superior e inferior após atingido o equilíbrio:

$$K = C_T / C_F$$

Onde:

- C_T é a concentração da substância de interesse na fase superior no equilíbrio
- C_F é a concentração da substância de interesse na fase inferior no equilíbrio.

O K é uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar estes valores. O que se deseja é que os dois coeficientes tenham uma ordem de grandeza bem distinta entre si. Como os sistemas em duas fases aquosas são aplicados aos processos de separação em biotecnologia, geralmente as substâncias de interesse são produtos biotecnológicos, principalmente proteínas e enzimas, às quais normalmente o K está associado.

Diversos tipos de interações podem ocorrer entre as substâncias de interesse e os componentes do sistema, tais como: interações de cargas, interações entre as pontes de hidrogênio, força de van der Waals e interações hidrofóbicas. Portanto existe uma série de fatores que podem influir na eficiência da partição (Albertsson, 1986).

Nos sistemas de duas fases aquosas, os pigmentos têm preferência pela fase superior, pois são substâncias hidrofóbicas (Lahore et al., 1995).

3.7. Influência dos Parâmetros do Sistema

3.7.1. Surfactante

Quanto ao surfactante para sistemas micelares, é importante a classificação de acordo com a carga de sua porção hidrofílica em: catiônico, aniônico, neutro e anfótero ou zwitteriônico (Goto et al., 1997). A escolha de qual surfactante será melhor aplicado ao processo de separação dependerá de características da proteína e do sistema em si. Deve-se levar em conta o valor do ponto isoelétrico das mesmas e o tamanho da micela desejada.

A dissolução de um tensoativo em solvente orgânico, em presença de água, pode levar à formação de agregados de outras estruturas que não apenas as micelas reversas, como as micelas normais, as microemulsões e as mesofases liotróficas (cristais líquidos), conforme está apresentado no diagrama de fases para o sistema AOT/água/isooctano da Figura 3.5. A formação das micelas reversas somente ocorre numa região definida do diagrama de fases e é determinada por um equilíbrio de forças atrativas e repulsivas presentes no sistema. A formação dessas estruturas depende das concentrações dos componentes presentes e de forças como a interação dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e pontes de hidrogênio (Luisi e Magid, 1986), sendo o processo de formação caracterizado por um equilíbrio entre as moléculas livres do tensoativo e as micelas completas (Castro e Cabral, 1988).

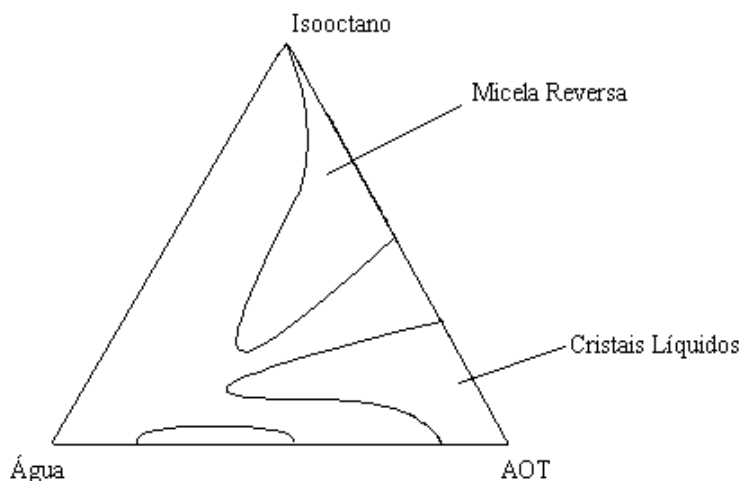


Figura 3.5- Diagrama de fases para o sistema AOT/água/isooctano, com as várias estruturas possíveis para os agregados.

Dentro da categoria dos surfactantes aniônicos, um dos mais utilizados para a formação das micelas é o AOT (di-octil sufosuccinato de sódio) ou Aerosol-OT. O AOT possui uma cabeça aniônica pequena e duas caudas hidrofóbicas, que teoricamente lhe confere maior estabilidade na formação de micelas, solubilizando ou não proteínas (Yang e Robb, 2005, Albery et. al., 1987). Outra vantagem da utilização do AOT, em relação aos demais, é a facilidade de formação de micelas invertidas sem a presença dos chamados co-tenssoativos. A espontaneidade de formação da micela está relacionada com a capacidade de solubilização da água (cerca de 100 moles de água por mol de surfactante), que no caso do AOT é facilitada pela possibilidade de rotação do grupo etano em torno da ligação carbono-carbono existente na porção hidrofílica do surfactante (Patel et al., 1996; Regalado et al., 1996; Zamarro et al., 1996; Huang Lee, 1994; Aires-Barros et al., 1991).

Os tensoativos catiônicos constituem também uma vasta classe, compreendendo, por exemplo, a dos halogenados de alquil-amônio (CTAB, TOMAC, TTAB); os fosfolipídios e os surfactantes derivados de poli-óxidos de etileno (Tween, Span, Triton), somente para citar alguns. Necessariamente estes surfactantes necessitam um co-surfactante para a formação de micelas. Entretanto, como já descrito anteriormente, pode haver a necessidade

imprescindível do uso dos mesmos de acordo com as propriedades da proteína frente ao sistema (Yang e Robb, 2005, Pacheco et. al., 2005, Krei e Husted, 1992; Krei et al., 1995).

A aplicação de tensoativos neutros, tais como o polietilenoglicol (PEG) está mais associado a um outro tipo de sistema que não o micelar, o sistema aquoso bifásico, onde as duas fases em contato constituem-se de água.

O ponto isoelétrico (pI) da proteína é quem definirá a escolha do tipo de surfactante para sistemas micelares, se aniônico ou catiônico. Para situações onde necessita-se trabalhar com a proteína em valores de pH abaixo do seu pI, a mesma apresentará distribuição de estado de ionização dos resíduos positiva; portanto para uma melhor transferência de massa preferencialmente escolheria-se um tensoativo aniônico. Para o caso contrário, ou seja, o pH do sistema acima do pI, o valor da distribuição de cargas na molécula de proteína seria negativa, portanto o surfactante preferencialmente escolhido para a promoção de transferência entre as fases seria o catiônico (Meyer, 1992).

Outro importante fator relacionado com tensoativos é a sua concentração. Göklen et. al. (1986) afirmam que para um dado tensoativo, um aumento da sua concentração provoca um aumento no número dos agregados micelares, desde que respeite os limites impostos pelo diagrama de equilíbrio do sistema, e de seu tamanho devido à maior quantidade de água solubilizada. Esse efeito leva normalmente a uma maior transferência das proteínas para a fase micelar e como também ocorre aumento do raio da micela, proteínas relativamente grandes são mais facilmente solubilizadas (Aires-Barros e Cabral, 1993).

Este fato pode vir a ser desejável ou não, pois o sistema em questão pode possuir proteínas indesejáveis de grande porte que poderiam vir a ser solubilizadas. Embora o mecanismo para explicar este tipo de efeito não esteja satisfatoriamente explicado, Chang et. al.(1994) constataram experimentalmente por análise de dispersão de luz que há um aumento significativo do raio micelar com o aumento da concentração de tensoativo na faixa estudada, compreendida entre 25 e 250 mM de tensoativo.

Dentre os fatores que afetam a solubilização de proteínas em micelas reversas, além dos já reportados pH e força iônica, aqueles relacionados com a

fase orgânica, como o tipo e a concentração do tensoativo, também são importantes na otimização das condições de extração de proteínas. A capacidade de solubilização da fase micelar altera-se diretamente pelo aumento da concentração do tensoativo, possivelmente devido a mudanças nas interações eletrostáticas do sistema. O aumento da concentração do tensoativo resulta num perfil mais amplo de extração em função do pH, ou seja, a interferência do pH na solubilização das biomoléculas tem seu efeito minimizado pelo aumento da concentração do tensoativo (Aires-Barros e Cabral, 1993).

3.7.2. Solvente Orgânico

Com relação aos solventes, a premissa básica para sua utilização no sistema de micelas invertidas é que seja imiscível em água, pois além de ser o meio mais convencionalmente utilizado em fermentações, a mesma constitui um dos solventes mais comuns da primeira etapa da maioria dos protocolos de purificação, a lixiviação (Yang e Robb, 2005; Chang e Chen, 1995; Luisi et. al., 1988).

Entre os solventes orgânicos utilizados como meio dispersivo na formação de micelas, destacam-se os hidrocarbonetos alifáticos, como o n-octano, isooctano e n-heptano; porém os aromáticos como o benzeno e o xileno e os halogenados como o clorofórmio também podem ser utilizados (Yang e Robb, 2005, Pacheco et. al., 2005, Luisi et. al., 1988; Luisi e Magid, 1986).

Chang e Chen (1995) e Chang et. al. (1994) obtiveram bons resultados de recuperação de atividade enzimática, utilizando querosene como solvente orgânico para a formação de micelas, sendo esta uma alternativa atraente em termos de redução de custos com reagentes.

Outra característica vital para a escolha de solventes orgânicos é que os mesmos não desnaturem a proteína quando utilizados em sistemas micelares (Yao et. al., 2005). Trabalhos como os de Chang e Rhee (1990) e Han e Rhee (1986) investigaram a influência de vários solventes quanto à atividade enzimática, determinando empiricamente que para as enzimas estudadas o isooctano seria o solvente que menor influência teria na desnaturação.

Laane et. al. (1987) obtiveram empiricamente algumas regras para otimização da escolha do tipo de solvente orgânico em micelas invertidas, baseadas no logaritmo do coeficiente de partição do solvente ($\log P$). Segundo estes autores, a catálise enzimática é altamente favorecida em valores de $\log P$ maiores que 4,0. A hipótese mais plausível é de que os solventes com maior grau de polaridade podem interagir com a água intramicelar, desestabilizando as enzimas encapsuladas no interior das micelas. Para fins quantitativos, o isooctano, por exemplo, possui $\log P$ de 4,5.

Creagh et. al. (1993) estudaram através de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétron o comportamento da alfa- quimiotripsina verificando que sistemas de micelas reversas de AOT/isooctano pouco afetam a enzima estruturalmente e constataram que além da enzima manter a sua atividade, em determinadas condições de extração até houve um aumento catalítico da mesma.

3.7.3. Sal

Segundo alguns pesquisadores como Hatton (1987) e Liu et. al. (1998) os efeitos principais que podem ser inferidos sobre a atuação da força iônica são de modificação das interações eletrostáticas do sistema, causando os efeitos como “salting in” (SI) ou “salting out” (SO), por exclusão ou inclusão molecular de acordo com a concentração de sal no sistema.

Porém, segundo estes mesmos pesquisadores, o principal efeito da ação salina se dá pela alteração na força iônica modificado o equilíbrio existente entre as forças de repulsão eletrostáticas entre os grupos polares do surfactante, causando a expansão ou retração do tamanho da micela.

Kennedy e Cabral (1993) porém, afirmam que dependendo da concentração molar da solução tampão adicionada para controle de pH pode-se promover a separação de fases segundo os mesmos princípios, sem a necessidade intrínseca da adição de sal.

Não somente a concentração, mas também o tipo de sal pode vir a influenciar a transferência de massa entre fases. Marcozzi et. al. (1991) e Leser et. al. (1992) estudaram a influência de diferentes tipos de sal usados na fase de

extração e a influência global desta variável, comparando o rendimento obtido na re-extração.

3.7.4. pH

O pH da fase aquosa inicial tem uma importância significativa na promoção das interações eletrostáticas entre os componentes micelares e as biomoléculas, pois determina a carga elétrica da proteína em solução. A solubilização na fase micelar normalmente ocorre quando a proteína e os grupos polares do tensoativo tem cargas opostas (Cabral e Aires-Barros, 1993). Assim, para tensoativos catiônicos, a solubilização é favorecida em valores de pH superiores aos do ponto isoelétrico da proteína, enquanto que, para os tensoativos aniônicos, a transferência ocorre em valores de pH inferiores ao ponto isoelétrico da proteína (Dekker et al., 1986). Em alguns casos, entretanto, esse efeito não ocorre ou é apenas parcial, ou seja, não há transferência da proteína pela variação do pH. Nesse caso, os autores sugerem que a transferência das biomoléculas para a fase micelar seja regida principalmente por interações hidrofóbicas (Castro e Cabral, 1988).

O valor de pH determina a taxa de dissociação dos resíduos carregados que compõem a estrutura primária da proteína e assim a distribuição de carga da molécula protéica da fase aquosa. Por conseguinte, há o efeito da promoção da transferência da mesma entre as fases (Cabral e Aires-Barros, 1993).

Porém, alguns autores (Luisi et.al., 1979; Castro et. al., 1988) obtiveram transferência de proteína em situações contrárias as já descritas, ou seja, trabalhando com a proteína apresentando sinal de distribuição de cargas idêntico ao da cabeça iônica do surfactante. Neste caso, a explicação mais plausível é de que a transferência para a fase micelar dos sistemas estudados seja controlada majoritariamente por interações hidrofóbicas de enzima frente ao meio.

Outro importante cuidado concernente ao pH seria a observação para que se operasse o sistema dentro da faixa que a proteína não se desnature. Esta observação primariamente observada para o solvente orgânico estende-se às concentrações de sal e de tensoativo e constitui limites para estudos de otimização.

3.8. Extração

Fatores de ordem mecânica como velocidade de agitação, razão volumétrica entre as fases e método de contato exercem enorme influência na transferência de enzima entre as fases; e são de extrema importância se o estudo do sistema tem a finalidade de resolução de projetos ou interesses de engenharia (Rabelo, 1999).

Poucos são os autores que focaram estes fatores na extração; destacando-se os trabalhos de Nishiki et. al. (1995) que estudaram a influência da velocidade e tempo de agitação assim como a razão entre as fases orgânica e aquosa para a extração de várias enzimas em sistemas micelares; e de Matzke et. al. (1992), que estudaram vários métodos de injeção e solubilização, inclusive contato da enzima em estado sólido com a fase orgânica. Regalado et. al. (1994) também efetuaram estudos da influência na transferência durante a extração quanto à razão entre as fases.

Outro fator de relevância tanto na extração quanto na re-extração é a temperatura, principalmente quando se pretende operar o sistema em regiões onde a variação de temperatura seja muito acentuada. Para a maioria das enzimas, a faixa de atuação ideal é a compreendida entre 10 e 38°C; entretanto isto não constitui uma regra geral, necessitando estudar-se cada caso particularmente.

Um cuidado mínimo quanto à temperatura é que a faixa de trabalho não esteja compreendida na região de desnaturação da enzima em questão. O ideal seria a operação na temperatura de máxima atividade catalítica da enzima, caso deseje-se utilizar diretamente a solução de re-extração (Luisi et al., 1988).

3.9. Re-Extração

Valem para a etapa de re-extração os mesmos comentários sobre a influência de fatores mecânicos mencionados anteriormente para a extração.

Segundo alguns autores, para muitas aplicações de enzimas o grau de pureza alcançado pelo emprego de sistemas de micelas reversas por si só já é satisfatório, não necessitando de outras etapas posteriores de purificação.

Nitin e Luisi (1989), Leser et. al. (1993), Dahuron e Cussler (1988) realizaram estudos modificando o procedimento clássico de re-extração em sistemas micelares, obtendo enzimas já na disposição final para uso como catalisadores. Respectivamente eles imobilizaram a fase orgânica em gel de poliacrilamida; utilizaram esferas de sílica em contato com a fase orgânica e imobilizaram a fase orgânica em fibras semi-porosas.

Carlson e Nagarajan (1992) estudaram a adição à fase orgânica de substâncias desestabilizadoras de micelas, tais como álcoois, para a liberação das enzimas na re-extração. No artigo são reportados fatores de recuperação de quase 100%, entretanto nada é mencionado quanto à atividade enzimática da proteína obtida por esse método. Este método é particularmente interessante, pois posteriormente o álcool pode ser separado do solvente orgânico por outra extração líquido-líquido, sendo estes reagentes reaproveitados no processo.

3.10. Métodos Estatísticos

3.10.1 Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial constitui uma ferramenta estatística para realização de estudos sobre um determinado fenômeno que possua muitas variáveis de maneira organizada e com objetivos bem planejados, reduzindo os experimentos a um número mínimo necessário. Possibilita também, a constatação de quais variáveis são de maior importância para determinados resultados do processo, sua influência individual e as interações que todas as variáveis possuem entre si, concernente à resposta global do fenômeno.

Quando rigorosamente aplicado, o método gera a possibilidade de avaliar os erros experimentais e de regressão, e a modelagem matemática empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas, caracterizando assim o fenômeno. Toda metodologia descrita a seguir é detalhadamente explicada por Box et.al (1978).

A construção de um planejamento fatorial começa pela escolha do número de níveis que se deseja estudar para cada variável do sistema e assim efetuar experimentos em todas as possíveis combinações. Por exemplo, se fosse decidido

pelo estudo de dois níveis de “n” variáveis, teriam de ser estudados 2^n experimentos. Se a opção fosse por três níveis, teríamos 3^n experimentos e assim por diante. Obviamente, se o pesquisador deseja minimizar o número de experimentos, o estudo em 2 níveis é recomendado sendo bastante eficaz para a maioria dos sistemas.

A segunda etapa do método é a escolha estratégica de um ponto de ensaio com valores definidos pela média intermediária entre os dois níveis escolhidos de cada variável; e a realização de ensaios em triplicata para este ponto. Assim, após a obtenção de todas as respostas pode-se:

- ajustar um modelo matemático de 1ª ordem para correlacionar variáveis e respostas;
- calcular os efeitos individuais e de interação das variáveis sobre a resposta;
- estimar os erros experimentais associados aos ensaios;
- determinar quais são os efeitos mais significativos sobre a resposta comparando o valor efeito com o do erro experimental estimado.

Para avaliar se os modelos empíricos apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais é necessária uma análise estatística utilizando o coeficiente de correlação da regressão e o valor estimado para o teste F.

O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos pontos experimentais em relação ao modelo proposto, com a variância da própria população de pontos experimentais. Quando o valor do coeficiente é 1, a correlação entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais é perfeita. Quando este valor é zero, não existe correlação. A análise dos valores intermediários não pode ser expressa de forma tão simples, mas em termos qualitativos, quanto mais próxima da unidade este valor for, melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais.

O teste F constitui a comparação do valor estimado para F à partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência. É possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O fundamento do teste F consiste em verificar se a hipótese nula é válida, isto é se as modificações introduzidas nas condições e a variação nos valores dos resultados foi devida exclusivamente a fatores aleatórios. Assim,

consultando uma distribuição de referência, relevante para o sistema em estudo, se as variações nas respostas observadas experimentalmente apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não há razão para questionar a hipótese nula, do que se conclui que não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Por outro lado, se as variações observadas experimentalmente nas respostas forem muito grandes, a probabilidade de ocorrerem naturalmente na distribuição de referências será muito pequena. Neste caso, pode-se afirmar que uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada e os dados experimentais são representados pelo modelo proposto com um alto nível de confiança.

3.10.2 Análise por Superfície de Resposta

Após a caracterização prévia do sistema pelo planejamento fatorial, para sua otimização, ou seja, pesquisa de regiões de máximo ou mínimo valores na resposta, pode-se recorrer ao método de análise por superfície de resposta.

Efetuem-se mais experimentos seguindo a tendência desejada apresentada pelas respostas do sistema em estudo, até obter-se uma inflexão nos valores de resposta ou que o coeficiente de correlação tenda a zero, ou seja, uma região onde o modelo de primeira ordem não seja válido. Nestas regiões são efetuados experimentos de modo a ajustar a resposta a um modelo de segunda ordem. Desde que seja testada a correlação dos modelos destas regiões, e os mesmos apresentem bons ajustes, pode-se inferir o ponto ótimo de resposta do sistema.

Alguns autores já utilizaram esta ferramenta estatística em sistemas de micelas reversas. Dentre as aplicações da metodologia de superfície de resposta a sistemas micelares concernentemente a transferência de massa, destacam-se os trabalhos de Bompensiere et al (1998) que estudou a influência conjunta da concentração de tensoativo e concentração salina na purificação de uma enzima, e de Pyle et al. (1994), obtendo dados sobre a ação conjunta exercida pelo pH e concentração salina para otimização de atividade.

4. Materiais e Métodos

4.1. Preparo das Amostras

4.1.1. Preparação da Amostra a Partir do Extrato Bruto

As amostras foram preparadas com a polpa do abacaxi pérola da seguinte maneira:

- 1) A polpa do abacaxi foi triturada em liquidificador (marca Walita) em velocidade baixa por 5 minutos, sem adição de água, em temperatura ambiente.
- 2) Em seguida, filtrada em filtro de papel (Método nº 101) para retirada de fibras e particulados presentes no extrato.
- 3) O extrato foi armazenado em frascos de 10 mL e acondicionado à temperatura de -5°C .

4.1.2. Preparo das Soluções Micelares

As soluções micelares foram preparadas a partir de 3 tensoativos: BDBAC e CTAB de caráter catiônico e AOT de caráter aniônico.

As soluções de AOT foram preparadas com o tensoativo AOT e o solvente isooctano (Merck), as soluções de BDBAC, com o tensoativo BDBAC, solvente isooctano (Merck) e co-solvente hexanol (Merck) e para as soluções de CTAB foi usado o tensoativo CTAB, solvente isooctano (Merck) e co-solventes hexanol e butanol (Merck). As concentrações usadas estão apresentadas nos planejamentos experimentais.

4.1.3. Preparo das Soluções de Re-Extração

As soluções de re-extração consistiram de tampão Ácido Cítrico/Fosfato Dissódico (Synth) 1M e NaCl (Synth) adicionado até as condições especificadas no planejamento (1 e 2 M).

4.2. Procedimento da Extração e Re-Extração

4.2.1. Extração

O processo de extração da bromelina, contida no suco do abacaxi, por micela reversa, foi realizado na seguinte seqüência de operação:

- 1) 5mL da solução de bromelina foi misturada com igual volume da solução micelar em tubo de ensaio;
- 2) A solução foi agitada em vórtice por 3 minutos até aparecimento de emulsão.
- 3) O tubo foi centrifugado a 2320 g por 5 minutos para separação das fases.
- 4) A fase micelar (superior) foi retirada para utilização na etapa de re-extração.
- 5) Analisou-se a fase aquosa inicial, determinando-se a proteína total e atividade enzimática.

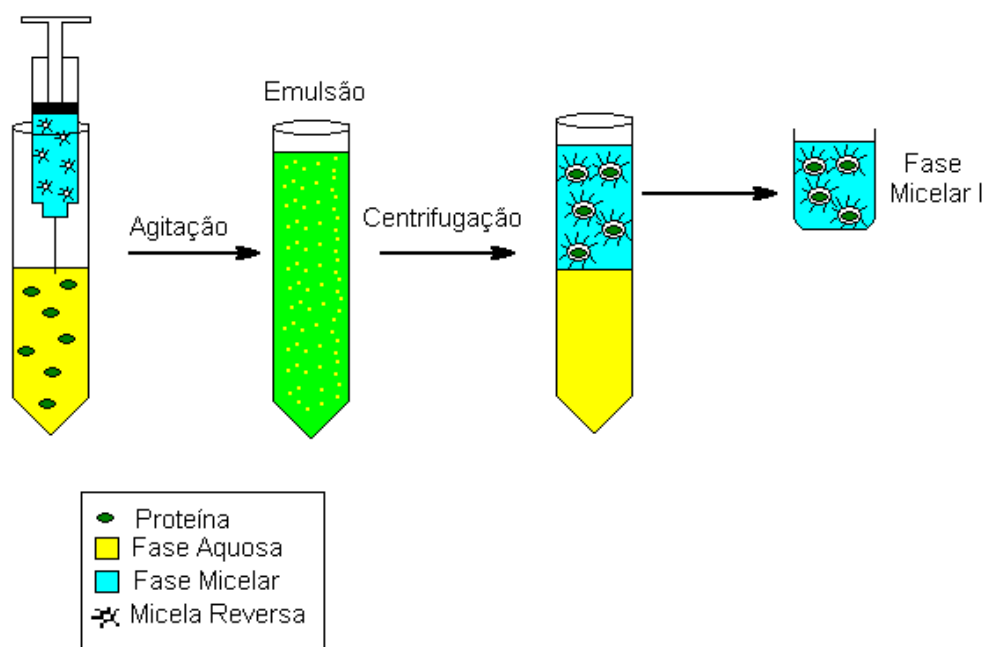


Figura 4.1 - Representação esquemática da etapa de extração da bromelina por micelas reversas.

4.2.2. Re-Extração

A operação de re-extração foi realizada na seguinte seqüência:

- 1) A fase micelar proveniente da extração foi transferida para novo tubo de ensaio onde foi acrescentada também alíquota de igual volume da solução de re-extração.
- 2) A solução foi agitada em vórtice durante 3 minutos
- 3) O tubo foi centrifugado a 2320 g por 5 minutos para separação das fases.
- 4) Desprezou-se a fase superior (micelar) e retirou-se a fase inferior (fase aquosa com a enzima) para determinação de proteína total e atividade enzimática.

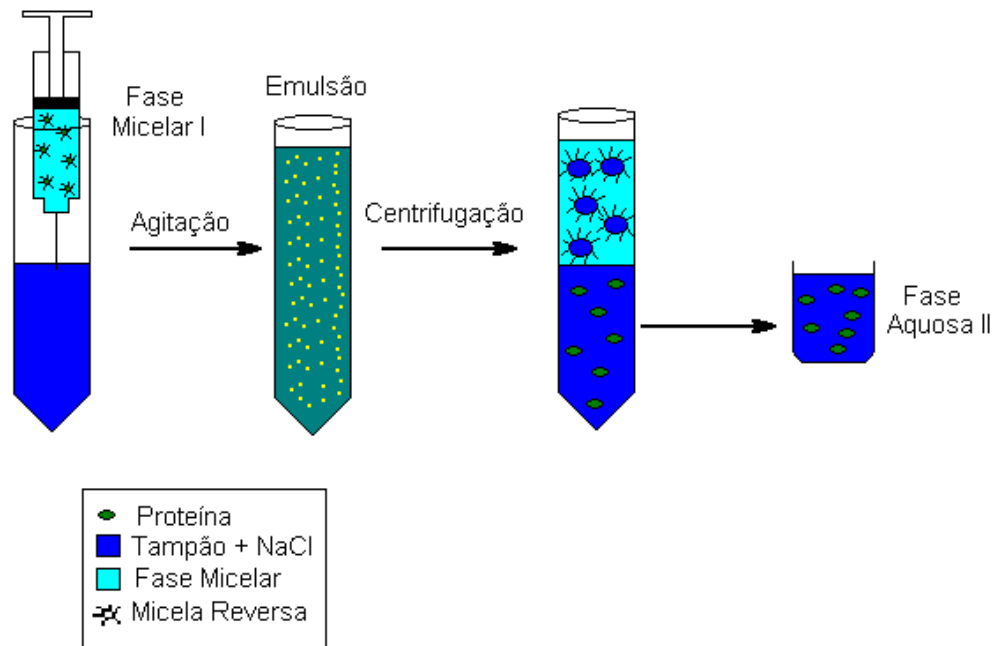


Figura 4.2 - Representação esquemática da etapa de re-extração da bromelina por micelas reversas.

4.3. Métodos Analíticos

4.3.1. Determinação de Proteínas

O teor de proteínas foi determinado de acordo com o método de LOWRY (1951). Utilizou-se como padrão BSA.

4.3.2. Método para a Determinação da Atividade Proteolítica

Determinou-se a atividade proteolítica conforme modificações das metodologias propostas por Kunitz (1947) e Walter (1984) através da hidrólise enzimática da caseína a 2% (m/v) pH 7,5 a 37°C durante 10 minutos, seguindo-se de precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). A quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados, ou seja, de peptídeos solúveis em TCA foi determinada a 280 nm contra um branco do substrato e outro da amostra.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de variar em uma unidade a leitura de absorbância a 280 nm, durante 10 min a 37°C.

4.4. Metodologia de Cálculo

Para avaliação da extração serão analisados os seguintes parâmetros abaixo definidos:

a) *PT* - Rendimento em proteína total

$$PT = \frac{P_2}{P_1} \times 100$$

P1 – proteínas totais no extrato bruto

P2 – proteínas totais após a re-extração

b) *AP* - Rendimento em atividade enzimática

$$AP = \frac{A_2}{A_1} \times 100$$

A1 – atividade enzimática no extrato bruto

A2 – atividade enzimática após a re-extração

c) *FP* - Fator de purificação, que representa o aumento de pureza da enzima desejada.

$$FP = \frac{A_2/P_2}{A_1/P_1}$$

5. Resultados e Discussões

O processo de extração líquido-líquido da bromelina por micela-reversa foi avaliado sob diferentes condições experimentais, empregando-se a metodologia do planejamento experimental (Barros Neto et al., 1995; Box et al., 1978).

Através do estudo das variáveis que influenciam a extração da bromelina em sistemas micelares em batelada, buscou-se determinar os fatores significativos para o processo, assim como as melhores faixas de operação. Para isto foram realizados planejamentos fracionários para determinar quais fatores têm os maiores efeitos utilizando um menor número de experimentos. Foram testados dois tipos de surfactantes, aniônico (AOT) e catiônico (BDBAC e CTAB), suas eficiências foram analisadas através do fator de purificação (FP) obtido.

Os níveis usados para a extração foram determinados de acordo com o diagrama de fases do tensoativo (AOT) ou através de trabalhos experimentais (BDBAC e CTAB) (Hasmann, 2000). Os pHs usados foram determinados de acordo com a faixa de pH que mantivessem a atividade proteolítica da bromelina e que também favorecessem a extração e re-extração da bromelina conforme a operação usada (Murachi, 1976).

5.1 Extração da Bromelina em Batelada com tensoativo AOT

A tabela 5.1 contém os valores de níveis mínimos e máximos utilizados no planejamento fatorial para extração da Bromelina com o tensoativo AOT

Tabela 5.1 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial para a extração da Bromelina com tensoativo aniônico AOT.

Fator	Nível (-1)	Nível (+1)
pH	3	4
[AOT] mM	100	250
pH Reextração	4	6
[NaCl] M	1	2

Para a extração da bromelina com o tensoativo AOT usou-se a faixa de pH 3-4, pois a bromelina deve ter distribuição de cargas positiva, ou seja, abaixo do ponto isoelétrico (4,6) e o nível mínimo de pH foi delimitado a 3 porque abaixo deste valor a bromelina começa a desnaturar.

Os níveis de concentração de AOT foram determinados entre 100 e 250 mM pois é nesta faixa que há um aumento mais significativo do tamanho da micela.

Os pHs da re-extração foram determinados abaixo e acima do ponto isoelétrico (4,6), para verificar para este sistema se o pH exerce forte influência na re-extração.

Para a concentração de sal (NaCl) foram realizados testes preliminares que demonstraram que nesta faixa há a maior recuperação de proteínas, além de altas concentrações de sal desnaturarem a enzima (Bertevello, 2001).

A tabela 5.2 mostra a matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a extração da bromelina com o tensoativo aniônico AOT, com os valores mínimos (-1) e máximos (+1) de forma codificada, com os seus respectivos resultados.

Tabela 5.2 – Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para extração da Bromelina em batelada com tensoativo aniônico AOT e resposta (Fator de Purificação- FP) após a reextração.

Ensaio	pH	[AOT]mM	pH Reext.	[Sal]M	FP (R1)	FP (R2)
1	1	1	1	1	0	0
2	1	1	-1	-1	0,036	0,042
3	1	-1	1	-1	0,084	0,090
4	1	-1	-1	1	0,040	0,035
5	-1	1	1	-1	0,019	0,020
6	-1	1	-1	1	0	0
7	-1	-1	1	1	0,110	0,115
8	-1	-1	-1	-1	0	0

Os resultados da extração da bromelina com o tensoativo AOT (Tabela 5.2) apresentaram um fator de purificação muito baixo, concluindo-se que este sistema não é adequado para a separação da bromelina. Como os fatores de purificação (FP) foram muito baixos a influência dos fatores na resposta não foram analisados, pois se torna economicamente inviável esta separação.

5.2 Extração da Bromelina em Batelada com tensoativo CTAB

A tabela 5.3 contém os valores de níveis mínimos e máximos utilizados no planejamento fatorial para extração da Bromelina com o tensoativo CTAB

Tabela 5.3 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial para a extração da Bromelina com tensoativo catiônico CTAB.

Fator	Nível (-1)	Nível (+1)
pH	6	8
[CTAB] mM	150	250
[Hexanol] %	5	10
[Butanol] %	10	20
pH Reextração	3,5	6
[NaCl] M	1	2

A extração da bromelina com o tensoativo CTAB foi realizada em uma faixa de pH 6-8, uma vez que a bromelina deve ter distribuição acima do ponto isoelétrico, ou seja, cargas negativas, sendo que o limite máximo para que não ocorra a desnaturação é 10,3 segundo Murachi, 1973.

A faixa de concentração de CTAB e as porcentagens de hexanol e butanol adicionadas foram determinadas a partir de trabalhos anteriores realizados com esse tensoativo (Hasmann, 2000).

A tabela 5.4 apresenta os resultados do fator de purificação (FP) da bromelina por micelas reversas do agente tensoativo CTAB, obtidos a partir dos ensaios realizados conforme planejamento fatorial 2^{5-1} . A matriz encontra-se com os valores de mínimos (-1) e máximos (+1) codificados.

Tabela 5.4 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico CTAB e resposta (Fator de Purificação- FP) após a Reextração.

Ensaio	pH	[CTAB]	% Hexanol	% Butanol	pH Reextração	[NaCl]	FP (R1)	FP (R2)
1	1	1	1	1	1	1	2,52	2,08
2	1	1	1	-1	1	-1	2,03	1,37
3	1	1	-1	1	-1	-1	6,21	7,10
4	1	1	-1	-1	-1	1	2,96	1,33
5	1	-1	1	1	-1	-1	2,92	2,44
6	1	-1	1	-1	-1	1	0,59	0,14
7	1	-1	-1	1	1	1	1,23	0,85
8	1	-1	-1	-1	1	-1	4,11	2,29
9	-1	1	1	1	-1	1	1,40	2,95
10	-1	1	1	-1	-1	-1	0,39	0,44
11	-1	1	-1	1	1	-1	3,08	1,18
12	-1	1	-1	-1	1	1	0,21	0,29
13	-1	-1	1	1	1	-1	1,09	1,37
14	-1	-1	1	-1	1	1	0,07	0,07
15	-1	-1	-1	1	-1	1	0,38	0,17
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4,97	2,21

Os resultados da Tabela 5.4 foram analisados utilizando-se as ferramentas do programa “Statistica”, possibilitando voltar nossa atenção à influência de cada parâmetro acima citado.

A figura 5.1 representa o gráfico de Pareto que mostra quais efeitos foram significativos na extração da bromelina com o tensoativo CTAB.

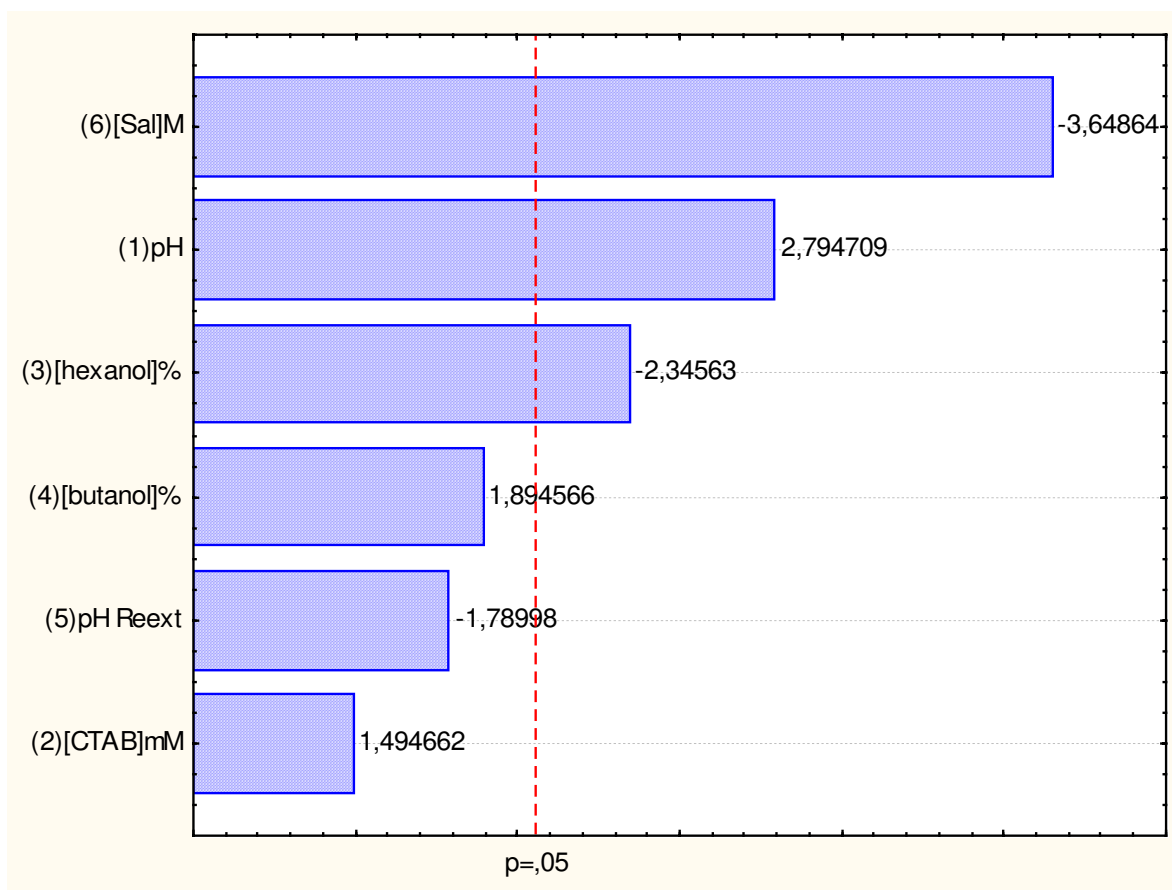
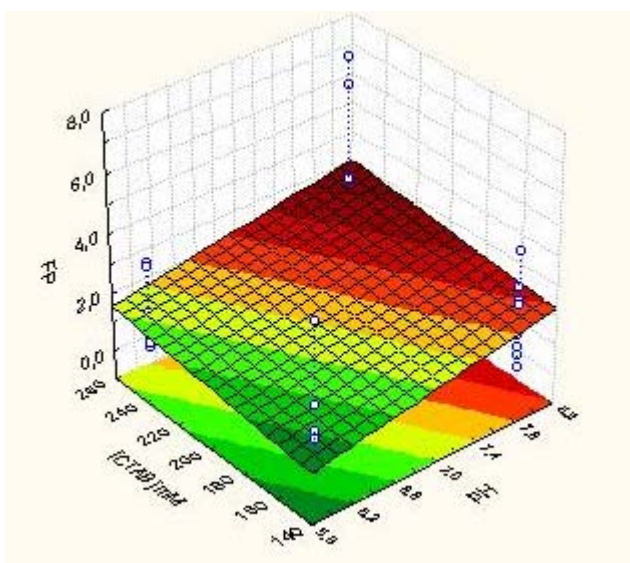
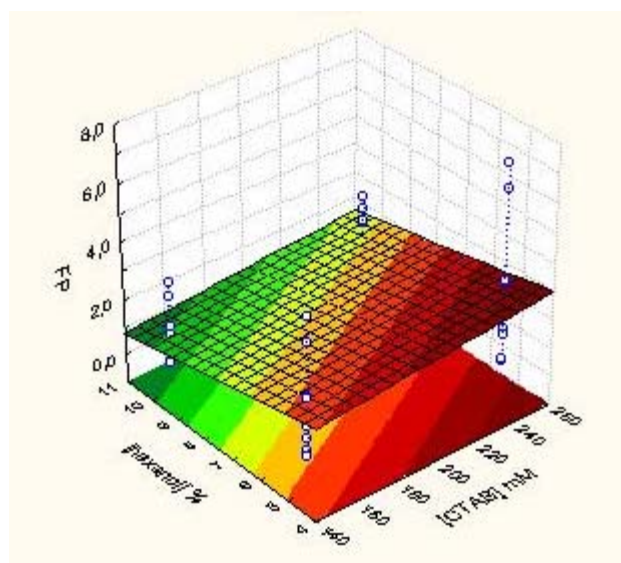


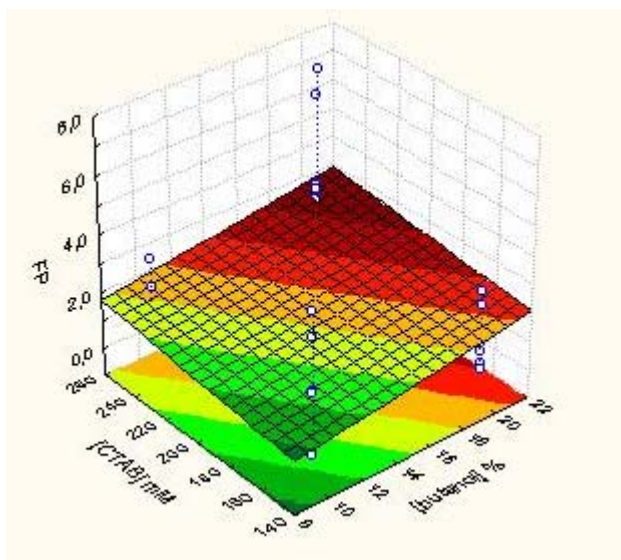
Figura 5.1 - Gráfico de Pareto para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico CTAB.



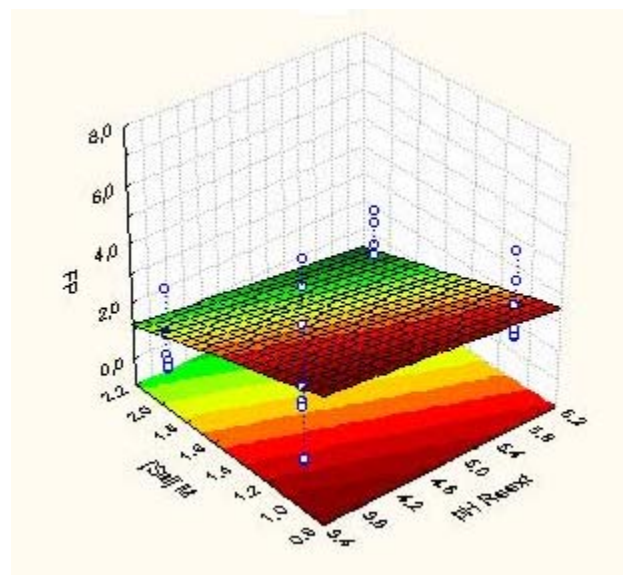
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 5.2 - Gráfico das superfícies de resposta para análise dos fatores que influenciam a extração batelada da bromelina com tensoativo catiônico CTAB.

O gráfico de Pareto da Figura 5.1 indica que as variáveis: concentração do butanol, pH de re-extração e concentração do CTAB não se apresentaram significativas ao processo.

A concentração do sal apresentou-se significativa ao sistema com valores de *t* de student negativo o que indica, conforme o gráfico 5.2d, que a resposta será intensificada para os níveis mínimos utilizados.

Na figura 5.2a, que representa a interação da variável concentração de CTAB com a variável pH os melhores valores de recuperação são obtidos com o uso destas variáveis em seu nível superior, condizendo com a literatura, a qual recomenda que o pH de extração por micelas reversas seja o maior possível em relação ao *pI*, pois nesse caso o número de cargas negativas da enzima será grande e a interação eletrostática com o tensoativo catiônico ficará favorecida (Qiang et al., 1998; Pessoa-Jr e Vitolo, 1998; Kilikian et al., 2000) e que também a bromelina é extraída da fase aquosa para o interior da micela reversa que possuem tamanho e quantidade suficiente para englobá-la, justificando o uso de concentração superior de tensoativo.

Para os co-solventes, foram verificados dois comportamentos distintos. O butanol apresentou pouca influência no sistema e o fator de purificação foi maior em seu maior nível (figura 5.2c). O hexanol, diferentemente do butanol, teve grande influência na extração da bromelina, sendo que os melhores resultados foram alcançados quando este co-solvente foi utilizado próximo ao seu limite mínimo (figura 5.2b).

5.3 Extração da Bromelina em Batelada com tensoativo BDBAC

A tabela 5.5 contém os valores de níveis mínimos e máximos utilizados no planejamento fatorial para extração da Bromelina com o tensoativo BDBAC.

Tabela 5.5 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial fracionário 2^{5-1} para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.

Fator	Nível (-1)	Nível (+1)
pH	6	8
[BDBAC] mM	100	200
% v/v Hexanol	5	10
pH Reextração	3,5	6
[NaCl] M	1	2

A faixa de pH utilizada para a extração da bromelina com o tensoativo BDBAC foi de pH 6-8, a mesma utilizada no CTAB, pois ambos são tensoativos catiônicos e a solubilização é favorecida em valores de pH superiores aos do ponto isoelétrico da proteína (Dekker et al., 1989), optou-se também por um intervalo de 2 unidades de pH.

A faixa de concentração de BDBAC e a porcentagem de hexanol adicionada foram também determinadas através de trabalhos anteriores (Hasmann, 2000).

A tabela 5.4 mostra a matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para a extração da bromelina com o tensoativo catiônico BDBAC, com os valores mínimos (-1) e máximos (+1) de forma codificada, com os seus respectivos resultados.

Tabela 5.6 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC e resposta (Fator de Purificação- FP) após a reextração.

Ensaio	pH	[BDBAC]	% Hexanol	pH Reextração	[NaCl]	FP (R1)	FP (R2)
1	-1	-1	-1	-1	1	0,929	1,015
2	1	-1	-1	-1	-1	1,714	1,716
3	-1	1	-1	-1	-1	0,121	0,730
4	1	1	-1	-1	1	0,846	0,733
5	-1	-1	1	-1	-1	1,285	1,556
6	1	-1	1	-1	1	3,291	1,940
7	-1	1	1	-1	1	0,771	0,584
8	1	1	1	-1	-1	0,948	0,766
9	-1	-1	-1	1	-1	0,000	0,000
10	1	-1	-1	1	1	0,555	0,051
11	-1	1	-1	1	1	0,214	0,000
12	1	1	-1	1	-1	0,000	0,000
13	-1	-1	1	1	1	0,248	0,000
14	1	-1	1	1	-1	0,843	0,193
15	-1	1	1	1	-1	0,000	0,000
16	1	1	1	1	1	0,615	1,013

O comportamento dos fatores de purificação foram estabelecidos em função do pH da extração, concentração de BDBAC na solução de extração, porcentagem de hexanol na solução de extração, pH da re-extração e concentração de sal da re-extração. No tratamento estatístico, realizado pelas ferramentas do programa "Statistica", estudou-se a influência de cada um destes parâmetros utilizados no processo.

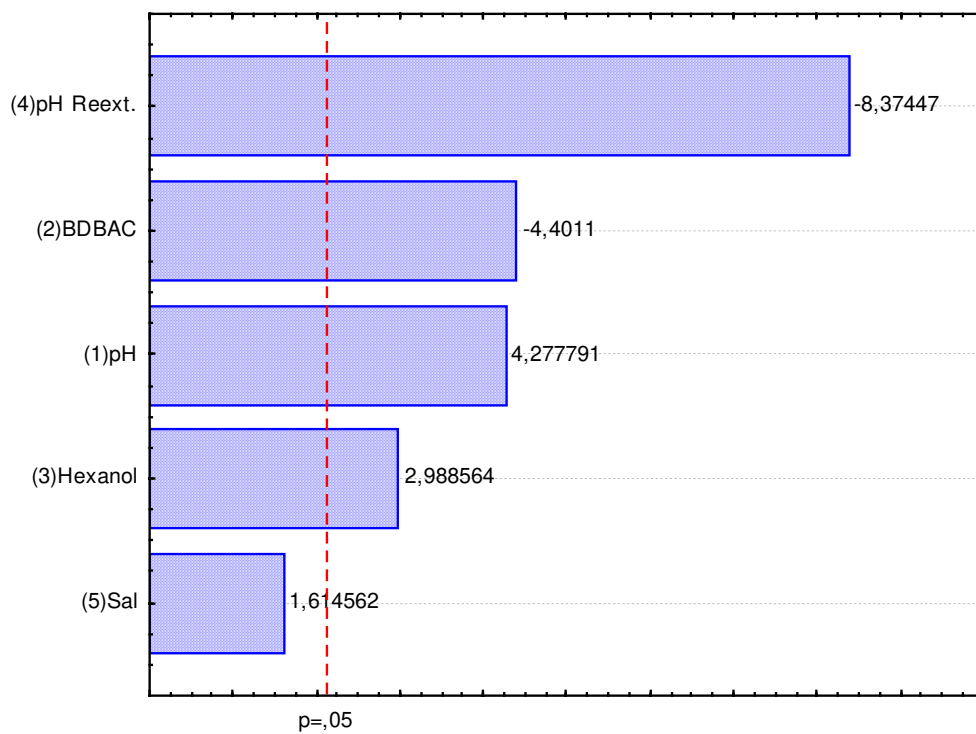
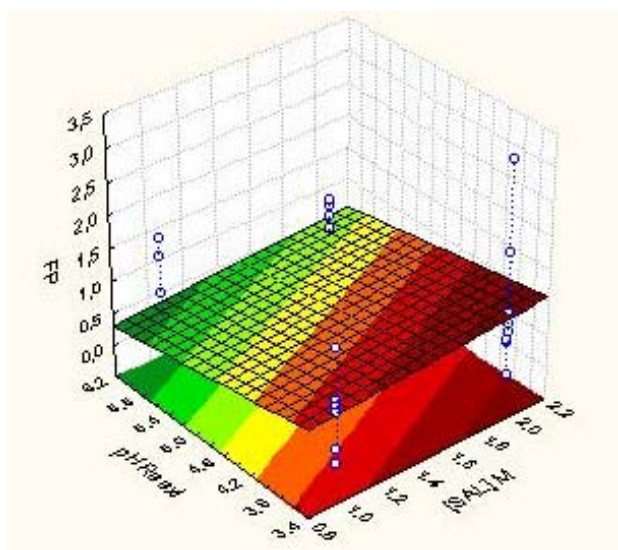
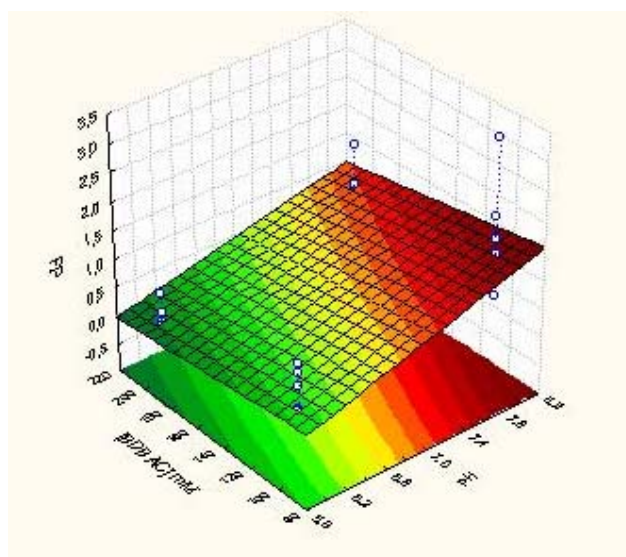


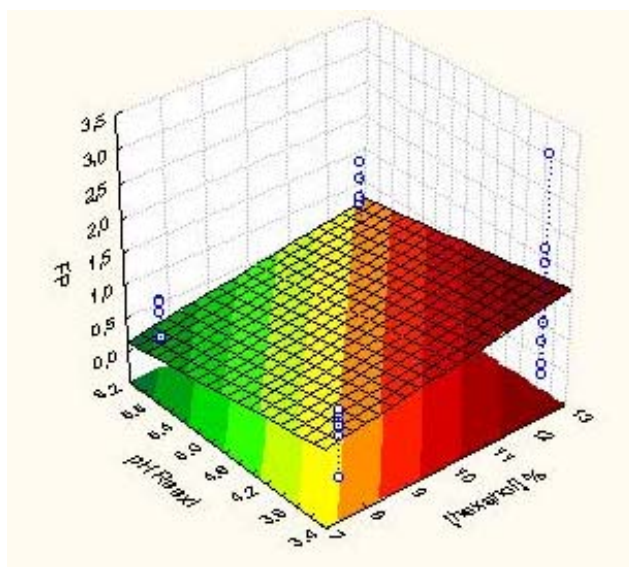
Figura 5.3 - Gráfico de Pareto para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.4 - Gráfico das superfícies de resposta para análise dos fatores que influenciam a extração batelada da bromelina com tensoativo BDBAC.

O gráfico de Pareto expresso na Figura 5.3 mostra que somente a concentração de sal na re-extração não é significativa ao processo, as demais variáveis são significativas. Observa-se que o pH de re-extração e a concentração de BDBAC apresentam valores negativos de *t* student indicando que para os níveis mínimos utilizados (-1), a resposta será intensificada (figura 5.2 a, b).

O pH de re-extração apresenta maiores fatores de purificação no menor nível (figura 5.4a), pois a distribuição de cargas da bromelina é positiva havendo uma repulsão do interior da micela que também tem carga positiva.

O fator de purificação foi maior no menor nível da concentração de BDBAC (figura 5.4b), pois a bromelina é uma enzima relativamente pequena 32,5 kDa, ficando encapsulada no interior da micela mesmo no menor nível de tensoativo. No nível alto a bromelina também se encontra encapsulada, mas o maior raio da micela dificulta a re-extração pois a micela não consegue reduzir seu volume o suficiente para expulsar a bromelina do seu interior.

O pH da extração apresenta um aumento no fator de purificação no maior nível (figura 5.4 b), pois quanto maior a diferença entre o ponto isoelétrico e o pH usado, mais negativa é a distribuição de cargas, ou seja, maior a atração da bromelina para o interior da micela.

Os co-solventes são adicionados aos sistemas de micelas reversas de tensoativos catiônicos para aumentar o tamanho das mesmas. Neste caso o nível alto, que leva a um aumento do fator de purificação (figura 5.4), é explicado porque aumenta o tamanho da micela na menor concentração de BDBAC favorecendo o encapsulamento da enzima.

A concentração de sal na re-extração não se mostrou significativa (Figura 5.4c), pois a solução de re-extração é composta de uma solução tampão adicionada de uma solução de sal que já é o suficiente para expulsar a enzima do seu interior, não fazendo diferença entre o seu nível mínimo e máximo.

5.3 Otimização do Processo de Extração em Batelada da Bromelina por Micela Reversa do Tensoativo BDBAC

Os resultados obtidos anteriormente mostraram que dentre os 5 fatores inicialmente estudados na extração da bromelina por micela reversa de BDBAC, apenas a concentração do sal não se mostrou significativa ao processo. Por uma questão de economia de reagentes fixou-se essa variável em seu nível mínimo. A melhor resposta encontrada foi no ensaio 6 (tabela 5.4) para valores de pH igual a 8, concentração de BDBAC 100mM e porcentagem de hexanol 10.

Com o objetivo de otimizar o processo de extração nesse sistema, empregou-se um planejamento fatorial completo 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central, sendo estudadas as variáveis: pH de extração, concentrações do BDBAC e hexanol.

A tabela 5.7 mostra os novos níveis utilizados na otimização e estão codificados em (-1), 0, e (+1), correspondendo respectivamente ao nível inferior, ponto central e nível superior.

Tabela 5.7 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial 2^3 com face centrada para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.

Fator	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
pH	7	8	9
[BDBAC] mM	50	100	150
% v/v Hexanol	7,5	10	12,5

Tabela 5.8 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central para extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC e resposta (Fator de Purificação- FP) após a Reextração.

Ensaio	pH	[BDBAC]	% Hexanol	FP (R1)	FP (R2)
1	-1	-1	-1	1,91	2,56
2	-1	-1	1	1,40	1,17
3	-1	1	-1	3,24	3,20
4	-1	1	1	1,04	1,16
5	1	-1	-1	5,63	5,75
6	1	-1	1	5,67	6,39
7	1	1	-1	0,80	0,74
8	1	1	1	6,59	6,36
9	-1	0	0	1,89	1,74
10	1	0	0	4,11	4,01
11	0	-1	0	5,81	6,15
12	0	1	0	2,24	1,89
13	0	0	-1	1,22	1,05
14	0	0	1	5,31	5,63
15	0	0	0	4,52	4,71
16	0	0	0	4,58	4,93
17	0	0	0	4,72	4,50
18	0	0	0	4,67	4,30

A tabela 5.6 mostra os resultados referentes ao fator de purificação da bromelina decorrentes do planejamento fatorial completo, com face centrada, juntamente com os valores codificados das variáveis: pH de extração, concentração de BDBAC e concentração de hexanol. É possível notar que os maiores valores de FP não foram obtidos no ponto central indicando que as interações quadráticas das variáveis não serão significativas, ou seja, as variáveis não se encontram em suas regiões ótimas.

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente, de acordo com o planejamento preestabelecido, para verificar o efeito dos fatores em estudo. A análise dos dados foi feita com o auxílio do "Statistica", utilizando como variável resposta o fator de purificação da enzima.

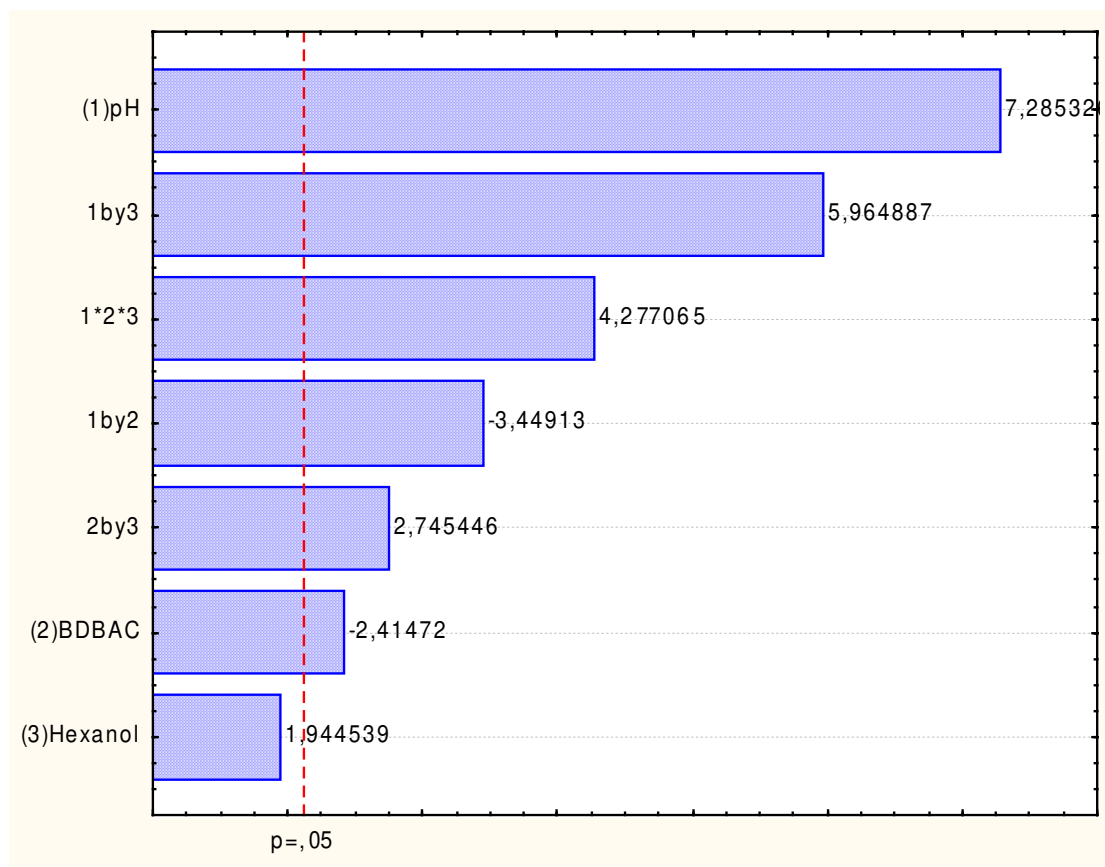


Figura 5.5 - Gráfico de Pareto para otimização da extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.

A partir da figura 5.5 é possível notar que os maiores valores para o fator de purificação (FP) foram encontrados nos maiores níveis de pH. O sinal negativo de t de student obtido para o efeito da variável concentração de BDBAC indica que a resposta é intensificada com a redução do nível desse fator. O modelo mostra também que as interações das variáveis são significativas, indicando que o nível de um fator interfere no nível do outro. A única variável não significativa ao processo foi à concentração de hexanol.

A tabela 5.9 apresenta os efeitos da extração da bromelina analisando-se a resposta fator de purificação, a qual confirma os efeitos significativos do gráfico de Pareto (figura 5.5).

Tabela 5.9 - Efeitos para otimização da extração em batelada da bromelina por micela reversa de BDBAC.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média	3,77332	0,155866	24,20872	0,000000
(1) pH	2,78149	0,381793	7,28533	0,000002
(2) BDBAC	-0,92192	0,381793	-2,41472	0,028084
(3) Hexanol	0,74241	0,381793	1,94454	0,069626
(1) / (2)	-1,31685	0,381793	-3,44913	0,003300
(1) / (3)	2,27735	0,381793	5,96489	0,000020
(2) / (3)	1,04819	0,381793	2,74545	0,014368
(1)*(2)*(3)	1,63295	0,381793	4,27706	0,000578

O modelo de 1ª ordem encontrado para a extração foi:

$$FP = -30,0745 + 4,6847x_1 + 0,576x_2 - 0,0785x_1x_2 - 0,1977x_1x_3 - 0,0481x_2x_3 + 0,0065x_1x_2x_3$$

Tabela 5.10 – Parâmetros da Análise de Variância (ANOVA) para Fator de Purificação

Fator	SQ	GL	MQ	Fcalc
Regressão	79,29385	6	13,21564207	43,91511285
Resíduo	9,32902	31	0,300936083	
Falta de Ajuste	8,54443	8	1,068053278	9,528990226
Erro Puro	0,78459	7	0,112084623	
Total	88,62287	36	2,461746416	

$$F_{tab_{0,95,6,31}} = 2,42$$

$$\frac{F_{cal}}{F_{tab}} = 18,15$$

$$F_{tab_{0,95,8,7}} = 3,73$$

$$F_{tab} < F_{cal}$$

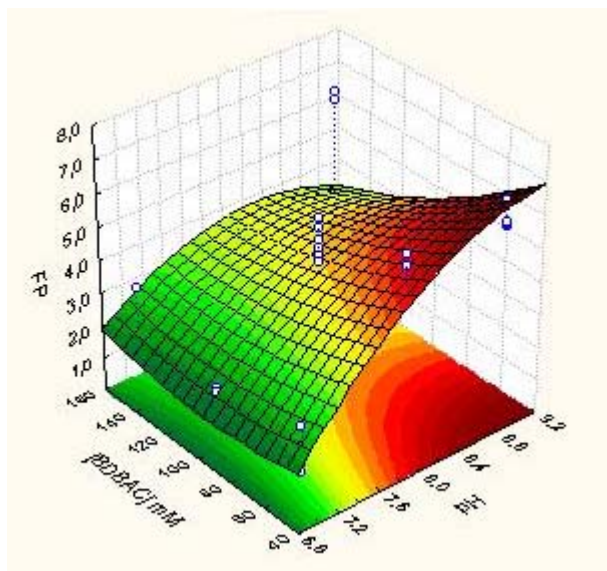
A tabela ANOVA (tabela 5.10) mostra que o modelo é bom, pois $\frac{F_{cal}}{F_{tab}} > 10$ e $R^2 = 0,89$, porém apresenta falta de ajuste $F_{tab} < F_{cal}$.

A tabela 5.11 trás valores comparativos ente os encontrados experimentalmente e os obtidos através do modelo proposto. Nota-se que os valores são muito próximos.

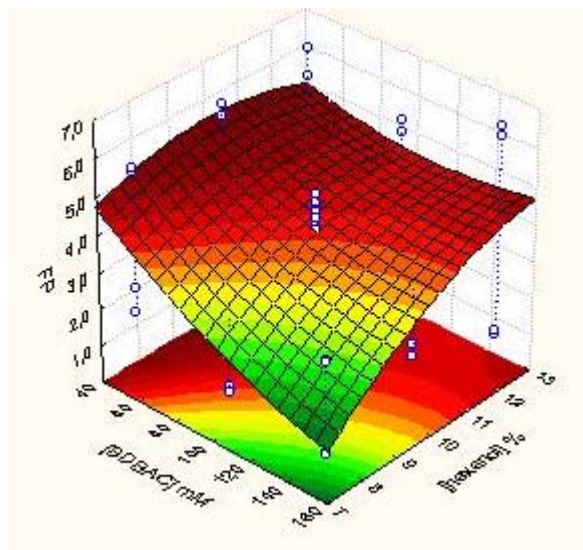
Tabela 5.11 – Tabela comparativa entre os valores de Fator de Purificação determinados experimentalmente e calculados pelo modelo encontrado.

x₁ (pH)	x₂ (BDBAC)	x₃ (Hexanol)	FP_{exp}	FP_{calc}
7	50	7,5	2,24	2,52
7	50	12,5	1,29	1,51
7	150	7,5	3,22	3,22
7	150	12,5	1,10	0,91
9	50	7,5	5,69	5,95
9	50	12,5	6,03	6,21
9	150	7,5	0,77	0,70
9	150	12,5	6,47	6,16
7	100	10,0	1,82	2,04
9	100	10,0	4,06	4,75
8	50	10,0	5,98	4,05
8	150	10,0	2,06	2,75
8	100	7,5	1,14	3,10
8	100	12,5	5,47	3,69
8	100	10,0	4,62	3,40
8	100	10,0	4,76	3,40
8	100	10,0	4,61	3,40
8	100	10,0	4,49	3,40

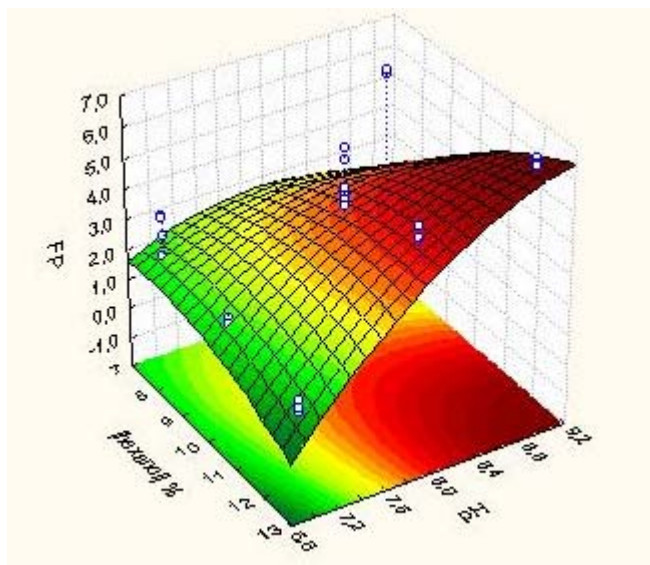
$$FP_{exp} = (R_1 + R_2)/2$$



(a)



(b)



(c)

Figura 5.6 - Gráfico das superfícies de resposta para otimização da extração em batelada da bromelina com tensoativo catiônico BDBAC.

A figura 5.6 mostra que o sistema tende a um ótimo em valores de pH superiores a 9 (máximo nível utilizado) e de concentração de BDBAC inferiores a 50 (mínimo nível utilizado). Desta forma, como a bromelina desnatura em pH superior a 10,3 e pode não correr a formação de micelas em concentrações de BDBAC inferiores a 50mM, temos uma região ótima delimitada por essas condições.

6. Conclusões

Os resultados alcançados no presente trabalho levam às seguintes conclusões:

1. Para as condições de extração da bromelina por micelas reversas estudadas, os tensoativos catiônicos BDBAC e CTAB promovem resultados satisfatórios de recuperação, no entanto o tensoativo aniônico AOT não se mostrou efetivo ao processo.
2. O melhor fator de purificação encontrado na extração descontínua da bromelina por micela reversa de CTAB foi em média 6,6 para pH=8, [CTAB]=250mM, %Hexanol=5, %Butanol=20, pH re-extração=3,5 e [NaCl]=1.
3. O melhor fator de purificação encontrado na extração descontínua da bromelina por micela reversa de BDBAC foi em média 6,47 para pH=9, [BDBAC]=150mM, %Hexanol=12,5, pH re-extração=3,5 e [NaCl]=1.
4. No sistema micelar de CTAB as variáveis concentração do butanol, pH de re-extração e concentração do CTAB não se apresentaram significativas ao processo, enquanto que no sistema micelar BDBAC apenas a concentração do sal na re-extração não foi significativa.
5. Os maiores valores de fator de purificação (FP) encontrados no sistema micelar CTAB foram aos níveis mínimos de concentração salina.
6. Os co-solventes utilizados na extração da bromelina por micela reversa de CTAB apresentaram comportamentos distintos, o butanol intensifica a resposta em seus níveis maiores enquanto o hexanol favoreceu as melhores respostas próximo ao seu limite mínimo.
7. Menores níveis de concentração de BDBAC levaram à maior fator de purificação da enzima em sistemas micelares desse tensoativo, já que a bromelina é uma enzima relativamente pequena, podendo ser encapsulada mesmo em menores concentrações do tensoativo.
8. Os resultados referentes ao fator de purificação da bromelina em sistema micelar de BDBAC decorrentes do planejamento fatorial completo, com face centrada mostraram que os maiores valores de FP não foram obtidos no

ponto central indicando que as interações quadráticas das variáveis não serão significativas, ou seja, as variáveis não se encontram em suas regiões ótimas.

9. A determinação de um ponto ótimo na extração descontínua da bromelina por micela reversa de BDBAC torna-se inviável porque o sistema é limitado a valores de pH onde não ocorra a desnaturação da enzima e concentração de tensativos onde haja formação de micelas.

Sugere-se para trabalhos posteriores a otimização da extração em batelada da bromelina por micela reversa do tensoativo catiônico CTAB.

7. Bibliografia

- Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. *Selective separation and purification of two lipases from Chromobacterium viscosum using AOT reversed micelles*. Biotechnology and Bioengineering, v.38, p.1302-1307, 1991.
- Aires-Barros, M.R.; Taipa, M.A.; Cabral, J.M.S. *Isolation and purification of lipases*. In: Wooley, P. Petersen, S.B. (eds). *Lipases: Their Structure, Biochemistry and application*. Cambridge University Press, G.B., p 234-270, 1994.
- Albery, W.J.; Choudhery, R.A.; Atay, N.Z.; Robinson, B.H. *Rotating diffusion cell studies of microemulsion kinetics*. J. Chem. Society Faraday Trans., v. 183, p. 2407-2419, 1987.
- Albertsson, P.A.; Tjerneld, F. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. John Wiley, 3rd., 1986.
- Asenjo, J.A.; *Aqueous two-phase for: I. Systems, principles and manipulation of selectivity. II. Processes and models..* São Paulo, 1994. Apostila Instituto de Pesquisas Tecnológicas.
- Arroyo-Reyna, A.; Hernández-Arana, A.; *The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model*. Biochimica and Biophysica Act, v. 1248, p. 123-128, 1995.
- Baldini, V.L.S.; Iaderoza, M.; Ferreira, E.A.H; Sales, A.M.; Draetta, I.S.; Giacomelli, E.J. *Ocorrência da Bromelina e cultivares do abacaxizeiro*. Colet. ITAL, v. 23, n. 1p. 44-55, Campinas, 1993.
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. *Otimização e planejamento de experimentos*. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 291p.
- Belter, P.A., Cussler, E.L., HU, W.S. *Biosseparoiton: downstrem processing for biotechnology*. Minneapolis, Jhn Wiley & Sons, 1988.
- Bertevello, L.C., *Estudo do Processo de Recuperação e Separação de Bromelina Utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas em Micro-Coluna de Extração*. Tese de Doutorado da Faculdade Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

- Bordi, F.; Cametti, C. *Water droplet charging process in water-in-oil microemulsions: an electrical conductivity study*. Colloid and Polymer Science, n.276, p. 1044-1049, 1998.
- Box, G.E.P., Hunter, G.W., Hunter, J.S. *Statistics for experimenters - an introduction to design, data analysis, and model building*. New York: John Wiley & Sons, 1978, 653p.
- Brandani, V., Di Giacomo, G., Spera, L. *Extraction of α -amylase protein by reverse micelles: II effect of pH and ionic strength*. Process Biochemistry, v.29, p.363-367, 1994.
- Brandani, V., Di Giacomo, G., Spera, L. *Recovery α -amylase extracted by reversed micelles*. Process Biochemistry, v.31, n.2, p.125-128, 1996.
- Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. *Reversed micelles in liquid-liquid extraction*. In: Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. (eds.). *Recovery Processes for Biological Materials*. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p.247-271.
- Calado, V.; Montgomery, D.C.; *Planejamento de experimentos usando o Statistica*. E-Papers Serviços Editoriais. Rio de Janeiro, 260p, 2003.
- Carlson, A.; Nagarajan, R.; *Release and recovery of porcine pepsin and bovine chymosin from reverse micelles: a new technique based on isopropyl alcohol addition*. Biotech. Progress, v. 8, p. 85-90, 1992.
- Castro, M.J.M.; Cabral, J.M.S. *Reversed micelles in biotechnological processes*. Biotech. Adv., v.6, p.151-167, 1988.
- César, A.C.W., *Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da Bromelina presente no abacaxi*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2000.
- César, A.C.W., Silva, R. e Lucarini, A.C. *Recuperação das Enzimas Proteolíticas Presentes nas Casca e Talo do Abacaxi*. RIC, 01, 47-54, São Carlos, 1999.
- César, A.C.W.; *Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2005.
- Chang, P.S.; Rhee, J.S. *Characteristics of Chromobacterium viscosum lipase-characterized glycerolysis of triglycerides in AOT-Isooctane reversed micelles*. Biocatalysis, n. 4, p. 253-335, 1990.

- Chang, Q.; Chen, J.; *Reversed micellar extraction of trypsin: effect of solvent on the protein transfer and activity recovery*. Biotech. Bioeng., v. 46, p. 172-174, 1995.
- Chang, Q.; Liu, H.; Chen, J.; *Extraction of lysozyme, α -chymotrypsin and pepsin into reverse micelles formed using an anionic surfactant, isooctane and water*. Enzyme Microb. Technol., n. 16, p. 970-973, 1994.
- Chen Y.J., Xu G.Y., Yuan S.L., Sun, H.Y.; “*Molecular dynamics simulations of AOT at isooctane/Water interface.*” Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects 273(1-3):174-178, 2006.
- Cortez E.V., Pessoa A., Felipe M.D.D., Roberto L.C., Vitolo M.; “*Optimized extraction by cetyl trimethyl ammonium bromide reverse micelles of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from Candida guilliermondii homogenate.*” Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 807(1): 47-54, 2004.
- Creagh, A.L.; Prausnitz, J.M.; Blanch, H.W. *Structural and catalytic properties of enzymes in reverse micelles*. Enzyme Microb. Technol., n. 5, p. 383-392, 1993.
- Cybenko, G., “Aproximations by superpositions of a sigmoidal function”, Math. Control Signal Systems, 2,303 (1989).
- Dahuron, L.; Cussler, E.L.; *Protein Extractions with hollow fibers*. AIChE Journal, v. 34, p. 130-136, 1988.
- Dekker, M.; Van't Riet, K.; Baltussen, J.W.A.; Bisjsterboch, B.H.; Laane, C. *Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reversed micelles*. Chem. Eng. Journal, 33, B27-B33, 1986.
- Dungan, S.R.; Bausch, T.; Hatton, T.A.; Plucinski, P.; Nitsch, W. *Interfacial transport process in the reversed micellar extraction of proteins*. J. Colloid Interface Sci, v. 145, p. 33-50, 1991.
- El-Gharbawi, M.; Whitaker, J.R. *Fractionation and partial characterization of the proteolytic enzymes of stem bromelain*. Biochemistry, v. 2, n. 3, p. 476-481, 1963.
- Ferreira F.L.P., Taqueda M.E., Converti A., Vitolo M., Pessoa A.; “*Purification of glucose oxidase from Aspergillus niger by liquid-liquid cationic reversed micelles extraction.*” Biotechnology Progress 21(3): 868-874, 2005.

- Ferreira F.L.P., Taqueda M.E., Vitolo M., Converti A., Pessoa A.; “*Liquid-liquid extraction of commercial glucose oxidase by reversed micelles.*” *Journal of Biotechnology* 116(4): 411-416, 2005.
- Fossum, K., *Proteolytic enzymes and biological inhibitors-I. Comparasion between the Kunitz Method and agar Gel Casein precipitating reaction for determination of the activity of some Commercial proteolytic enzymes and inhibitors.* *Acta Path. Microbiol. Scand.*, seção B: 78, p. 350-362, 1970.
- Göklen, K.E.; Hatton, T.A. *Liquid-liquid extraction of low molecular weight proteins by seletive solubilization in reversed micelles.* *Separation Sci. Technol*, v.22, p 831-841, 1987.
- Göklen, K.E.; Hatton, T.A. *Liquid-liquid extraction of protein using reverse micelles.* In: *Proceedings, ISEC’86, Munich*, v. 3, p. 587-595, 1986.
- Göklen, K.E.; Hatton, T.A. *Protein extraction using reverse micelles.* *Biotechnol. Prog.*, n. 1, p. 69-74, 1985.
- Goto, M., Ono, T., Nakashio, F., Hatton, T.A. *Design of surfactants suitable for protein extraction by reversed micelles.* *Biotechnology and Bioengineering*, v.54, n.1, p.26-32, 1997.
- Hale L.P., Greer P.K., Trinh C.T., James C.L.; “*Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations*”. *International Immunopharmacology* 5, 783–793, 2005.
- Han, D.: Rhee, J.S. *Characteristics of lipase catalysed hidrolysis of olive oil in AOT-Isooctane reverse micelles.* *Biotechnol. Bioeng.*, v. 28, p. 1250-1256, 1986.
- Hanson, C., *Recents Advances in Liquid-Liquid Extraction.* New York. Pergamon Press, 1971.
- Hasmann F.A., Cortez D.V., Junior A.P., Roberto I.C.; “*Optimization of beta-xylosidase recory by reversed micelles using response surface methodology.*” *Electronic Journal of Biotechnology* 6(2): 153-160, 2003.
- Hasmann, F.A., *Extração líquido-líquido de β -xilosidade por micelas reversas.* Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Fenquil, Lorena, 2000.
- Hatton, T.A. *Extraction of proteins and amino acids using reversed micelles.* In: *Ordered media in chemical separations ACS Symp. Series*, v. 342, p. 170-183, Hinze, W.L. e Armstrong, D.W. (Eds.), 1987.

- Hentsch, M.; Menoud, P.; Steiner, I.; Flaschel, E.; Renken, A. *Optimization of the surfactant (AOT) concentration in a reverse micellar extraction process*. Biotechnology Techniques, v.6, nA, p.359-354, 1992.
- Huang, S.Y.; Lee, V-C. *Separation and purification of horseradish peroxidase from Armoracia rusticana root using reversed micellar extraction*. Bioseparation, v.4, p.1-5, 1994.
- Jolival, C., Minier, M., Renon, H. *Extraction of cytochrome C in sodium dodecylbenzenesulfonate microemulsions*. Biotechnology Progress, v.9, p. 456-461, 1993.
- Kamyschny A., Trofimova D., Magdassi S., Levashov A.; "Native and modified glucose oxidase in reversed micelles." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 24(3-4): 177-183, 2002.
- Kennedy, J.F.; Cabral, J.M.S.; *Recovery processes for biological materials*. J. Wiley, London, 1993.
- Kilikian, B.V.; Bastazin, M.R.; Ninami, N.M.; Gonçalves; E.M.R.; Junior, A.P. *Liquid-Liquid Extraction by Reversed Micelles in Biotechnological Process*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v.17, n.1, p.29-38, 2000.
- Krei, G.A, Hustedt, H. *Extraction of enzymes by reverse micelles*. Chemical Engineering Science, v.47, n.1, p.99-111, 1992.
- Krei, G.A, Meyer, U., Borner, B., Hustedt, H. *Extraction of α -amylase using BDBAC reversed micelles*. Bioseparation, v.5, p.175-183, 1995.
- Kumar, A.; Hartland, S., *Prediction of Dispersed Phase Holdup in Pulsed Perforated Extraction Columns*, Chem. Eng. Process, 23, 41-59, 1988.
- Kunitz, M.; "Isolation of a Crystalline Protein Compound of Trypsin and of Soybean Trypsin-Inhibitor". J. Gen. Physiol. 30 (4): 311-320 1947.
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. *Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents*. Biotech. Bioeng., v. 30, p. 81-87, 1987.
- Lahore, H.M.F.; Miranda, M.V.; Fraile, E.R.; Bonino, M.J.B.J.; Cascone, O. *Partition behaviour and purification of a Mucor bacilliformis acid proteases in aqueous two-phase systems*. Process Biochemistry, v. 30, p. 615-621, 1995..
- Lehninger, A.L., *Princípios de Bioquímica*, Savier, 1995.

- Leser, M.E.; Mrkoci, K.; Luisi, L.P. *Reverse micelles in protein separation: the use of silica for the back transfer process*. Biotech. Bioeng., v. 41, p. 482-489, 1993.
- Leser, M.E.; Wei, G.; Luisi, L.P.; Maestro, M. *Application of reverse micelles for the extraction of proteins*. Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 153, p. 629-635, 1992.
- Liu, D.J.; Ma, J.M.; Cheng, H.M.; Zhao, Z.G. *Investigation on the conductivity and microstructure of AOT non-ionic surfactants water n-heptane mixed reverse micelles*. Colloids and Surfaces, n. 135, p. 157-164, 1998.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265.
- Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P., Robinson, B.H. *Reversed micelles as hosts for proteins and small molecules*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v.947, p.209-246, 1988.
- Luisi, P.L.; Bonner, F.J.; Pellegrini, A.; Wiget, P.; Wolf, R. *Micellar solubilization of proteins in aprotic solvents and their spectroscopic characterization*. Helv. Chim. Acta, v. 62, p. 740-752, 1979.
- Luisi, P.L.; Magid, L.J. *Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions*. CRC Crit. Rev. Biochem., v. 20, p. 409-474, 1986.
- Lundgren, J.S.; Watkins, A.N.; Bright, F.V.; *Effects of water loading on fluorescein/anti-fluorescein antibody system in aerosol-OT reverse micelles formed n-heptane*. Applied Spectroscopy, n.52, p.96-100, 1998.
- Mandal, D.; Datta, A.; Pal, S.C.; Bhattacharyya, K. *Solvation dynamics of 4-aminophthalimide in water-in-oil microemulsion of Triton X-100 in mixed solvents*. Journal of Phys. Chem. B., v. 45, n. 102, p. 9070-9073, 1998.
- Marcozzi, G.; Correa, N.; Luisi, P.L.; Caselli, M. *Protein extraction by reversed micelles: a study of the factors affecting the forward and backward transfer of α -chymotrypsin and its activity*. Biotech. Bioeng., v. 378, p. 1239-1246, 1991.
- Martinek, K.; Klyachko, N.L.; Kabanov, A.V.; Khmelnitsky, Y.L. and Levashov, A.V. *Micellar enzymology: its relation to membranology*. Biochem. Biophys. Acta, v. 981, p. 161-172, 1989.
- Martinek, K.; Levashov, A.V.; Klyachko, N.L.; Khmelnitsky, Y.L. and Berezin, L.V. *Micellar enzymology*. Euro. J. Biochem, v. 155, p. 453-468, 1986.
- Matzke, S.F.; Creagh, A.L.; Haynes, A.C.; Prausnitz, J.M.; Blanch, H.W. *Mechanisms of protein solubilization in reverse micelles*. Biotech. Bioeng., v. 40, p. 91-102, 1992.

- Medina, J.C.; Bleiintroth, W.E.; Hashizume, T.; *Abacaxi – da cultura ao processamento e comercialização*, ITAL, 1978
- Meyer, U. *Extraktion von Enzymen Mittels Inverser Mizellen*. Braunschweig: Technische Universität Braunschweig, 1992. 58p. (Tese de Graduação)
- Monteiro T.I.R.C., Porto T.S., Carneiro-Leão A.M.A., Silva M.P.C., Carneiro-da-Cunha M.G.; “*Reversed micellar extraction of na extracellular protease from Nocardiosis sp fermentation broth.*” *Biochemical Engineering Journal* 24(1): 87-90, 2005.
- Murachi, T. Bromelain enzymes. In: Lorand, L. *Methods in Enzymology*, v.XLV, p. 475-85, New York, Academic Press, 1976.
- Nishii Y. Kishi Y., Ito M., Morita Y., Kanoh A., Shintani M., Kinugasa T., Nii S., Takahashi K.; “*Effect of cation species on equilibrium of reversed micellar extraction of lysozyme.*” *Separation and Purification Technology* 37(2): 161-167, 2004.
- Nishiki, T.; Muto, A.; Kataoka, T.; Kato, D. *Back extraction of proteins from reversed micellar to aqueous phase: partitioning behaviour and enrichment*. *Chemical Engineering Journal and Biochemical Engineering Journal*, v. 59, p. 297-301, 1995.
- Nitin, W.F.; Luisi, P.L. *Immobilized enzymes in reverse micelles: studies with gel entrapped trypsin and α -chymotrypsin AOT reverse micelles*. *Biotech. Bioeng.*, v. 33, p. 1277-1282, 1989.
- Pacheco R., Karmali A., Matos-Lopes M.L., Serralheiro M.L.; “*Amidase encapsulated in Ttab reversed micelles for the study of transamidation reactions.*” *Biocatalysis and Biotransformation* 23(6): 407-414, 2005.
- Paradkar, V.M.; Dordick, J.S. *Mechanisms of extraction of chymotrypsin into isooctane at very low concentrations of Aerosol-OT in absence or reverse micelles*. *Biotech. Bioeng.*, v.43, p. 529-540, 1994.
- Park Y.K., *Produção de Enzimas Industriais de Origem Vegetal*. *Biotecnologia Industrial* V3, São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 2001.
- Patel, M.T., Nagarajan, R., Kilara, A. *Interactive influence and optimization of reaction parameters in the hydrolysis of olive and coconut triacylglycerols by C.*

- cy/indracea* and *R. javanicus* lipases in reverse micellar media. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.59, p.109-124, 1996.
- Porto T.S., Monteiro T.I.R., Moreira K. A., Lima J.L., Silva M.P.C., Porto A.L.F., Carneiro-da-Cunha M.G.; “*Liquid-liquid extraction of na extracelular alkaline protease from fermentation broth using aqueous two-phase and reversed micelles Systems.*” World Journal of Microbiology & Biotechnology 21(5): 655-6559, 2005.
- Puchkaev A.V., Vlasov A.P., Metelitz D.I.; “*Stability of glucose 6-phosphate dehydrogenase complexed its substrate or cofactor in aqueous and micellar environment.*” Applied Biochemistry and Microbiology 38(1): 36-44, 2002.
- Quantrille, T.E., Liu, Y.A.,”Artificial Inteligence in Chemical Engineering”, Academic Press, Inc., 1991.
- Rabelo, A.P.B., *Estudo e Desenvolvimento de uma Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes para a Purificação de Proteína.*, Tese de Doutorado da Faculdade Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- Regalado, C., Asenjo, J.A., Pyle, D.L. *Studus on the purification of peroxidase from horseradish roots using reversed micelles.* Enzyme and Microbial Technology, v.18, p.332-339, 1996.
- Regalado, C.; Asenjo, J.A.; Pyle, D.L. *Protein extraction by reversed micelles: studies on the recovery of horseradish peroxidase.* Biotech. Bioeng., v. 44, p 674-681, 1994.
- Rodrigues, E.M.G. *Extração líquido-líquido de Xilanase por Micela Reversa*, Lorena, FAENQUIL, 1997 (Dissertação de Mestrado).
- Rowan, A.D.; Buttle, D.J. and Barrett, A.J. *The cysteine proteinases of the pineapple plant.* Biochemical Journal, v.266, n.3, p. 869-75, 1990.
- Ruckenstein, E.; Karpe, P. *On the enzymatic superactivity in ionic reverse micelles.* Journal of Colloid and Interface Sci., v.139, n.2, p. 408-436, 1990.
- Seoud, O.A, Sanctis, D.S., Palma, E.J. *Tensoativos: Química e aplicações em cosméticos e detergentes.* São Paulo: ABQ, 1999. (Apostila do Curso de Tensoativos)
- Shipovskov S., Trofimova D., Saprykin E., Christenson A., Ruzas T., Levashov A.V., Ferapontova E.E.; “*Spraying enzimes in microemulsions of AOT in nonpolar organic solvents for fabrication of enzyme electrodes.*” Analytical Chemistry 77(21): 7074-7079, 2005.

- Shukla A., Neubert R.H.H.; “*Investigation of w/o microemulsion droplets by contrast variation scattering.*” *Pramana-Journal of Physics* 65(6): 1097-1108, 2005.
- Suh, H. J.; Lee, H.Y. and Yang, H.C. *Purification and characterization of Bromelain isolated from pineapple.* *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society*, v.35, n.4, p.300-7, 1992.
- Testard F., Zemb T.; “*Interpretation of phase diagrams: topological and thermodynamical constraints.*” *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* 205(1-2): 3-13, 2002.
- Volpe, P.L.O.; Silva Filho, E.A. *Calorimetric study of SDS micelle formation in water and in NaCl solution at 298 K.* *Termochimica Acta*, n. 257, p.59-66, 1995.
- Walter, H.E., “*Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates*”. In: Bergmeyer. H.U. Ed., *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 270–277, 1984.
- Yang Z. Robb D.A.; “*Tyrosinase activity in reversed micelles.*” *Biocatalysis and Biotransformation* 23(6): 423-430, 2005.
- Yao C.Y., Tang S.K., He Z.M., Deng X.; “*Kinetics of lipase-catalysed hydrolysis of olive oil in AOT/isooctane reversed micelles.*” *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 35(4-6): 108-112, 2005.
- Yao C.Y., Tang S.K., Zhang J.H., Yu Y.T.; “*Kinetics of lipase deactivation in AOT/isooctane reversed micelles.*” *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 18(4-6): 279-284, 2002.
- Zamarro, M.T., Domingo, M.J., Ortega, F., Estrada, P.; “*Recovery of cellulolytic enzymes from wheat-straw hydrolysis broth with dioctyl sulphosuccinate / iso-octane reverse micelles.*” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.23, p.117-125, 1996.
- Zellner M, Winkler W, Hayden H, Diestinger M, Eliassen M, Gesslbauer B, Miller I, Chang M, Kungl A, Roth E, Oehler R; “*Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets*” *Electrophoresis* (12): 2481-2489 Jun 2005.
- Zheng W.J., Wang D., Huang X.R., Qu Y.B., Gao P.J.; “*Effects of normal alcohols on the catalytic activity of lignin peroxidase in reversed micelles.*” *Acta Chimica Sinica* 63(21): 2009-2012, 2005.

APÊNDICE A

Descrição do método para determinação de proteínas totais - Método de Lowry (1951)

Reagentes:

Solução I: sulfato de cobre penta hidratado 1% (m/v) em água deionizada

Solução II: tartarato de sódio e potássio 2% (m/v) em água deionizada

Solução III: carbonato de sódio 2% (m/v) dissolvido em solução de hidróxido de sódio 0,1N

Solução IV: SDS 1% (m/v) em água deionizada

Solução de Folin Ciocalteu: diluir 1:1 em água deionizada para obtenção de concentração final de 1N.

Misture: 1 mL da sol. I, 1 mL da sol. II, 10 mL de sol. IV e 88mL da sol. III

Procedimento:

Em tubos de ensaio limpos, secos adicionou-se 200 µL da amostra + 2 mL da solução fresca, agitou-se o tubo por 5 segundos em vórtice.

Deixou-se em repouso por 10 minutos, adicionou-se então 200 µL de solução de folin, agitou-se os tubos por 5 segundos em vórtice, deixou-se em repouso por 30 minutos. Fez-se as leituras em espectrofotômetro a 578 nm. Utilizou-se como padrão BSA.

APÊNDICE B

Descrição do método para a determinação da atividade proteolítica – Caseína .

A determinação da atividade proteolítica pode ser realizada conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ (1947) e WALTER (1984), como está descrito a seguir:

Reagentes:

1. NaOH 1 M: Dissolver 4 g de NaOH em 100 mL de água (destilada ou deionizada).
2. Tampão fosfato 1 M, pH 7,5, dissolver:
 - a. 34 g de KH_2PO_4 em 250 mL de água.
 - b. 43,5 g de K_2HPO_4 ou 57 g $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ em 250 mL de água.Juntar (b) com (a) e ajustar o pH para 7,5.
3. Ácido clorídrico, HCl 1 M: Adicionar 9,8 mL de HCl (a pelo menos 32%) em 72 mL de água.
4. Preparo do substrato tamponado.

4.1 Solução tamponada de caseína (2% m/v; fosfato 0,1 M, pH 7,5):

Suspender 2 g de caseína com cerca de 5 mL de água em um frasco volumétrico, adicionar NaOH (1), cerca de 30 mL de água e mexer bem com agitador magnético até que a caseína esteja completamente dissolvida. Adicionar 5 mL de tampão fosfato (2) para clarear a solução. Ajustar o pH 7,5 com HCl (3) e diluir para 100 mL com água. Solução estável por 1 semana.

5. HCl 0,05 mol/L: Diluir 1 mL da solução (3) com 19 mL de água.
6. Solução estoque de tirosina (5 mmol/L): dissolver 45,3 mg de tirosina em 50 mL da solução de HCl (5) - S_0 . Diluir para 3 (P_0), 2 (P_1), 1 (P_2), 0,5 (P_3) e 0,25 (P_4) mM com a solução (5). Homogeneizar a solução antes de diluir.
7. Ácido tricloroacético (TCA) 0,3 mol/L: Dissolver 4,9 g de TCA em 100 mL de água (ou diluir 30 mL de TCA 15% para 90 mL).
8. NaOH 0,5 mol/L: Diluir 50 mL da solução (1) em 50 mL de água.

Procedimento

Pipetar em tubos de centrífuga separados: 2,5 mL de solução de substrato (4.1) nos tubos T e B_3 , 2,5 mL de solução de HCl (5) em B_1 e B_2 e 2,5 mL de cada solução padrão de tirosina (6) (Padrões - P_0 , P_1 , P_2 , P_3 , P_4).

Deixar em banho por 3 a 5 minutos em temperatura de 37°C.

Adicionar 0,2 mL da amostra (enzima) aos tubos T e B₁, e 0,2 mL de HCl 0,05 M

(5) aos demais.

Misturar e deixar incubando por 10 minutos a 37°C.

Ao fim do tempo adicionar 5 mL de TCA (7a).

Misturar e adicionar 0,2 mL de amostra ao branco.

Deixar em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente.

Remover o precipitado por filtração ou centrifugação por 20 minutos a 2300 g.

Medida da Atividade

Ler a variação de absorbância a 280 nm (no filtrado ou sobrenadante).

- Absorbância da amostra: A_T
- Absorbância do branco B₁: A_{B1}
- Absorbância do branco B₃: A_{B3}
- Através de A_T - A_{B1} - A_{B3}, encontra-se, na curva de calibração, a concentração de tirosina, C_{tir}, produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 minutos a 37°C.

O resultado final, em atividade enzimática, é dado por:

$$\text{Atividade} = 0,02 \cdot C_{\text{tir}} \quad (\mu\text{mol/min})$$