

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Faculdade de Engenharia Química - FEQ

Área de Concentração de Sistemas de Processos Químicos e Informática

**Extração e caracterização da enzima bromelina presente no resíduo
do curauá (*Ananas erectifolius* L. SMITH).**

Autora: Juliana Ferrari Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia
Química como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química.

CAMPINAS – SÃO PAULO

SETEMBRO / 2011

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

Ferreira, Juliana Ferrari

Extração e caracterização da enzima bromelina presente no resíduo do curauá (*Ananas Erectifolius* L.Smith) / Juliana Ferrari Ferreira. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bromelina. 2. Enzimas. 3. Extração (Química). I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Bromelain extraction and characterization from curauá starch
(*Ananas Erectifolius* L.Smith)

Palavras-chave em Inglês: Bromelain, Enzymes, Extraction (Chemical)

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Doutor Engenharia Química

Banca examinadora: Juliana Moura de Luna, Márcia de Souza Araki, Ana Paula
Brescancini Rabelo, Luiz Carlos Bertevello

Data da defesa: 23-09-11

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

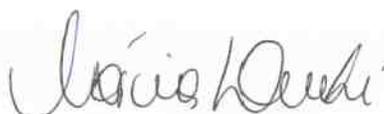
Tese de Doutorado , defendida por Juliana Ferrari Ferreira, em 23 de setembro de 2011 , e aprovada pela banca examinadora:



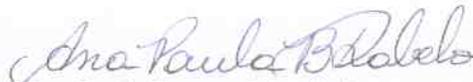
Dr. Elias Basile Tambourgi – orientador

Juliana Moura de Luna

Dra. Juliana Moura de Luna



Dra. Márcia de Souza Araki



Dra. Ana Paula Brescancini Rabelo



Dr. Luiz Carlos Bertevello

Esta versão corresponde a final da Tese de Doutorado , defendida por
Juliana Ferrari Ferreira em 23 de setembro de 2011.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'E' followed by a cursive name.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial, aos meus pais, Deusdele e Maria Lúcia e ao meu irmão Rogério.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao professor e amigo Elias Basile Tambourgi, pela orientação, amizade, paciência, dedicação, confiança, incentivo e pelas oportunidades durante todo o desenvolvimento deste trabalho, de extrema importância e de grande contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Isaac Stringueta Machado, da Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Departamento de Ciências Ambientais da UNESP, pelo fornecimento das folhas de curauá, pela confiança, incentivo e apoio durante todo o trabalho.

A toda minha família, em especial aos meus pais, Deusdele Antonio Ferreira e Maria Lúcia Ferrari Ferreira, e ao meu irmão Rogério, por servirem de espelho para a minha educação e caráter e por todo amor, carinho, paciência, apoio e incentivo.

Ao Marcus, por todo amor, carinho, paciência, companheirismo e incentivo.

A minha grande amiga, que sempre me incentivou e apoiou, Giovana da Silva Padilha.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Processos de Separação, Diego, Edgar, Iara, José Carlos, Petrus e Thayse, por toda a ajuda, paciência, incentivo, amizade e dedicação a mim dispensados durante este trabalho, em especial, aos meus amigos, Dalva e Kleber, companheiros de bancada, que dividiram comigo bons momentos de pesquisa e muitos desafios.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Engenharia Química e Sistemas Químicos (DESQ) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A todos os amigos, que de uma forma ou outra colaboraram para a realização deste trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro.

Obrigada a Todos! Serei sempre muito grata a vocês!

RESUMO

O curauá (*Ananas Erectifolius* L.B. Smith) é uma espécie vegetal pertencente à família das Bromeliáceas. Ocorre nos estados do Pará, Amazonas, Amapá e Acre. Possui duas variedades, a roxa e a branca, e suas fibras são utilizadas na indústria automobilística e têxtil devido sua resistência, maciez e peso reduzido, podendo ainda ser utilizada como celulose e ração animal. Atualmente, apenas a fibra é utilizada na indústria, o restante é considerado resíduo. Porém, este resíduo contém compostos com propriedades importantes a serem descobertas e estudadas. Um complexo enzimático encontrado neste resíduo é a bromelina, que faz parte de um grupo de enzimas proteolíticas, usadas na indústria alimentícia e como medicamento. Hoje seu uso está voltado para a indústria farmacêutica, na produção de pomadas, géis, cremes e loções, pois oferecem um amplo espectro de eficácias terapêuticas: antiédemas, antiinflamatórias e atividades fibrinolíticas. Este trabalho teve como objetivo extrair e caracterizar o conjunto de enzimas bromelina presente no extrato do curauá antes e depois da purificação em sistema bifásico aquoso PEG/Fosfato de potássio. Foram utilizados vários sistemas bifásicos aquosos PEG/fosfato, já que fatores como pH, temperatura e massa molar do polímero interferem diretamente no fator de purificação da amostra. Os resultados da extração e caracterização mostraram que as condições ótimas de trabalho, ou seja, onde a atividade enzimática é máxima, são pH 8,5 e temperatura 30° para o curauá branco e pH 8,5 e 35°C de temperatura para o curauá roxo antes da purificação. A massa molar é de 24kDa e o melhor sistema de partição da bromelina foi o SBA PEG 4000 em pH 9. Depois da purificação em sistema bifásico aquoso realizou-se novamente a caracterização da enzima, mostrando valores de pH ótimo 8,5, tanto para o curauá branco quanto para o roxo e temperatura ótima de trabalho de 32°C para o curauá branco e 35°C para o roxo. A quantidade de proteínas totais foi medida pelo reagente de Bradford e a atividade enzimática pelo reagente de Biureto. A solução enzimática dos melhores sistemas contém 7 U de bromelina e aproximadamente 17 mg/L de proteína total medida por Bradford (curauá branco) e 6 U de bromelina e aproximadamente 23 mg/L de proteína total (curauá roxo) do extrato bruto.

Palavras chave: Extração, caracterização, Bromelina, Curauá.

ABSTRACT

The curauá (*Ananas erectifolius* LB Smith) is a species belonging to the family *Bromeliaceae*. Occurs in the states of Para, Amazonas, Amapá, Acre, Mato Grosso and Goiás, has two varieties, purple and white, and its fibers are used in automotive and textile industries due to its strength, softness and lightweight and can also be used as animal food. Currently, only the fiber is used in industry, the rest is considered waste. However, this residue contains compounds with important properties to be discovered and studied. An enzyme complex found in this residue is bromelain, which is part of a group of proteolytic enzymes, used in the food industry and as a medicine. Today its use is aiming the pharmaceutical industry, the production of ointments, gels, creams and lotions because they offer a wide range of therapeutic efficacies: antiedemas, anti-inflammatory, antithrombotic and fibrinolytic activities. This study aimed to extract and characterize the bromelain present in the curauá extract before and after purification in aqueous two-phase system PEG / potassium phosphate. A range of aqueous two-phase systems PEG / phosphate, since factors such as pH, temperature and molecular weight of the polymer directly interfere with the purification factor of the sample. The extraction and characterization results showed that the optimum working conditions, where the enzyme activity is maximum, are pH 8.5 and temperature 30 ° C to white and pH 8.5 and 35 ° C for the purple variety before the purification. The molar mass is 24kDa and the best system partition of bromelain was the ATPS PEG 4000 at pH 9. After purification in aqueous two-phase system, another characterization of the enzyme was performed, showing values of optimum pH 8.5 for both curauá varieties, and temperature work of 32 ° C for white and 35 ° C for purple. The protein content was measured by Bradford reagent and the enzymatic activity was measured by the Biuret reagent. The enzyme solution of the best purification system contains 7 U of bromelain and about 17 mg/L of total protein measured by Bradford (white curauá) and 6 U of bromelain and about 23 mg/L of total protein measured by Bradford (purple curauá).

Keywords: Extraction, characterization, Bromelain, Curauá.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Introdução	1
1.2. Objetivos	4
1.2.1 Objetivos específicos.....	4
Capítulo 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Curauá	5
2.2. Enzimas e Proteínas	10
2.3. Bromelina.....	12
2.4. Separação e Purificação de Proteínas	16
2.5. Extração Líquido-Líquido.....	19
2.6. Extração em Duas Fases Aquosas	20
2.7. Componentes do Sistema bifásico Aquoso.....	26
2.7.1. Polietileno Glicol.....	26
2.7.2. Fosfato de Potássio Monobásico e Dibásico.....	27
2.8. Diagrama de fases e composição das linhas de amarração.....	28
2.9. Fatores que Influenciam no Diagrama de fases.....	30
2.10. Coeficiente de partição.....	32
2.10.1. Influência da Massa Molar do Polímero e da Proteína no Coeficiente de partição..	34
2.10.2. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição.....	35

2.10.3. Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de partição.....	35
2.10.4. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição.....	36
2.10.5. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição.....	37
Capítulo 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. Materiais	38
3.1.1. Reagentes.....	38
3.1.2. Equipamentos	39
3.2. Métodos	40
3.2.1. Preparo das Amostras	40
3.2.1.1. Preparação da amostra a partir da folha de curauá	40
3.2.1.2. Preparo do reativo de biureto	41
3.2.1.3. Preparo da solução padrão de proteína	41
3.2.1.4. Preparo do reagente de Bradford.....	41
3.2.1.5. Preparo das soluções de PEG	41
3.2.1.6. Preparo das soluções de fosfato de potássio mono e dibásico.....	42
3.2.2. Determinação do pH Ótimo.....	42
3.2.3. Determinação da Temperatura Ótima.....	43
3.2.4. Determinação da Massa Molar	44
3.2.5. Cálculo da Atividade Enzimática	43

3.2.6. Obtenção das Binodais	47
3.2.7. Obtenção das Linhas de Amarração	47
3.2.8. Obtenção do Coeficiente de Partição da Bromelina do Curauá	47
Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
4.1. Extração e Caracterização do conjunto de enzimas Bromelina presente no resíduo do Curauá.....	50
4.1.1. Determinação do pH ótimo do extrato de curauá antes da purificação em sistema Bifásico Aquoso.....	50
4.1.2. Determinação da Temperatura ótima do extrato de curauá antes da purificação em sistema Bifásico Aquoso.....	52
4.1.3. Estimativa da Massa Molar do conjunto de enzimas bromelina presentes no resíduo do Curauá.....	53
4.1.4. Cinética da Reação de Hidrólise de BSA por Bromelina.....	57
4.2. Diagramas de Fases e Estabelecimento das Linhas de Amarração.....	61
4.3. Estudo da Partição da Bromelina das Folhas do Curauá.....	62
Capítulo 5 – CONCLUSÕES	75
Capítulo 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Plantação de curauá branco e roxo (Fonte: PEMATEC).....	6
Figura 2.2. Fruto do curauá (Fonte: Pesquisa FAPESP <i>on line</i>).....	7
Figura 2.3. Fibras de curauá (Fonte: PEMATEC).....	9
Figura 2.8.1. Exemplo de um Diagrama de fases.....	29
Figura 4.1. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá branco antes da purificação em SBA.....	51
Figura 4.2. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá branco antes da purificação em SBA.....	52
Figura 4.3. Efeito do da Temperatura sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá branco antes da purificação em SBA.....	53
Figura 4.4. Efeito do da Temperatura sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá roxo antes da purificação em SBA.....	54
Figura 4.5. Perfil eletroforético de proteínas de extrato de folhas de curauá.....	56
Figura 4.6. Bandas de Massa Molar nos perfis eletroforéticos de proteínas de extrato de folhas de curauá.....	57
Figura 4.7. Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas das folhas do curauá branco	58
Figura 4.8. Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk – Curauá branco.....	59
Figura 4.9. Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas das folhas do curauá roxo.....	57
Figura 4.10. Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk – Curauá roxo.....	60
Figura 4.11. Coeficientes de partição para o SBA PEG 4000/Fosfato a pHs 7, 8 e 9 (Curauá Branco).....	68

Figura 4.12. Coeficientes de partição para o SBA PEG 4000/Fosfato a pHs 7, 8 e 9 (Curauá Roxo).....	68
Figura 4.13. Coeficientes de partição para o SBA PEG 6000/Fosfato a pHs 7, 8 e 9 (Curauá Branco).....	69
Figura 4.14. Coeficientes de partição para o SBA PEG 6000/Fosfato a pHs 7, 8 e 9 (Curauá Roxo).....	69
Figura 4.15. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá branco depois da purificação em SBA.....	71
Figura 4.16. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá roxo depois da purificação em SBA.....	72
Figura 4.17. Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá branco depois da purificação em SBA	73
Figura 4.18. Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá roxo depois da purificação em SBA.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Parâmetros cinéticos do resíduo do curauá branco e roxo, antes da purificação em sistema bifásico aquoso.....	61
Tabela 4.2. Composição dos sistemas PEG 6000/Sal a $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ nos diferentes pHs.....	62
Tabela 4.3. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 7.	63
Tabela 4.4. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 8.	64
Tabela 4.5. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 9.	64
Tabela 4.6. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 7.....	64
Tabela 4.7. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 8.	65
Tabela 4.8. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 9.	65
Tabela 4.9. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 7.	65
Tabela 4.10. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 8.....	66
Tabela 4.11. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 9.....	66

Tabela 4.12. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 7.....66

Tabela 4.13. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 8.....67

Tabela 4.14. Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 9.....67

LISTA DE ABREVIATURAS

AE – Atividade enzimática ou específica (U/mg).

BSA - Albumina de Soro Bovina.

C_F - Concentração de proteína na fase inferior no equilíbrio (g/L).

C_T - Concentração de proteína na fase superior no equilíbrio (g/L).

FEBRAFARMA – Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica.

FP – Fator de Purificação.

K – Coeficiente de Partição.

K_m - Constante de Michaelis–Menten (g/L).

LA – Linha de Amarração.

MM – Massa Molar (g/mol).

PEG – Polietilenoglicol.

PI - Ponto isoelétrico.

p/p – Peso/Peso

[S] - Concentração do substrato (g BSA/L).

SBA – Sistema Bifásico Aquoso.

t – Tempo (min).

T – Temperatura (° C).

V - Velocidade (μmol/mL.min).

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

1.1. Introdução

O curauá (*Ananas Erectifolius* L. SMITH.) é uma monocotiledônea pertencente à família Bromeliaceae, encontrada nos estados do Pará, Acre, Mato Grosso, Goiás e Amazonas (LEDO, 1967). A planta possui grande interesse industrial devido sua multiplicidade de aplicação, principalmente como produtora de fibra de excelente qualidade, podendo ser usada na indústria automobilística devido a sua resistência, maciez e peso reduzido. Do ponto de vista tecnológico, o emprego da fibra de curauá para produção de compósitos poliméricos visa um melhor aproveitamento desta fibra natural, além de fornecer novas alternativas de grande importância tecnológica na utilização de biomassa vegetal na produção de materiais mais compatíveis ao meio ambiente.

Segundo LEDO (1967) existem duas variedades de curauá, o branco e o roxo. O curauá roxo possui folhas roxo-avermelhadas, enquanto o branco possui folhas verde-claras.

A demanda por fibras de curauá vem crescendo devido à sua multiplicidade de aplicações, principalmente como matéria-prima, juntamente com o polipropileno, na indústria automobilística para a confecção de tecidos para forrar tetos e tampas do porta-malas de automóveis (LOPES, 2005).

Ainda de acordo com Lopes (2005), a fibra do curauá apresenta várias vantagens para uso na indústria automobilística, como o fato de ser 100% ecológica, ter baixa densidade, ser totalmente reciclável e apresentar melhor relação peso-resistência, sendo leve e resistente.

Porem, apenas a fibra é utilizada atualmente, sendo o resíduo do processamento usado apenas como mistura na ração animal e como adubo orgânico. Neste resíduo há um conjunto de enzimas proteolíticas, a bromelina, utilizada principalmente na produção de fármacos, especialmente em pomadas, géis, loções e cremes. 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. Os usos da bromelina são diversos, todos baseados em sua atividade proteolítica. Introduzida pela primeira vez como composto terapêutico em 1957, a ação da bromelina inclui: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação antiinflamatória, ação antitumoral, modulação de citocinas e imunidade, propriedade debridante de pele, aumento da absorção de outras drogas, propriedades mucolíticas; facilitador da digestão, acelerador da cicatrização, melhora da circulação e sistema cardiovascular. Bromelina é bem absorvida por via oral e a evidência disponível indica que sua atividade terapêutica aumenta com as doses mais altas. Apesar de todos os seus mecanismos de ação ainda não estarem totalmente esclarecidos, foi demonstrado que é um seguro e efetivo suplemento (MATTOS, 2005).

A atividade proteolítica é o principal parâmetro utilizado para avaliar o valor comercial da enzima. De acordo com Torres (2001), a medida da atividade enzimática é imprescindível para monitorar a purificação de uma enzima. Sem uma atividade adequada, a enzima perde seu valor comercial e suas aplicações, pois se torna ineficaz ao catalisar uma reação ou catalisa menos que sua capacidade máxima.

Segundo Kilikian & Pessoa Jr (2001), o grau de pureza de uma enzima depende da aplicação a que se destina. A purificação desejada depende do número de etapas empregadas no processo e do uso a que se refere o produto final: científico, industrial, terapêutico, dentre outros. Em cada etapa de purificação, perde-se atividade, assim, para aumentar o rendimento, um número mínimo de etapas deve ser efetuado. Dessa forma, a escolha do método depende das características da proteína, e do nível de pureza desejado.

Várias são as técnicas de recuperação e purificação de proteínas e enzimas. Técnicas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente têm alto poder de concentração e baixa purificação e técnicas mais modernas como a eletroforese, cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, extração com micela reversa, extração em duas fases aquosas (ou bifásico aquoso), recuperam e purificam, com alto teor de seletividade.

A procura por processos de separação/purificação de biomoléculas produzidas a partir de processos biotecnológicos de baixo custo e que mantenham sua atividade tem incentivado a pesquisa do sistema bifásico aquoso. Este sistema consiste de duas soluções poliméricas distintas, ambas dispersas em fase aquosa, que são misturadas nas proporções adequadas, ocasionando a separação em duas fases ricas em água (de 70 a 90%), ambiente este excelente para a manutenção da enzima. Não há necessidade do emprego de solvente orgânico, que em muitos casos, pode desestabilizar as biomoléculas. As condições de separação de biomoléculas levam em conta o tipo de polímero a ser empregado, tendo como a variável resposta o coeficiente de partição, indicando a distribuição da biomolécula entre as fases aquosas. Estas características tornam este princípio de separação interessante para o emprego em técnica de extração líquido-líquido de células, organelas celulares ou proteínas, pois permite a utilização de condições brandas, sem a presença de solventes orgânicos, evitando, por exemplo, a desnaturação da proteína de interesse.

1.2. Objetivos

Extrair e caracterizar o conjunto de enzimas proteolíticas bromelina presente no resíduo do processamento do curauá (*Ananas Erectifolius* L. SMITH) antes e depois da purificação em sistema bifásico aquoso PEG/Fosfato.

1.2.1 Objetivos específicos

- Determinar pH e Temperatura ótimos da enzima antes e após a purificação em SBA.
- Determinar os parâmetros cinéticos utilizando a equação de Michaelis- Menten e modelo de Lineweaver – Burk linearizado.
- Determinar os fatores de purificação para diversos SBA's, variando massa molar do polímero, linha de amarração e concentração.

Capítulo 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Curauá

A importância das plantas doadoras de fibra na fabricação de utensílios é conhecida desde as épocas remotas pelas comunidades indígenas. Segundo Medina (1959), esse grupo de plantas é o segundo em importância para o homem depois das espécies alimentares. Na Amazônia, várias são as espécies produtoras de fibras, sendo o curauá (*Ananas erectifolius* L. SMITH) uma delas. Planta pré-colombiana, utilizada principalmente na fabricação de cordas, sacos e utensílios domésticos, desponta como sucedâneo para o aproveitamento de fibras. O curauá (*Ananas erectifolius* L. SMITH), é uma monocotiledônea pertencente à família das bromeliáceas, gênero *Ananas*, espécie *Ananas Erectifolius*. Espécie vegetal de porte herbáceo, o Curauá é muito comum na Amazônia, mas ocorre também nos Estados do Pará, Amapá, Acre, Mato Grosso e Goiás (LEDO, 1967).

O curauá produz uma fibra de alta resistência que, quando misturada com polímeros, pode produzir um produto final com uma menor densidade, podendo ter grandes aplicações. Devido ao fato de ser reciclável e biodegradável a fibra do curauá é considerada como uma das mais promissoras entre aquelas produzidas na Amazônia brasileira (BELÉM, 2002).

Há ocorrência de dois tipos de curauá: um de folhas roxo-avermelhadas, que se desenvolve mais, chamado de curauá roxo; e outro de folhas verde-claras, conhecido por curauá branco. Algumas das diferenças entre os dois tipos de curauá residem não só na coloração da folha, mas na resistência e na maciez das fibras, no porte da planta e na quantidade de rebentos e filhos. Outra diferença encontrada nos plantios de curauá é a ocorrência, em algumas plantas, de espinhos foliares, que aparecem quando a planta entra no processo de envelhecimento (LEDO, 1967). As folhas são eretas, com dimensões de aproximadamente 5 cm de largura, 2 a 3 mm de espessura e cerca de 1,5 m de comprimento.

É uma planta de clima tropical, exigente em luminosidade e não tolera áreas sombreadas. O curauá branco tem folhas mais curtas e estreitas que o curauá roxo. Segundo Berger (2003), o curauá branco tem fibras mais claras e fortes. O curauá roxo cresce mais rápido que o branco e também desenvolve mais massa em folhas e por isso tem maior rendimento em fibra que o curauá branco. A Figura 2.1 mostra uma plantação de curauá branco e roxo.



Figura 2.1 - Plantação de curauá branco e roxo (Fonte: PEMATEC)

Uma das vantagens agronômicas do curauá é que a mesma planta pode ficar de cinco a oito anos no campo dependendo da forma como foi plantada e cultivada. Um ano após o plantio, atinge a fase adulta, em que as folhas já podem ser colhidas para uso, procedimento que pode se repetir até quatro vezes por ano (ERENO, 2007).

A Figura 2.2 mostra o fruto do curauá, muito semelhante ao abacaxi, mais amplamente conhecido, porém, em dimensões bem menores.



Figura 2.2 – Fruto do curauá (Fonte: FAPESP *on line*)

Estudos recentes têm demonstrado o grande potencial desta planta como produtora de fibra de excelente qualidade, sendo utilizada na indústria automobilística e têxtil devido sua resistência, maciez e peso reduzido, podendo ainda ser utilizada como celulose e ração animal. Uma outra vantagem, muito valorizada por empresários é o fato da utilização de fibras naturais renováveis, que diminuem o impacto ambiental. Resultados preliminares demonstram ser a fibra do curauá comparável ao vidro, no que diz respeito à relação peso/resistência (SENA & COLARES, 1996). Porém, a fibra natural é competitiva, mas não chega a possuir um custo menor que a sintética (PEMATEC).

A fibra de curauá, pelas suas propriedades mecânicas de alta resistência, baixa densidade – capaz de conferir leveza ao produto final – e potencial para reciclagem, está sendo empregada como reforço ao plástico na fabricação de peças com características reduzidas e detalhadas, produzidas pelo processo de moldagem por injeção, como botões do painel de carros, maçanetas e dobradiças de quebra-sol. Peças de grandes dimensões, como a parte interna das portas e a tampa do compartimento de bagagem de alguns modelos de carros, já são fabricadas por um outro processo com a fibra vegetal como parte de sua composição, mas a demanda tem crescido rapidamente, muito além do que é produzido atualmente no país, reflexo do interesse despertado

pela possibilidade de vários usos, com resultados comprovados, da matéria-prima extraída das folhas do curauá (*Ananas erectifolius*), que pertence à mesma família do abacaxi. Entre os usos estão caixas-d'água, piscinas, tecidos antialérgicos e até a utilização da fibra vegetal como material substituto para as vigas de ferro usadas no lugar de concreto em países como o Japão, que enfrentam problemas de tremores de terra de alta intensidade, pela sua alta resistência mecânica e leveza. A sobra da moagem da folha resulta em um produto chamado mucilagem, que pode ser usado tanto para ração animal, porque contém 7% de proteína, como na fabricação de papel pela indústria de celulose e adubo orgânico (ERENO, 2007).

Apenas na indústria automobilística, há uma demanda de aproximadamente 1000 toneladas de fibra por mês. A PEMATEC/Triangel do Brasil – empresa de São Bernardo do Campo (São Paulo) fornecedora de componentes para a Volkswagen, que é fabricante da fibra vegetal utilizada na indústria automobilística, produz atualmente 170 toneladas por mês de fibra. Em 2009, cerca de 500.000 carros saíram das linhas de montagem com o curauá. A fibra também foi adotada por fabricantes de estofados, calçados e colchões, além de continuar sendo usada pelos índios na fabricação de cordas, redes, cestarias e utensílios domésticos.

Visualisa-se as fibras do curauá depois de processadas na Figura 2.3.



Figura 2.3– Fibras de curauá (Fonte: PEMATEC)

O processo de obtenção da fibra do curauá é semelhante ao da moagem da cana de açúcar: depois de colhida, a planta passa por uma moenda, é lavada num tanque e colocada para secar numa centrífuga. Em outra máquina, a fibra é cortada e aberta até ser transformada numa manta natural. Em seguida, a manta é prensada e está pronta para ser usada. No processo de moagem, o caldo é extraído e separado. Atualmente, apenas a fibra é utilizada na indústria, o restante é considerado resíduo e é aproveitado na ração animal (PEMATEC, 2009).

Uma enzima importante, muito utilizada na indústria farmacêutica, a bromelina, é um dos componentes principais deste resíduo do curauá. Os índios e antigos caboclos da região Norte do país há muito tempo usam o curauá para aliviar a dor e suas propriedades antiinflamatórias foram comprovadas no Departamento de Microbiologia e Farmácia da Universidade Federal do Pará. Aprofundadas as investigações, confirmaram a sua segunda propriedade farmacológica:

anestésica. De acordo com Taussig & Batkin (1988) o curauá tem sido usado para a extração de fármacos, como a bromelina, uma protease que interfere no crescimento de células malignas, inibe coágulos, tem atividade fibrinolítica e ação antiinflamatória. Além disso, pode ser usado para extração de óleos essenciais, empregados na indústria alimentícia como aromatizante e corretores de odor e sabor.

2.2. Enzimas e Proteínas

As enzimas são substâncias orgânicas, normalmente de natureza protéica. O nome proteína formou-se do grego *proteios*, que significa *primeiro*. Entre todos os compostos químicos, devem as proteínas certamente ser colocadas em primeiro lugar, pois são um dos principais constituintes dos organismos animais; são elas que agregam as diferentes partes do organismo e que dirigem o seu funcionamento. Encontram-se em todas as células vivas. São o principal constituinte da pele, dos músculos, dos tendões, dos nervos e do sangue; das enzimas, anticorpos e muitos hormônios (MORRISON & BOYD, 1986).

As proteínas representam cerca de 50 a 80% do peso seco das células, e são, portanto, o composto orgânico mais abundante da matéria viva. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celulares. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma delas especializada em uma função biológica diversa.

As proteínas são polímeros que compreendem uma seqüência de dezenas ou centenas de resíduos de aminoácidos (monômeros) ligados por meio de ligações peptídicas.

Dentre as diferentes funções das proteínas no organismo, destaca-se a sua atividade como enzimas ou catalisadores biológicos. Nessa função, sua ação consiste em acelerar a velocidade de uma reação química mediante a diminuição da energia de ativação da reação — sem que, no entanto, seja consumida durante o processo. A manutenção da estrutura

tridimensional das enzimas, principalmente de seu sítio catalítico, é vital para que o processo de catálise possa ocorrer. Contudo, existem diversos fatores que podem provocar modificações estruturais, tais como: a variação de pH, a temperatura, a força iônica.

As enzimas são catalisadores seletivos biológicos extraordinariamente eficientes. As células vivas apresentam centenas de enzimas que catalisam reações essenciais à vida. Muitas reações bioquímicas essenciais à manutenção da vida não ocorreriam numa velocidade significativa na ausência de enzimas específicas. A função primordial das enzimas é aumentar a taxa destas reações. Reações catalisadas por enzimas ocorrem em uma velocidade mais rápida que a correspondente reação não catalisada. Um catalisador não modifica a posição de equilíbrio de uma dada reação (isto é, não torna uma reação desfavorável em uma reação favorável), no entanto, diminui o montante de energia necessária para que a reação ocorra (HORTON, 2002).

Algumas enzimas são capazes de quebrar ligações peptídicas de cadeias protéicas, sendo denominadas assim de proteases.

Todas as moléculas de uma mesma proteína apresentam, em condições fisiológicas, a mesma conformação que é denominada nativa. Esta é a conformação mais estável que a molécula pode assumir naquelas condições e reflete um equilíbrio delicado entre as interações ocorridas no interior da molécula protéica e entre esta e seu meio ambiente. Ao se proceder ao isolamento e purificação de uma proteína, são introduzidas alterações físico-químicas no seu meio ambiente, que podem afetar sua estrutura espacial a ponto de ocasionar a perda de sua função biológica. Neste caso, a proteína é dita, então, desnaturada (CAMPESE, 2004).

Quando uma solução de proteína, como a albumina de ovo, é aquecida lentamente até 60 ou 70 °C, a mesma torna-se gradualmente leitosa e logo forma um coágulo. Isto é comum já que ocorre quando se ferve ovos em água. A clara do ovo, que contém albumina, coagula pelo aquecimento num sólido branco. Depois que o calor coagulou a clara 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 provocada pelo calor e outros agentes é conhecida como *desnaturação* (BORRACINI, 2006).

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.

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). Na maior parte dos casos, a desnaturação é um processo irreversível.

Com base nisso, podemos dizer que determinar as condições ideais da enzima, ou seja, condições onde sua atividade proteolítica será máxima, se torna importante para etapas de purificação, bem como eficiência da enzima em catalisar determinada reação química.

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. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem 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 (CESAR, 2005).

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.

Foi verificado por Rowan et. al. (1990) que a bromelina do fruto do abacaxi 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.

Estudos realizados por Becze (1970), Greenberg (1965), Johnson (1977), Murachi & Neurath (1960), Yamamoto (1975), Wieland (1972), comprovam sua utilização em 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 (BORRACINI, 2006). Atualmente, o uso da bromelina está mais voltado para a confecção de pomadas, cremes, loções, e géis, justamente pela sua eficácia terapêutica comprovada.

A principal aplicação da bromelina produzida no Brasil é a indústria farmacêutica, que investe em pesquisas de novos produtos. De acordo com a Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica – Febrafarma (2009), os investimentos em 2008, nesse segmento, foram estimados em R\$1,72 bilhão. Isso significa um acréscimo de 14,8% sobre o total anunciado em 2007. Deste total, quase 30% - cerca de R\$ 505 milhões - seriam destinados à área de pesquisa e desenvolvimento.

Segundo Meinig (1999), o primeiro efeito da bromelina relatado foi como digestivo, substituindo a pepsina e a tripsina em tratamentos de insuficiência pancreática. É utilizada também no tratamento de cardiopatias, artrite reumatóide, traumas cirúrgicos, edemas, sinusites; devido, principalmente, à sua capacidade de facilitar a coagulação sanguínea, diminuindo os edemas e também por apresentar um efeito antiinflamatório. Faz parte de componentes ativos de fármacos que ativam a circulação sanguínea e respiração, pois suprimem os depósitos protéicos em veias e artérias. Nas terapias contra o câncer, é utilizada no aumento de lises de células cancerosas. Recentemente, tem sido relatado que as proteases extracelulares têm um papel específico regulatório na modulação da resposta imune e também pode agir como sinalizadoras em processos de mutagêneses (MYNOTT et al., 1999). A bromelina promove o aumento nos níveis de antibióticos quando administrada concomitantemente a eles (WINTER, 1990). Também é usada em forma de solução para preparação de suspensão de hemácias a ser utilizada na tipagem sanguínea.

É empregada também nas indústrias de alimentos, no amaciamento de carne, pois degrada suas proteínas conjuntivas, tornando possível seu amaciamento; na produção de biscoitos a partir de farinhas de trigo com alto teor protéico; na produção de ovos desidratados; na preparação de leite de soja e isolados protéicos; nas cervejarias, para clarificação da cerveja, hidrolisando certos complexos proteínas-taninos, formados durante a fermentação (FREIMAN & SRUR, 1999). Usada no tratamento de couros, nas indústrias têxteis para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes.

Uma outra fonte, ainda pouco conhecida dessa enzima, é o curauá, cujas fibras são utilizadas nas indústrias automobilísticas e têxtil, sendo o resíduo ainda pouco aproveitado e estudado.

A forma de bromelina comercialmente encontrada é a obtida do talo, apesar da grande quantidade de resíduos do abacaxi fruto proveniente das indústrias de conservas de abacaxi (CESAR, 2005). As preparações de bromelina são impuras, e geralmente as principais enzimas contaminantes são outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulases e outras glicosidases (Murachi, 1976).

Suh et. al. (1992) purificaram 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 os pesos molares em 32.5 e 37 kDa respectivamente, com rendimento de 23% em atividade. Murachi (1976) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração, e determinou que a massa molar da fração pura era de 28 kDa, por SDS-PAGE. Rowan et. al. (1990) descrevem a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

César (2000) estudou a extração da bromelina utilizando sistema bifásico 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.

Michelini (2003) efetuou estudos de mensuração da atividade da bromelina em plantas de curauá, e verificou que a folha, tanto na cultivar branco quanto roxo, apresenta teores menores

de atividade enzimática em relação ao fruto 27,4% e 36,18%, respectivamente. Estes valores se aproximam dos valores encontrados por Cesar et al. (1999) ao trabalharem com talo, casca e fruto de abacaxi. O potencial de obtenção da bromelina do curauá, subproduto da indústria automobilística, também pode ser igualmente significativo, já que, de acordo com Leão et al. (1998) as fibras representam em torno de 5 a 8% da planta e o restante é considerado resíduo.

Ainda segundo estudos feitos por Michelini (2003), a atividade enzimática observada no fruto do curauá mostrou grande variação durante os estágios de seu desenvolvimento: é crescente até a maturidade e decresce a partir daí. Esta observação é concordante com aquela encontrada por Baldini et al. (1993) que não encontraram atividade enzimática nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto do abacaxi; entretanto, seu nível aumentava rapidamente, mantendo-se elevado até que, por ocasião do amadurecimento, decrescia ligeiramente e houve uma queda marcante de atividade da protease durante o período final da maturação. De acordo com Gortner & Singleton (1965); Moore & Caygill (1979) e Subramanian et al. (1978), parece razoável supor que no abacaxi a bromelina seja transformada em outra proteína com função metabólica diferente, como enzima produtora de sabor e aroma, uma vez que os constituintes voláteis responsáveis pelo aroma são formados quando a atividade de protease está diminuindo.

2.4. Separação e Purificação de Proteínas

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou células de animais constitui uma etapa complexa do processo, dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, como ácidos orgânicos, antibióticos, hormônios, aminoácidos e proteínas (PESSOA JR, 2001). A etapa de separação e purificação de biomoléculas é também conhecida como “*downstream processing*” e pode ser responsável por até 80% dos custos de produção. A diversidade e crescente importância apresentadas pelos produtos biotecnológicos incentivou o desenvolvimento de vários processos de purificação. Como resultado dessa diversidade, não há processos de purificação de aplicação geral. Entretanto, o processo pode ser dividido em quatro etapas principais: separação de células e seus fragmentos

do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução, a qual compreende a separação da molécula alvo, por exemplo, uma proteína, em relação a moléculas com características físico-químicas significativamente diferentes (água, íons, pigmentos, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos); purificação de alta resolução, a qual compreende a separação de classes de moléculas com algumas características físico-químicas semelhantes, como por exemplo, proteínas; e finalmente, operações para acondicionamento final do produto (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001).

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação e técnicas mais modernas com a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, recuperam e purificam, muitas vezes até a homogeneidade.

Técnicas como ultrafiltração, combinada com difiltração, podem ser utilizadas para separar proteínas a partir de uma mistura para a produção de frações puras (GRANDISON, 1996).

A cromatografia de troca iônica pode ser usado com sucesso em muitos processos de purificação de proteína nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Um grau de alta pureza de determinada proteína isolada pode ser conseguido em um passo único, a partir de soluções diluídas que contêm outros materiais contaminantes. A natureza anfotérica das moléculas de proteína permite que a separação se dê devido à alta afinidade pelos sítios carregados no trocador de íon, em comparação com outras espécies de contaminação (GRANDISON, 1996). A cromatografia de troca iônica obteve sucesso na purificação da proteína do ovo (PARKINSON, 1967).

A cromatografia de afinidade foi originalmente inventada para isolar e purificar proteínas. O método de purificação baseia-se em ligantes específicos para cada proteína (FREDERICK, 1989).

Porter *et al.* (1991) descreveram a purificação em larga escala de β -galactosidase derivada da soja a partir da cromatografia de troca iônica. A imunoglobulina G foi enriquecida de 8 % a 20 % no soro de leite de queijo através da ultrafiltração (THOMAS *et al.*, 1992).

As técnicas mais utilizadas para a separação das células presentes no caldo fermentado são: filtração rotativa a 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 molares, 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 grande questão ao 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 que serão aplicadas em processos industriais. Em uma purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína, utilizando-se das etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento final (ASENJO, 1994).

A purificação de proteínas encontra muitas dificuldades, do ponto de vista técnico, e exige um elevado número de etapas. Por exemplo, a remoção dos fragmentos das células é difícil devido ao pequeno tamanho das partículas e à viscosidade da solução. As etapas de concentração

podem levar a baixos rendimentos e reprodutibilidade limitada. Os procedimentos de alta purificação, como a cromatografia, são limitados pela escala de operações e pelo custo das resinas. Por isso, a extração líquido-líquido vem despertando tanto interesse a fim de ser utilizada como uma etapa intermediária de separação, que substitui métodos de separação mais caros ou diminui o número de etapas de separação necessárias ao processo (RABELO, 1999).

A purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas têm sido muito desenvolvidas nos últimos anos. Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia (HUSTEDT et al, 1988).

2.5. Extração Líquido-Líquido

Uma situação 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 do processo de separação e pelas condições disponíveis para a implantação do processo escolhido.

Métodos cromatográficos de alta purificação são limitados pela escala de operações e pelo custo das resinas. A extração líquido-líquido vem despertando interesse a fim de ser utilizada como uma etapa intermediária de separação, que substitui métodos de separação mais caros ou diminui o número de etapas de separação necessárias ao processo (RABELO, 1999). A extração líquido-líquido vem sendo utilizada há muitas décadas já na indústria de antibióticos.

A extração líquido-líquido é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis. Na extração líquido-líquido, a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido, insolúvel ou parcialmente solúvel, o solvente, no qual o componente a ser extraído da solução, o soluto, é

preferencialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas.

Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases e a miscibilidade parcial dos líquidos (Rabelo, 1999).

Nos processos biotecnológicos, em que se opera com biomoléculas ou células, existe um número muito limitado de solventes adequados a serem usados. Assim, a introdução dos sistemas de duas fases aquosas em processos biotecnológicos é uma alternativa que possibilita o emprego da extração líquido-líquido nestes processos, já que estes sistemas caracterizam-se por ajustar-se aos critérios requeridos pelos processos de bioseparações (Matiasson et al, 1987).

O uso de solventes orgânicos é, normalmente, limitado pelas características hidrofílicas dos produtos de fermentação, levando à necessidade de utilização de elevadas razões entre as fases orgânica e aquosa, devido aos baixos coeficientes de partição dos produtos em relação ao solvente orgânico. Além disso, os solventes orgânicos são geralmente tóxicos para as proteínas e também provocam desnaturação das mesmas.

Um dos métodos de extração líquido-líquido muito conhecido e muito utilizado devido ao seu baixo custo e facilidade de operação é a extração em duas fases aquosas.

2.6. Extração em duas fases aquosas

A extração de biomoléculas em sistemas de duas fases líquidas imiscíveis, constituídas de uma fase aquosa e um solvente, é utilizada há cerca de 60 anos na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos (BELTER et al., 1988).

O bioquímico Sueco P. Å. Albertsson foi o primeiro a perceber o potencial de utilização dos sistemas bifásicos aquosos polímero/polímero e polímero/sal para separações de células, particulados celulares e de proteínas (ALBERTSSON, 1956; ALBERTSSON, 1958; ALBERTSSON, 1959).

Os sistemas bifásicos aquosos são de fácil aplicação, envolvendo duas operações: equilíbrio e separação de fase. O equilíbrio é rápido, implicando na mistura dos componentes que constituem o sistema com o material que se deseja purificar, e posterior dispersão das fases, obtendo-se assim o equilíbrio na composição das mesmas e por fim a partição. A separação de fase sob a força da gravidade não é tão rápida como em sistemas água/solventes orgânicos, variando entre alguns minutos até algumas horas, por causa da pequena diferença de densidade entre as duas fases (aproximadamente $0.05-0.15 \text{ g/cm}^3$) (HUSTEDT, 1988), de suas viscosidades e também devido ao tempo de coalescimento entre as pequenas gotículas, formadas durante o processo de mistura (WALTER, 1985).

Sistemas de duas fases aquosas são formados pela reunião de determinados polímeros em uma mesma solução ou ainda, polímeros em combinação com solutos de baixa massa molar. Alguns sistemas comuns: polietilenoglicol (PEG) / dextrana (Dx), polipropilenoglicol (PPG) / Dx; sulfato dextrana de sódio / PPG; PEG / fosfato de potássio (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001). A fase mais leve é rica em polietilenoglicol enquanto a fase mais pesada é enriquecida com dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água e se separam em duas fases (ALBERTSSON, 1986). De acordo com Coimbra (1995), eles constituem um meio conveniente e adequado para a extração de substâncias de origem biológica, pois a constituição das fases, entre 70% e 90% de água, proporciona um ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molar e permitindo, assim, o seu processamento neste meio.

A extração com sistemas de duas fases aquosas oferece certas vantagens para o processamento em larga escala. Algumas delas são: o elevado rendimento, a faixa de trabalho próxima do equilíbrio, a fácil ampliação de escala (*scale up*) e o uso em processos contínuos. Com isto, o interesse na aplicação de sistemas de duas fases aquosas deixou de se restringir à biologia celular para concentrar-se na análise dos fundamentos da separação de fases e da partição de proteínas, na redução dos custos do processamento, no aumento da seletividade da extração (por exemplo, pela adição de ligantes), na pesquisa de novos componentes formadores

das fases, especialmente para substituir a dextrana, que é um componente de elevado custo, e na operação em múltiplos estágios (COIMBRA, 1995).

Proteínas, altamente sensíveis à desnaturação, podem ser purificadas em sistemas constituídos por duas fases aquosas imiscíveis, em decorrência de uma partição diferenciada da molécula de interesse e impurezas entre as fases líquidas. O que garante a manutenção das propriedades da proteína é o elevado teor de água (75 a 80% em massa). Em 1956, Albertsson, propôs o uso do sistema de duas fases aquosas para a purificação de proteínas e partículas de células. Desde então a extração em sistema de duas fases aquosas tem sido aplicada à purificação de produtos obtidos em células animais, vegetais e microbianas, na separação de vírus, organelas e ácidos nucleicos (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001).

Nesses sistemas, as moléculas de interesse são separadas das impurezas, como resultado de suas diferentes solubilidades nas fases líquidas. De acordo com Albertsson (1986) e Asenjo (1990), as propriedades superficiais das proteínas, como carga elétrica e hidrofobicidade, além da massa molar são fatores decisivos no processo.

Na escolha de meios de extração para aplicações em biotecnologia, vários critérios devem ser considerados, já que nesta área alguns parâmetros tais como solubilidade e estabilidade dos compostos são importantes e não podem ser desprezados. Entre estes critérios deve-se citar (PORTO, 1998):

- O meio não deve ser tóxico ao sistema biológico nem ao homem;
- A recuperação do bioproduto a partir do meio extrator deve ser fácil;
- Deve ter baixo custo e estar disponível comercialmente em grande quantidade;
- Ser possível de esterilizar;
- Ser imiscível ou parcialmente miscível com soluções aquosas;
- Não deve apresentar tendências de formação de emulsões estáveis com materiais biológicos e não ser inflamável.

É imprescindível também, que os solventes escolhidos formem duas fases (sejam imiscíveis ou parcialmente miscíveis) e tenham densidades diferentes. Além destes fatores a separação entre as fases deve ser rápida.

Albertsson também reconheceu a possibilidade de se utilizar sistemas de duas fases aquosas como um método de separação aplicado a materiais biológicos sob condições que preservam a sua atividade biológica. Além disso, os sistemas de duas fases aquosas são usados também na determinação de propriedades superficiais de biomoléculas, tais como carga e hidrofobicidade. Assim, ao lado de trabalhos no campo tecnológico existe também o interesse na utilização da partição como meio de preparação de amostras para uso em técnicas analíticas. Para tanto, são aplicados os diferentes tipos de sistemas de duas fases aquosas existentes.

Os sistemas de duas fases aquosas podem ser divididos em quatro grandes grupos (ALBERTSSON, 1986):

- Dois polímeros não iônicos;

Exemplos: PEG/ficoll, PEG/dextrana, PEG/polivinil álcool, polipropileno glicol/dextrana, metil celulose/hidroxipropildextrana, ficoll/dextrana;

- Um polieletrólito e um polímero não iônico;

Exemplos: sulfato dextrana de sódio/polipropileno glicol, carboximetildextrana de sódio/PEG, carboximetilcelulose de sódio/ metil celulose;

- Dois polieletrólitos;

Exemplos: sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio, carbometildextrana de sódio/carboximetilcelulose de sódio;

- Um polímero não iônico e um composto de baixa massa molar;

Exemplo: polipropileno glicol/fosfato de potássio, PEG/fosfato de potássio, metoxipolietileno glicol/fosfato de potássio, polipropileno glicol/glicose, PEG/glicose, PEG/sulfato de magnésio, PEG / citrato de sódio.

Albertsson (1971) comparou sistemas de duas fases aquosas com os solventes mais convencionais, de acordo com a natureza hidrofóbica, hidrofílica. A fase rica em sal é mais hidrofílica e a fase rica em PEG (polietilenoglicol) é mais hidrofóbica.

Considera-se que a separação de moléculas, incluindo proteínas, em sistemas de duas fases aquosas é dependente das características da superfície molar dos compostos a serem particionados tais como: carga, tamanho e propriedades hidrofóbicas.

Há ainda novos sistemas formados por PEG/FeSO₄ e PEG/Na₂SO₄ que apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas com sais de fosfato e citrato, como, por exemplo, o baixo nível de PEG na fase salina, que reduz as perdas do PEG e facilita a purificação das biomoléculas e a reciclagem do PEG. Nesse tipo de sistema foi observado que a concentração de sal na fase PEG e a concentração na fase salina tendem a diminuir com o aumento da temperatura (PATHAK et al., 1991).

Os sistemas PEG/sal são muito utilizados nos dias de hoje, pois apresentam baixo custo, rápida separação de fases e maior seletividade na separação das moléculas. Segundo Rito-Palomares (2004), nesse sistema de extração, o produto de interesse é concentrado na fase que contém predominantemente água e ocorre um aumento da concentração de um dos componentes da fase de formação, aumentada em uma das fases, que na maioria dos casos é o PEG.

A variada faixa de aplicabilidade dos sistemas de duas fases aquosas tem estimulado o estudo a fim de estabelecer fundamentos para o trabalho nestes sistemas, além de identificar os mais adequados para a separação de diferentes biomoléculas (GUAN et al., 1993).

O sucesso do sistema de duas fases aquosas como processo de potencial aplicação comercial foi provado pela existência de numerosos relatos associados com a recuperação de um grande número de produtos biológicos. No entanto, uma característica muito conhecida desta

nova técnica é a falta desse sistema em grande escala como parte de processos de separação comerciais. Isso pode ser atribuído ao fato de que o conhecimento do mecanismo de distribuição de solutos no sistema de duas fases aquosas é limitado. Conseqüentemente, as indústrias apresentam certa relutância em abraçar esta técnica como uma parte de seus próprios processos. Desse modo, relatos que tratam da adoção comercial do sistema de duas fases aquosas não são comuns. No entanto, é bem conhecido o estudo comprovando o sucesso da aplicação de tal sistema em grande escala (10.000 l de fermentação) para a recuperação de periplásmico IGF-I [1]. Esse sucesso resultou em um dos poucos casos industrial conhecido, no qual a aprovação comercial de sistema de duas fases aquosas para a recuperação de um produto biológico foi alcançada (RITO-PALOMARES, 2004).

Apesar da grande variedade de sistemas de duas fases aquosas, a quantidade de sistemas realmente aplicáveis para extração líquido-líquido fica reduzida basicamente aos formados por PEG/sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG/dextrana, quando se levam em consideração fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação das fases, possibilidade de esterilização, atoxicidade e faixa de aplicação. Devido a tais fatores, os estudos mais recentes tendem a concentrar-se mais nesses dois sistemas, sendo o sistema PEG/sal o mais estudado devido ao seu baixo custo e menor tempo de separação das fases em relação ao sistema PEG/dextrana (COIMBRA, 1995).

As aplicações do Sistema bifásico aquoso (SBA) abrangem-se além da biotecnologia incluindo outras separações industriais. O crescimento microbiano em fluidos de corte à base de água, usados como lubrificantes em diversos processos industriais, é difícil de ser evitado e criam riscos operacionais. O uso de SBA na retirada em larga escala de microrganismos e partículas inorgânicas dos fluidos de corte demonstrou ser superior a técnicas alternativas, inclusive tratamentos biocidas, irradiações, entre outras (STRÖM, 1994).

Os resíduos industriais e o seu impacto ambiental tornam necessário o aprimoramento do seu descarte. A eliminação de compostos orgânicos tóxicos e voláteis, como solventes provenientes de processos extrativos da indústria, deve ter o seu impacto poluente minimizado e se possível, aumentado seus níveis de segurança.

Os sistemas bifásicos aquosos têm a vantagem de serem atóxicos e não inflamáveis. Foram desenvolvidos diversos sistemas bifásicos aquosos destinados à separação e recuperação de corantes e partículas (HUDDLESTON, 1998). Alguns exemplos interessantes de desenvolvimento nesta área incluem a remoção de tinturas a partir de efluentes das indústrias têxteis, remoção de íons metálicos do meio ambiente e compostos aromáticos derivados do óleo cru.

Estudos realizados por et al (1984) estabeleceram uma comparação entre os processos de purificação utilizando os sistemas de duas fases aquosas e um processo convencional constituído essencialmente por precipitação seguida por dois passos cromatográficos e obtiveram graus de pureza semelhantes, atingindo um rendimento superior no protocolo de extração líquido-líquido (71% *versus* 51%). Uma análise econômica comparativa entre os dois processos, envolvendo custo de pessoal, material e operação revelou que uma unidade de atividade enzimática produzida pelo protocolo clássico tinha um custo de cerca de 40 vezes superior ao de uma unidade de enzima resultante das extrações seqüenciais em sistemas de duas fases aquosas.

2.7. COMPONENTES DO SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO.

2.7.1. Polietileno Glicol

O polietileno glicol (PEG), $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, é um poliéster sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, disponível numa grande variedade de pesos molareses, de poucas centenas de milhares de Daltons. O polietilenoglicol é um oligômero ou polímero de óxido de etileno. Solubiliza-se em água e em diferentes solventes orgânicos. A sua solubilização em água é atribuída à ligação das moléculas de água a muitas ou todas as moléculas em torno da cadeia de polietileno. Essa ligação ocorre pelo mecanismo de pontes de hidrogênio. Ligações deste tipo são relativamente fracas e podem ser quebradas de várias maneiras.

O PEG é também conhecido pelo nome comercial de poliglicol, dependendo da empresa que o fabrica. Para massas molares acima de 20000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas se possuem massas molares menores que 1000 Da. Os de pesos moleculares elevados, acima de 1000 Da, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Podem ser estocados a temperatura ambiente, embora a 4 °C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. A oxidação do PEG, detectada pela diminuição do pH devida a liberação de grupos ácidos, altera a coloração da solução para marrom (COIMBRA, 1995).

Sendo não antigênico nem imunogênico foi aprovado pelo FDA, *Food and Drug Administration*. Devido a sua capacidade de formação de uma camada protetora, o PEG pode diminuir a taxa de rejeição de materiais em sistemas biológicos em humanos. Devido às suas propriedades o PEG tem uma série de aplicações farmacêuticas, biológicas e bioquímicas. Ele pode formar um composto ativado PEG-proteína que mantém a proteína ativa e diminui consideravelmente a reação imune, além de aumentar o tempo de vida de soros sanguíneos. Ele pode ser ligado também a superfícies, formando uma camada protetora e biocompatível, para ser empregado em aparelhos de diagnósticos, substituição de artérias e dispositivos relacionados ao sangue. O “PEG protetor” pode ser usado também para evitar a adsorção de proteínas em análises bioquímicas de eletroforese por zona capilar, que é uma importante técnica analítica empregada em bioquímica. Além disso, o PEG pode ser usado com lipossomas para a liberação controlada e distribuição seletiva de medicamentos, pois os lipossomas sem o PEG podem ser rapidamente atacados e eliminados do corpo humano, sem cumprir a sua função. Por ser solúvel em muitos solventes orgânicos, o PEG pode ser utilizado para solubilizar enzimas neste meio sem desnaturá-las através da formação de uma camada protetora. Além disso, compostos insolúveis em água podem tornar-se solúveis quando ligados ao PEG, como por exemplo, substratos de enzimas, cofatores, corantes, etc. (HARRIS, 1992).

2.7.2. Fosfato de Potássio Monobásico e Dibásico

Os fosfatos são sais inorgânicos, amplamente conhecidos. São utilizados em sistemas bifásicos aquoso do tipo polímero/Sal e, portanto, formam duas fases na presença do polímero. Além disto, apresentam um menor custo em relação à dextrana e maior facilidade de utilização industrial (FORCINITI et. al, 1991).

O fosfato de potássio monobásico, que também é conhecido como fosfato diácido de potássio, tem massa molar 135,09 g/mol e sua fórmula molecular é KH_2PO_4 (anidro). Em solução a 5% e temperatura de 25 °C seu pH fica entre 4,1 e 4,5. A sua cinética de dissolução em água é lenta, sendo necessário aquecer o sistema para dissolução total do sal a altas concentrações.

O fosfato de potássio dibásico anidro tem massa molar 171,18 g/mol e sua fórmula molecular é K_2HPO_4 . Em solução a 5% e temperatura de 25 °C seu pH fica entre 8,5 a 9,6 e apresenta cinética de dissolução em água mais rápida que o monobásico. Os sais de fosfato apresentam um baixo custo, por isso o seu grande uso em sistemas de duas fases aquosas.

2.8. DIAGRAMA DE FASES E COMPOSIÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO.

A formação das duas fases aquosas depende da concentração dos componentes do sistema. Este fornece informações importantes como as concentrações necessárias dos componentes para formar um sistema bifásico em equilíbrio, as subseqüentes concentrações dos componentes nas fases, superior e inferior, como também a proporção entre os volumes das fases.

O diagrama de fases mostra a região monofásica e bifásica de acordo com a concentração de cada componente expressa em % m/m.

Portanto, a construção das binodais e curvas de equilíbrio para um sistema bifásico aquoso em estudo é necessária antes de partir para a etapa de purificação propriamente dita.

A curva que separa a região de duas fases da região de uma fase é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada bifásica e abaixo monofásica. A Figura 2.8.1 mostra um exemplo genérico de um diagrama de fases.

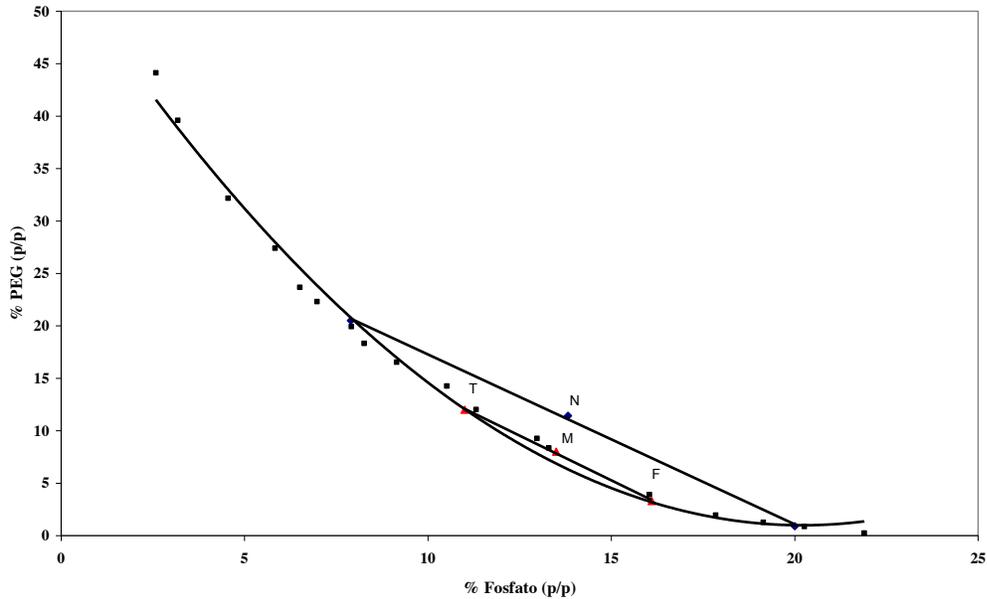


Figura 2.8.1 – Exemplo de um Diagrama de Fases.

No equilíbrio, o sistema de composição inicial M, passa a apresentar as composições indicadas pelos pontos T (fase superior ou de topo) e F (fase inferior ou de fundo), de tal modo que ambos os componentes do sistema estão presentes nas fases líquidas. A reta TMF é chamada de linha de amarração ou *tie-line*. Sistemas cuja composição inicial encontra-se sobre uma mesma linha de amarração, possuem a mesma composição final (fases superior e inferior), porém, a relação de volumes entre as fases é diferente para cada composição inicial. A razão entre os segmentos TM e TF é igual à razão entre os volumes de fase inferior e superior (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001).

Neste trabalho foram utilizadas as binodais e linhas de amarração obtidas por Ferreira (2007).

2.9. Fatores que Influenciam no Diagrama de Fases

Alguns fatores interferem diretamente no perfil das curvas binodais e linhas de amarração. São eles: valores de pH, temperatura, tipo de sal e massa molar do polímero.

Baseado nesta informação, Ferreira (2007) obteve diagramas de fases para o sistema fosfato de potássio e polietilenoglicol 1500 e 4000 nos pH's de 6 a 11, a 25 °C e estudou três diferentes “tie-lines”. Analisou-se a influência do pH e do comprimento das “tie-lines” no coeficiente de partição da enzima.

Quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração necessária para a formação de duas fases, ou seja, a curva binodal desloca-se no sentido da região monofásica (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001). Para um sistema polímero-polímero (PEG/dextrana, por exemplo) a curva binodal torna-se cada vez mais assimétrica à medida que a diferença entre as massas molares dos polímeros aumenta. A massa molar do polímero afeta também o tempo de separação das fases, mas tal problema pode ser minimizado pela centrifugação do sistema após a mistura das fases (ALBERTSSON & TJERNELD, 1994). Ele afeta também o comprimento da linha de amarração, que tende a aumentar com o aumento da concentração dos polímeros (FORCINITI et al., 1991).

A concentração dos componentes do sistema pode afetar a viscosidade e a densidade do sistema, causando diferenças no tempo de separação das fases e na razão de volumes (CESAR, 2005).

Ainda segundo Cesar (2005), a temperatura influencia o diagrama de fases, pois altera a composição das fases no equilíbrio, desloca a curva binodal e modifica também o comprimento

da linha de amarração. Em geral, o comprimento da linha de amarração diminui com o aumento de temperatura. O seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema. No caso de sistemas PEG/dextrana, a formação das fases é facilitada em temperaturas baixas (menores que a ambiente) e para os sistemas PEG/fosfato, a situação é oposta, pois temperaturas mais altas e próximas do ambiente facilitam a separação entre as fases. Quando o sistema está próximo ao ponto crítico, ele é mais instável devido ao deslocamento da curva binodal, podendo atingir mais facilmente a região monofásica. O aumento da temperatura do sistema causa ainda, em um sistema PEG/sal, aumento na concentração de PEG na fase polimérica e redução da sua concentração na fase salina. Esse efeito é uma das razões de se trabalhar com a temperatura do sistema fixa.

A distribuição das proteínas entre as fases é muito influenciada pelo pH. Proteínas altamente ionizadas favorecerão a fase inferior, enquanto proteínas mais hidrofóbicas favorecerão a fase superior. Kula (1987) descobriu que em sistemas PEG/Dextrana, os íons de fosfato preferem permanecer na fase da dextrana, causando o deslocamento da carga negativa para a fase PEG. Diminuindo o valor do pH, as concentrações necessárias de polímero e sal de um sistema PEG/sal aumentam, deslocando a curva binodal para a direita. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da razão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, para o caso do fosfato, com a diminuição do pH, pois como o ânion monovalente é menos efetivo no efeito salting out do PEG, será necessária uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico. No caso do tipo de cátion, a substituição de fosfato de potássio desloca a curva binodal para a direita e, portanto, a concentração dos componentes necessária para a formação do sistema de duas fases aumenta, sugerindo que o cátion sódio é mais eficiente que o cátion potássio para o efeito do *salting in* do PEG (CESAR, 2005).

2.10. Coeficiente de Partição

Quando se trabalha com sistema bifásico aquoso, surge a necessidade de quantificarmos a eficiência ou não do sistema utilizado, como em qualquer processo de purificação de biomoléculas. De uma forma mais simples, devemos saber para qual das fases do sistema bifásico a proteína migrou e em qual proporção. O problema é que fundamentos de partição de biomoléculas entre duas fases ainda não são totalmente compreendidos, apesar do progresso alcançado com a modelagem termodinâmica da distribuição de proteínas na interface dos sistemas de duas fases aquosas. Devido ao grande interesse industrial no desenvolvimento de tecnologias na área de bioengenharia, também se renovou o interesse pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas que servem de base para a produção em escala industrial.

Segundo Kilikian & Pessoa Jr (2001), a partição de proteínas ou outras biomoléculas entre as duas fases é regida pela condição de menor potencial químico ou maior solubilidade, isto é, a biomolécula apresentará maior concentração na fase onde seu potencial químico for menor.

A modelagem quantitativa da partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas representa um complexo problema pelo fato do comportamento do sistema depender de vários fatores tais quais: tamanho da molécula, conformação, estrutura da superfície, interações de polímeros com as cadeias de proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, proteína-proteína e, quando usados, as interações dos ligantes com os outros componentes presentes. Estudos empíricos com sistemas de duas fases aquosas mostraram que a distribuição da proteína é função de diversos fatores, como (BASKIR et al., 1989):

- Tipo dos polímeros que formam as fases: massa molar média, distribuição da massa molar, modificações químicas poliméricas.
- Composição das fases: comprimento da linha de amarração, tipos de íons presentes ou adicionados ao sistema, força iônica.

- Biomolécula: tamanho, carga, propriedades superficiais, concentração.
- pH e temperatura

A seleção de propriedades dos sistemas de duas fases aquosas apropriados para a purificação de uma proteína específica é ainda muito empírica, embora existam regras gerais de como a proteína sofre a partição, com relação ao efeito das características do polímero e da composição iônica da proteína (CASCONE et al., 1991).

Frequentemente, o coeficiente de partição, K , é determinado para avaliação da extração (eq 2.1). Esse coeficiente é dado pela relação entre as concentrações de uma determinada molécula nas fases superior e inferior, no equilíbrio.

$$K = C_T / C_F \quad (2.1)$$

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. Coeficientes de partição para a molécula de interesse e para as demais moléculas, significativamente distintos, indicam ocorrência de purificação (KILIKIAN & PESSOA JR (2001).

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. Assim, uma série de fatores pode contribuir para a eficiência da partição (ALBERTSSON, 1986).

De acordo com Kilikian & Pessoa Jr (2001), considerando-se que as moléculas se distribuem entre as fases em conformidade com suas solubilidades, características físico-químicas

das proteínas (hidrofobicidade e carga superficial) e da solução (pH e força iônica), estas propriedades serão determinantes para o valor de K .

Valores idênticos do coeficiente de partição em relação à escala laboratorial podem ser obtidos na ampliação de escala, desde que as composições e proporções dos volumes das fases sejam mantidas, além do estabelecimento de adequadas condições para a homogeneização completa a fim de que seja atingido o equilíbrio entre as fases.

2.10.1. Influência da Massa Molar do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição

A massa molar do polímero influencia no valor de K . Em um sistema PEG/sal, se a massa molar do PEG for elevada, a partição da proteína será mais favorável à fase salina, devido ao mecanismo da exclusão molecular. A magnitude desse fenômeno é diretamente proporcional à massa molar das proteínas (ASENJO, 1990). Caso a massa molar do PEG seja baixa, ocorrerá o oposto, sendo a partição favorável à fase polimérica. O mesmo ocorre nos sistemas PEG/dextrana: se a massa molar do PEG for elevada e a da dextrana for baixa, a partição será favorável à fase contendo dextrana. Isso ocorre devido ao aumento do efeito do volume excluído que ocorre na fase PEG. Esse efeito é menor para substâncias de baixa massa molar.

A massa molar da substância a ser separada também influencia em K , pois quanto maior for a molécula, maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema e, de acordo com as características da molécula e com o tipo de interação, ela será mais favorável a uma das fases. Esse fator é muito importante quando se deseja separar duas substâncias com massas molares muito diferentes (ALBERTSSON, 1986; YANG et al., 1994).

O K depende também da massa molar da proteína. Ele diminui com o aumento da massa molar e a magnitude dessa diminuição é maior para PEG com baixa massa molar e tende a ficar estável para PEG com alta massa molar (ALBERTSSON, 1986; FORCINITI et al., 1991). O tipo de proteína também influi no valor de K , porque as proteínas são macromoléculas polieletrólitas

que carregam cargas quando estão em soluções aquosas. As cargas dependem da composição, da sequência de aminoácidos, e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos (SCHLUCK et al., 1995).

2.10.2. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição

Outro fator importante que influencia o K é o pH do sistema. Alterando-se o pH, ocorrem mudanças na distribuição de cargas da proteína. Em baixos valores de pH ocorre o aumento da carga positiva e em valores altos de pH, da carga negativa. Trabalhando-se em um valor de pH próximo ao ponto isoelétrico (PI), onde a somatória de cargas da proteína é praticamente nula, existirá apenas o efeito do tamanho e concentração do polímero e do tamanho e composição da superfície da proteína, considerando-se apenas os efeitos eletrostáticos. (FORCINITI et al., 1991).

2.10.3. Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição

Para o entendimento da influência de alguns fatores em K , é importante compreender o que é solubilidade de proteínas. Uma proteína apresenta uma superfície formada por regiões carregadas positiva e negativamente, além de possuir regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. A distribuição dessas regiões depende do tipo de proteína. A solubilidade da proteína é determinada pelas interações entre tais regiões e o solvente que está presente no meio onde a proteína está contida. A solubilidade depende, portanto, de fatores termodinâmicos que favorecem ou não a sua solubilidade no solvente. O aumento da proporção de zonas hidrófobas na superfície da proteína resulta no aumento da afinidade a solventes apolares, como é o caso do PEG, fazendo com que esta permaneça na fase superior.

A solubilidade das proteínas nas soluções de PEG depende da interação hidrofóbica entre a proteína e o grupo etileno do PEG. Isso pode explicar a alta tendência das proteínas hidrófobas de se deslocarem para a fase superior rica em PEG. Neste caso, o PEG tende a interagir fortemente com as regiões apolares da proteína (SCHMIDT et al., 1996).

2.10.4. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição

A concentração dos componentes do sistema e, portanto, o comprimento da linha de amarração, também afeta o K . Em sistemas próximos ao ponto crítico, as proteínas em geral apresentam uma partição igual entre as duas fases, portanto o valor de K é igual a 1. Com o aumento da concentração dos componentes, que corresponde a um aumento no comprimento da linha de amarração, o valor de K será maior ou menor que 1, dependendo do tipo de proteína. Existem exceções a essa regra, podendo ocorrer valores de K diferentes de 1 para sistemas próximos ao ponto crítico, ou K pode aumentar com o aumento da concentração dos componentes até um máximo e depois diminuir. Para o caso de células ou particulados, o K é maior para os sistemas próximos ao ponto crítico. O efeito do comprimento da linha de amarração em K é maior em proteínas com alta massa molar. Além disso, para um sistema PEG/sal, um aumento no comprimento da linha de amarração leva a um aumento da concentração de sal na fase inferior e a um valor praticamente constante na fase superior, favorecendo o efeito do salting-out da fase rica em sal para a fase rica em PEG (ALBERTSSON, 1986; BAMBERGER et al., 1985; MINAMI, 1997).

2.10.5. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição

O K depende também da concentração da proteína presente na amostra. Para determinar seu valor é importante trabalhar com concentrações não muito altas de proteínas (de preferência menores que 1 g/L), pois essas concentrações podem provocar a precipitação da proteína devido à presença de PEG (SCHMIDT et al., 1996).

A concentração de proteínas também é importante perto do ponto crítico, pois ao se adicionar uma pequena quantidade de proteína em um sistema próximo ao ponto crítico, o diagrama de fases pode modificar-se deslocando a curva binodal, como ocorre quando adicionamos uma pequena quantidade de água. Com isso, o valor de K poderá mudar (MINAMI, 1997). Quando o sistema está afastado do ponto crítico, não ocorre deslocamento da curva binodal para concentrações muito baixas de proteína, pois a composição das fases praticamente não se modifica com a adição de proteína. Porém, para altas concentrações pode haver influência na formação das fases que provoca redistribuição dos componentes do sistema, modificando o diagrama de fases e, conseqüentemente, o valor de K (GUAN et al., 1994).

Capítulo 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de curauá foram coletadas no campo, na fazenda experimental São Manoel, Botucatu – SP (fornecidas pelo Prof. Dr. Isaac Stringheta Machado, da UNESP, Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Departamento de Ciências Ambientais). No laboratório, foram armazenadas em sacos plásticos e conservadas sob refrigeração, até sua utilização. Foram feitos testes com o resíduo do processamento da planta *in natura* para que este fosse utilizado por mais tempo sem perder a atividade enzimática.

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

- Constituintes do sistema de duas fases aquosas

Foram utilizados polietileno glicol (PEG) de massas molares 4000 e 6000, ambos adquiridos na Merse Artigos para Laboratório Ltda e fornecidos pela Synth (São Paulo).

Os sais utilizados foram o Fosfato de Potássio monobásico anidro P.A, de fórmula molecular KH_2PO_4 e massa molar de 136,09 g/mol, e Fosfato de Potássio bibásico anidro P.A , de fórmula molecular K_2HPO_4 e massa molar de 174,18 g/mol, ambos fornecidos pela Synth (São Paulo).

- Soluções utilizadas para determinação de Proteínas Totais e Atividade Enzimática.

Foram utilizados para o preparo do reagente de Biureto sulfato de cobre pentaidratado, tartarato duplo de sódio e potássio e hidróxido de sódio.

O tartarato duplo de sódio e potássio possui fórmula molecular $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, massa molar de 282,22 g/mol e foi fornecido pela Synth.

O hidróxido de sódio possui fórmula molecular NaOH , massa molar de 40 g/mol e foi fornecido pela Quimex.

Como substrato da reação foi utilizada uma solução de proteína padrão, a albumina de soro bovino (BSA) de massa molar 66.500-67.500 Da (ponto isoelétrico 5,1) obtida da Sigma Chemical.

A atividade enzimática foi determinada pelo Reativo de Biureto, de coloração azul, que se torna violeta na presença de proteínas. Por isso essa análise é feita em espectrofotômetro.

Para a análise de proteínas totais foi utilizado o reagente de Bradford. Para o preparo deste reagente são necessários *Coomassie Brilliant Blue G-250*, de fórmula molecular $\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$, fornecido pela VETEC, Álcool Etílico 99,5% de pureza, de massa molar 46,07 g/mol, fornecido pela Ecibra e Ácido o-fosfórico 85%, de fórmula molecular H_3PO_4 , massa molar de 98 g/mol, fornecido pela Synth.

3.1.2. Equipamentos

- Centrífuga de Alimentos VitaPro, Arno
- Balança Eletrônica Marte, modelo AL 200.

- Agitador Biomatic, modelo 1005.
- pHmetro Adamo, modelo MPA - 210.
- Agitador magnético com aquecimento Nova Ética, modelo 119.
- Banho termostaticado Fanem, modelo 100.
- Micropipetas automáticas.
- Espectrofotômetro UV/VIS Spectronic 21D.
- Sistema vertical de eletroforese Mini Protean III (BioRad, EUA).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo das Amostras

3.2.1.1. Preparação da amostra a partir das folhas de curauá.

As amostras foram preparadas com as folhas do curauá da seguinte maneira:

- Lavagem das folhas.
- Moagem das folhas na centrífuga de alimentos, a temperatura ambiente (24 ± 2) °C, com adição de tampão de fosfato de potássio (15 %), na proporção 50 % m/m.
- Filtração em tela de *Nylon* para retirada de fibras e particulados presentes no extrato.

- Centrifugação durante 15 minutos para a retirada total das fibras e materiais solúveis. Depois disso, somente o sobrenadante foi recolhido em Eppendorf, para posterior utilização.

3.2.1.2. Preparo do reativo de Biureto

Dissolveu-se em 500 mL de água destilada:

- 1,5 g de sulfato de cobre pentaidratado
- 6,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio

Adicionaram-se 300 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% com constante agitação. Adicionou-se água destilada suficiente para 1 Litro de solução (Departamento de Bioquímica, UFPR, 2005)

3.2.1.3. Preparo da solução padrão de proteína

Pesou-se 0,5 g de albumina de soro bovino e dissolveram-se em 100 mL de tampão fosfato pHs de 4 a 11.

3.2.1.4. Preparo do Reagente de Bradford

Dissolveu-se 0,1 g de *Coomassie Brilliant Blue G-250* em 50 mL de etanol 95% (47,73 mL de etanol 99,5% + 2,26 mL de água). A esta solução em agitação, adicionaram-se 100mL de ácido fosfórico 85%. Agitou-se a solução por mais 2 horas e completou-se o volume para 1 L com água deionizada. Deixou-se agitar por 12 horas. Filtrou-se o reagente (papel de filtro para filtração rápida – qualitativo 80 g) em frasco coberto com papel alumínio. Deixou-se em repouso na geladeira por 24 horas antes de utilizar (Bradford, 1976). Em todas as etapas, manteve-se o reagente coberto com papel alumínio para evitar que o *Coomassie Blue* reaja com a luz.

3.2.1.5. Preparo das soluções de PEG

Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se as duas massas molares de PEG usados (4000 e 6000 Da) até se obter concentrações a 50% (m/m).

3.2.1.6. Preparo das soluções de fosfato de potássio mono e dibásico.

As soluções foram preparadas dissolvendo-se os sais de fosfato sólidos em certa quantidade de água deionizada, até atingir a concentração desejada, que foi de 15 % (m/m). Para o fosfato de potássio bibásico, pesou-se certa quantidade de sal em balança. Anteriormente este foi seco em estufa para a retirada total da umidade. Completou-se com água deionizada até atingir a massa desejada para se obter a concentração de 15% (m/m). A solução foi agitada no agitador magnético com aquecimento até a dissolução total do sal. O mesmo procedimento foi feito para o fosfato de potássio monobásico.

Os tampões foram feitos de acordo com a metodologia descrita por Morita e Assumpção, 1986.

3.2.2. Determinação do pH Ótimo

Com a temperatura fixada em 35° C, foram feitos ensaios em batelada para se medir a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais de amostras em diversos pHs, quais sejam: 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5, do seguinte modo:

Em tubos numerados, foram colocados 5 mL de solução de BSA 5 g/L e mantidos sob aquecimento (banho) por 15 minutos para estabilizar o biorreator na temperatura desejada. As amostras de suco das folhas de curauá, nas variedades branco e roxo, também foram mantidas na temperatura acima estabelecida. Para cada um dos pH das amostras de curauá, foi medida a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais, de acordo com o procedimento descrito a seguir:

Nos tubos com 5 mL de BSA, adicionou-se 1 mL de enzima (suco da folha de curauá) para cada pH em estudo. Em seguida o tubo foi agitado no agitador magnético e foi retirada uma amostra que corresponde ao tempo zero (tempo inicial). Logo após, esta amostra foi colocada em outro tubo e adicionou-se imediatamente, 5 mL de biureto. Depois de retirada a amostra, deixou-se a amostra inicial reagir por 10 minutos e em seguida retirou-se outra amostra, seguindo o mesmo procedimento anterior. As amostras foram lidas no espectrofotômetro somente depois de 10 minutos de descanso, para sua estabilização. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

3.2.3. Determinação da Temperatura Ótima

O pH ótimo obtido pelos ensaios anteriores foi fixado e foram feitos ensaios em batelada para se medir a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais em amostras em diversas temperaturas, quais sejam: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C, do seguinte modo:

Em tubos numerados, foram colocados 5 mL de solução de BSA 5g/L e mantidos sob refrigeração ou aquecimento (banho) por 15 minutos para estabilizar o biorreator na temperatura desejada. As amostras de suco das folhas de curauá, nas variedades branco e roxo, também foram mantidas nas temperaturas acima estabelecidas. Para cada temperatura das amostras de curauá, foi medida a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais, de acordo com o procedimento descrito a seguir:

Nos tubos com 5 mL de BSA, adicionou-se 1 mL de enzima (suco da folha de curauá) para cada temperatura em estudo. Em seguida o tubo foi agitado no agitador magnético e foi retirada uma amostra que corresponde ao tempo zero (tempo inicial). Logo após, esta amostra foi colocada em outro tubo e adicionou-se imediatamente, 5 mL de biureto. Depois de retirada a amostra, deixou-se a amostra inicial reagir por 10 minutos e em seguida retirou-se outra amostra, seguindo o mesmo procedimento anterior. As amostras foram lidas no espectrofotômetro somente depois de 10 minutos de descanso, para sua estabilização. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

3.2.4. Determinação da Massa Molar

Amostras de suco das folhas de curauá branco e roxo em diferentes diluições e bromelina comercial foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE, realizadas no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida, conforme protocolo apresentado por Laemmli (1970), na concentração de 15%, sendo as amostras tratadas com tampão contendo SDS em condições desnaturantes e não-redutoras (sem a presença de β -mercaptoetanol). A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada por aquecimento a 100 °C por 10 minutos. Alíquotas de 15 μ L de cada amostra e do marcador de baixa massa molar foram aplicadas nos géis. Estes géis foram submetidos a uma voltagem de 180 V, em cuba vertical. A coloração dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme Morrissey (1981).

A curva de calibração da massa molar das proteínas foi feita pela plotagem dos valores de log MM versus a mobilidade de cada padrão. A mobilidade é tida como a distância percorrida (no gel) pelo padrão, dividida pela distância percorrida (no gel) pelo marcador. A determinação da massa molar das proteínas do curauá foi feita usando as mobilidades medidas no gel e inserindo-as nas equações das curvas de calibração.

3.2.5. Cálculo da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada pelo Reativo de biureto. As origens do método do biureto podem ser traçadas desde a proposta inicial de Autenrieth, em 1915; posteriormente diversos autores propuseram modificações do mesmo, sendo, atualmente, a proposta metodológica de (Gornall et al) a mais utilizada.

O método se baseia na reação do reativo do biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução, sendo o tartarato de sódio o recomendado por Gornall et al. O cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto de reação

apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm. Apesar da banda na região de 270 nm aumentar em seis vezes a sensibilidade do método do biureto, a banda na região de 540 nm é a mais utilizada para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes na maioria dos meios analisados, absorvem na região de 270 nm causando muita interferência no método (ZAIA, 1998).

A atividade enzimática é definida pela quantidade de substrato que é transformado em um tempo determinado. Corresponde à quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato, por minuto, nas condições definidas da reação (temperatura, pH, o sistema tampão utilizado e as concentrações de substratos e co-fatores). Os ensaios devem ser realizados em condições ótimas de temperatura e pH (HALPERN, 1997; HIRANO et al., 2001; PETER et al., 1987; REGULY, 2000).

Quando se pretende purificar uma enzima, inicia-se o processo de isolamento a partir de um macerado de células, órgão ou tecido, o *extrato celular*. Tomando uma amostra desse extrato, deve-se determinar a atividade da enzima de interesse (em U/mL, geralmente) e a quantidade total de unidades presentes no volume total do extrato. Para adotar um parâmetro que permita a comparação com outras preparações e com etapas posteriores do processo de purificação, é necessário usar um referencial; a referência habitualmente utilizada é a concentração total de proteína presente na preparação. Define-se assim, a *atividade específica*, ou seja, o número de Unidades de enzima por miligrama de proteína (TORRES, 2001).

A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação (3.1), (LOPES, 2005).

$$AE = \frac{V_{reator}(\text{Litros}) * 10^3 (\mu\text{mol} / \text{mL})}{MM_{BSA} * V_{enzima}(\text{mL}) * t_{reação}(\text{min})} \quad (3.1)$$

Usou-se como base matemática para obtenção dos modelos cinéticos a equação de Michaelis-Menten (Equação 3.2).

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \quad (3.2)$$

onde:

V_{\max} é a velocidade máxima da reação;

K_m é a constante de Michaelis–Menten;

$[S]$ é a concentração do substrato.

O modelo cinético de Michaelis-Menten é um dos mais aceitos quando se objetiva explicar a influência das concentrações iniciais de enzima e de substrato na velocidade inicial da reação enzimática. Sua equação relaciona a velocidade inicial (velocidade na qual a concentração de produto em relação ao tempo é constante), a velocidade máxima e a concentração inicial de substrato, através de uma constante chamada K_m (constante de Michaelis-Menten). Essa constante equivale à concentração de substrato onde a velocidade inicial da reação é igual à metade da velocidade máxima.

Seus parâmetros são encontrados pelo modelo M-M linearizado (Equação 3.3), de acordo com Lineweaver-Burk (HALPERN, 1997; MORRIS, 1972; PETER et al., 1987).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \quad (3.3)$$

O reativo de Biureto apresenta muitas vantagens em relação aos métodos convencionais de determinação da atividade enzimática, como por exemplo, o baixo custo dos reagentes, sendo todos eles de fácil manipulação e não tóxicos e a análise é relativamente simples e rápida. Como todo método apresenta desvantagens, sendo a principal delas a instabilidade nas leituras, devido a interferência de substâncias que possam reagir com os íons cobre (II), sendo necessário então se fazer todas as leituras em triplicata.

3.2.6. Obtenção das Binodais

Os diagramas de fases foram estabelecidos pelo método da turbidez, de acordo com a metodologia proposta por Albertsson (1986), que é uma observação imediatamente anterior a formação de duas fases.

3.2.7. Obtenção das Linhas de Amarração

De acordo com Ferreira (2007), os pontos que deram origem às linhas de amarração foram obtidos em tubos graduados de 8 mL, onde foram colocadas quantidades de soluções de PEG 50% (p/p) e solução de sal fosfato 22% (m/m) nos pHs estudados, tais que observasse a formação das fases superior e inferior com volumes iguais. Todos os pontos encontrados foram repetidos três vezes. Para cada sistema PEG/Sal a pH e massa molar do polímero variado, foram encontrados três pontos os quais ao passarem por um tratamento pelo método dos mínimos quadrados geraram a reta chamada linha de amarração.

Foram utilizadas neste trabalho as binodais e linhas de amarração propostas por (FERREIRA, 2007).

3.2.8. Extração da enzima

3.2.8.1. Obtenção do Coeficiente de Partição da Bromelina do Curauá

A partição da bromelina foi realizada em processo em batelada. Seguindo o procedimento de Ferreira (2007), cada ponto das linhas de amarração foi reproduzido em tubos graduados com massa total do sistema de 8 g. A estes tubos foi adicionado, com o auxílio de uma pipeta automática o extrato bruto da folha do curauá, tamponado nos pHs de 7 a 9, na fase

inferior do sistema. Assim que o sistema atingiu o equilíbrio difusivo (24 horas), coletou-se 1 mL de amostra de cada fase. A determinação da concentração de proteínas totais nas fases inferior e superior foi realizada através do Método de Bradford. A atividade enzimática foi determinada pelo método do Biureto. Dividindo os valores das concentrações de proteína da fase leve (superior) pela da fase pesada (inferior), obteve-se o chamado coeficiente de partição (K) do sistema bifásico aquoso em estudo, conforme a Equação 3.4.

$$K = \frac{\text{Concentração de Bromelina na Fase Leve}}{\text{Concentração de Bromelina na Fase Pesada}} \quad (3.4)$$

Para o cálculo dos parâmetros K_{prot} , K_{ativ} e FP, importantes para a análise dos resultados, utilizaram-se as equações 3.5, 3.6 e 3.7, respectivamente.

$$K_{prot} = \frac{\text{Proteína}(FL)}{\text{Proteína}(FP)} \quad (3.5)$$

$$K_{ativ} = \frac{\text{Atividade}(FL)}{\text{Atividade}(FP)} \quad (3.6)$$

$$FP = \frac{AE(FL)}{AE(Bruta)} \quad (3.7)$$

Sendo:

- Proteína bruta (mg) = Produto do volume (em mL) que foi usado da solução de proteína (amostra bruta no tampão) pela concentração de proteína total medida no espectrofotômetro (em mg/mL).

- Proteína leve = Produto do volume da fase leve (para cada “tie-line” e pH) pela concentração de proteína total medida no espectrofotômetro (em mg/mL).

- Proteína pesada = Produto do volume da fase pesada (para cada “tie-line” e pH) pela concentração de proteína total medida no espectrofotômetro (em mg/mL).

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Atividade bruta (U) = Produto do volume que foi usado da solução de bromelina (volume de amostra bruta no tampão e em cada “tie-line” específica) pela atividade medida de bromelina neste tampão (em U/mL).

Atividade leve = Produto do volume da fase leve (para cada tie line e pH) pela atividade medida na fase leve.

Atividade pesada = Produto do volume da fase pesada (para cada “tie-line” e pH) pela atividade medida na fase pesada.

Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Extração e Caracterização do conjunto de enzimas Bromelina presente no resíduo do Curauá.

4.1.1 – Determinação do pH ótimo do extrato de curauá antes da purificação em sistema bifásico aquoso.

O pH é um parâmetro que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. O efeito deste fator se dá devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de H^+ (RICARDO e TEIXEIRA, 1993).

Estes dados são de extrema importância na estratégia de purificação da enzima bromelina, evitando a perda de atividade pelo uso de faixas de pH agressivos às enzimas e a redução na eficiência do método empregado. (SANTANA, 2006).

As Figuras 4.1 e 4.2 mostram o efeito do pH sobre a atividade do conjunto de enzimas bromelina presente nas folhas do curauá nas variedades branco e roxo antes da purificação em SBA.

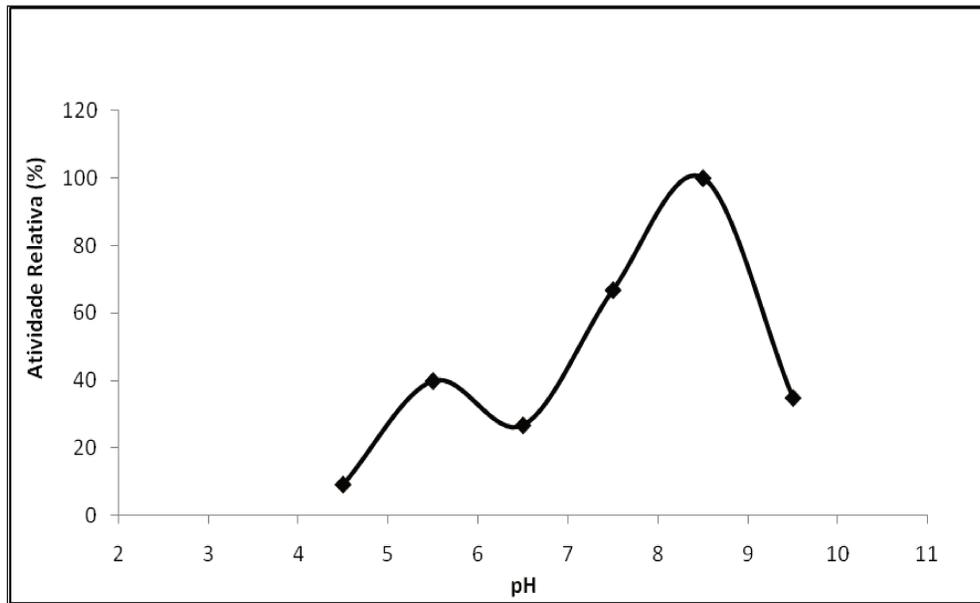


Figura 4.1: Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá branco antes da purificação em SBA.

Os resultados observados evidenciam que a atividade foi afetada na faixa de pH estudado. Foi observado que a máxima atividade se encontra no pH 8,5 tanto para o curauá branco como roxo, indicando que este é o pH ótimo para a bromelina das folhas de curauá. Entretanto, um pico de menor intensidade foi observado no pH 5,5, o que explica o fato de haver um conjunto de enzimas bromelina no resíduo do curauá.

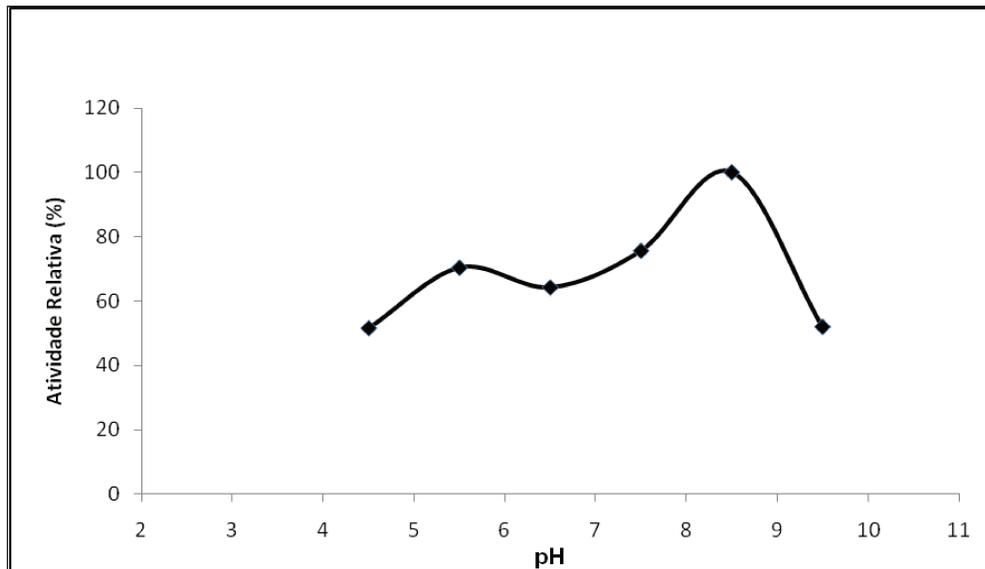


Figura 4.2: Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá roxo antes da purificação em SBA.

Como a aplicação do curauá está baseado principalmente no uso de sua fibra, existem poucos estudos sobre o resíduo do processamento, portanto, uma comparação com trabalhos anteriores foi feito em relação a bromelina do abacaxi, da mesma família do curauá.

Ferreira (2007), Ko & Kang (1990), Rasheedi et al. (2003), e Rowan et al. (1990), encontraram maior atividade no pH 7,0, para a bromelina da casca e talo do abacaxi.

4.1.2 – Determinação da temperatura ótima do extrato de curauá antes da purificação em sistema bifásico aquoso.

A temperatura é um dos agentes críticos sobre a atividade das enzimas. Quando se eleva a temperatura, a atividade aumenta, todavia, o processo de desnaturação cresce devido à ação do calor (HALPERN, 1997).

Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação, até ser alcançada a temperatura ótima; acima desta temperatura a enzima começa a perder sua função, diminuindo a velocidade da catálise, até o momento em que se torna inativa.

A Figura 4.3 descreve o perfil da atividade do conjunto de enzimas bromelina das folhas de curauá branco, nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C. A partir de 40 °C pode-se observar claramente no Figura que a enzima perde sua atividade tornando-se ineficaz em sua função em catalisar reações químicas e desinteressante para aplicações desta em medicamentos.

A atividade máxima pode ser observada em duas temperaturas diferentes: 10 e 30°C.

A presença de dois ou mais picos onde a atividade foi elevada, indica mais uma vez, a presença de outras proteases nas folhas de curauá.

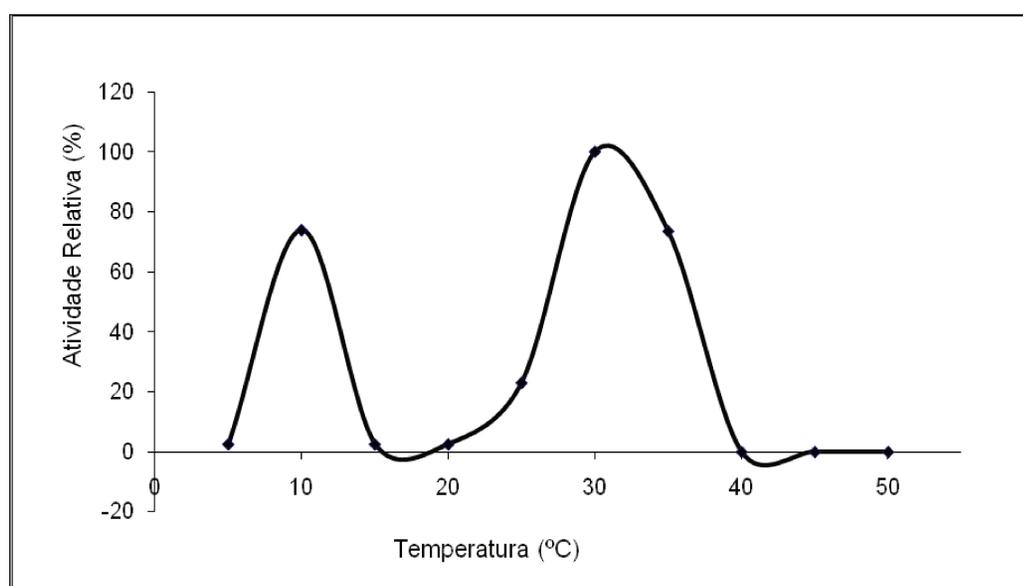


Figura 4.3: Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá branco antes da purificação em SBA.

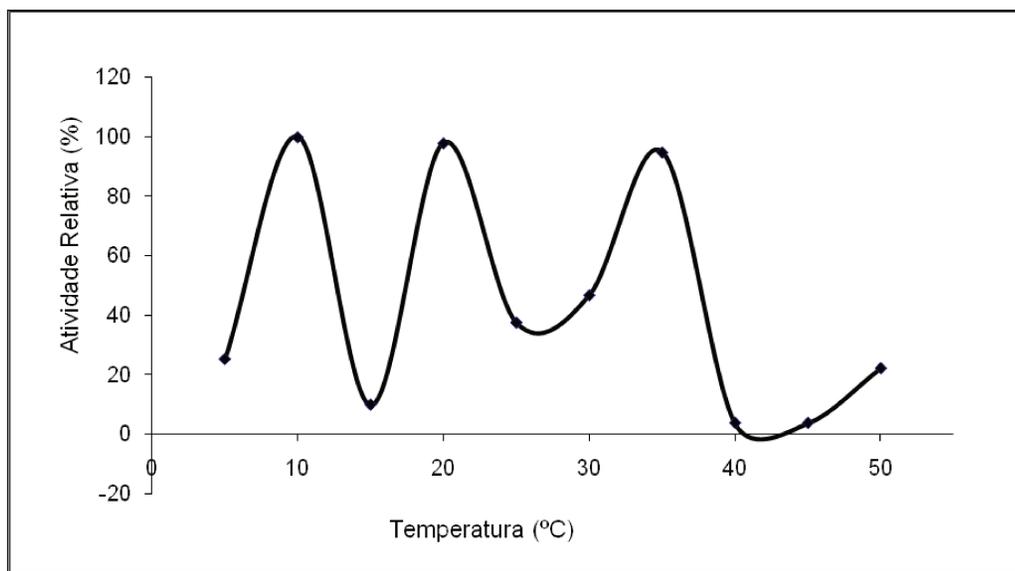


Figura 4.4: Efeito do da Temperatura sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá roxo antes da purificação em SBA.

Observando a figura 4.4 podemos notar que existem três picos onde a atividade enzimática é máxima: 10, 20 e 35°C.

Rowan et al. (1990) caracterizaram a bromelina do talo do abacaxi, que apresentou atividade máxima a 60 °C. Ko et al. (1990) encontraram temperatura ótima de 62,5 °C. Khan et al. (2003) e Rasheedi et al. (2003) também caracterizaram a bromelina do talo e encontraram temperatura ótima de 37 °C. Ferreira (2007) observou que a faixa ideal de temperatura na caracterização da bromelina da casca e talo do abacaxi é entre 30 e 40 °C, o que reforça o fato de comportamentos muito parecidos entre a bromelina do abacaxi e a do curauá.

4.1.3. Estimativa da massa molar do conjunto de enzimas bromelina presentes no resíduo do curauá.

Foi utilizado o procedimento da eletroforese SDS-PAGE, que é um método rápido e sensível, em que o gel é corado por impregnação de prata, para determinação da massa molar da bromelina das folhas de curauá nas variedades branco e roxo. A Figura 4.5 representa os resultados, obtidos a partir dos extratos das folhas de curauá branco (Fig. a) e roxo (Fig. b) concentrados e diluídos em duas, três, quatro e cinco vezes em tampão fosfato.

De acordo com as eletroforeses apresentadas na Figura 4.5, verifica-se que, para ambas as espécies de curauá (branco e roxo), proteínas com massa molar semelhante à bromelina comercial foram detectadas. A melhor diluição do extrato para observação dos resultados na eletroforese é a de duas vezes (faixa 2; Figura 4.5a e 4.5b), onde se percebe claramente, uma banda de massa molar de 24 kDa, assim como o marcador da bromelina comercial proveniente do abacaxi.

A massa molar comercial da bromelina, comercialmente encontrada na forma liofilizada, gira em torno de 24,5 kDa e 37kDa normalmente, conforme trabalhos realizados por Suh et al (1992), que purificaram a enzima bromelina do fruto e do talo do abacaxi por cromatografia de gel-filtração e determinaram as massas molares em 32,5 e 37 kDa respectivamente.

Com base na figura 4.5 pode-se observar varias bandas, porem, uma banda próxima da massa molar de 20,1 kDa fica bem evidente para o curaua branco.

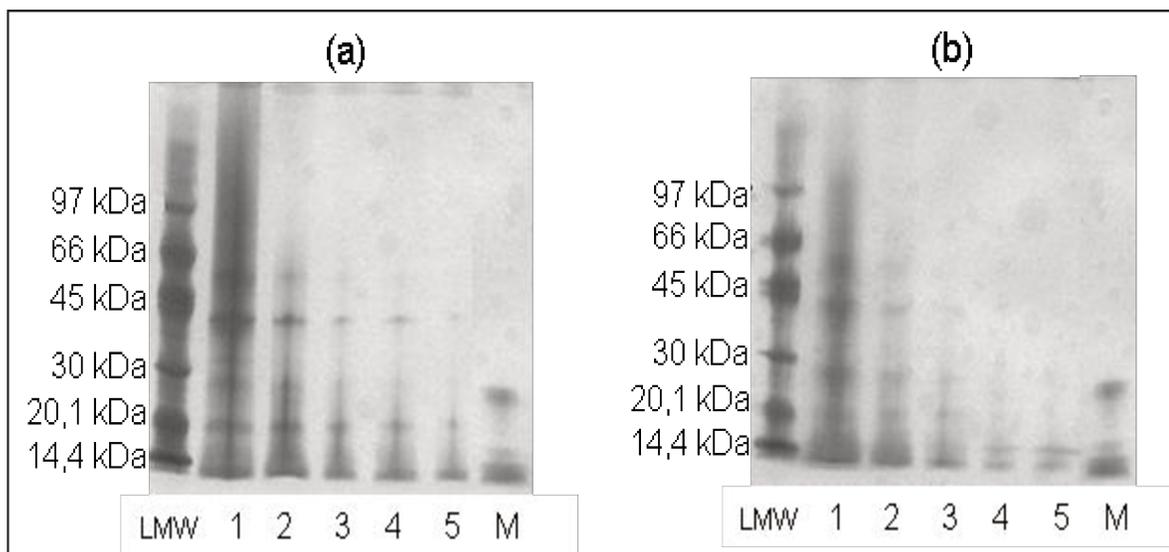


Figura 4.5 – Perfil eletroforético de proteínas de extrato de folhas de curauá. Amostras em condições desnaturantes e não-redutoras. (a) gel de poliacrilamida a 15 % com amostras de extrato de folhas de curauá branco. (b) gel de poliacrilamida a 15% com amostras de extrato de folhas de curauá roxo. Faixas: (LMW) marcador de baixa massa molar; (1) extrato bruto; (2) extrato diluído 2 vezes; (3) extrato diluído 3 vezes; (4) extrato diluído 4 vezes; (5) extrato diluído 5 vezes; (M) marcador de bromelina, feito com solução de bromelina comercial (Fluka, EUA)

Como já era de se esperar, outras bandas foram observadas no perfil da eletroforese, pois o extrato de curauá possui um conjunto de enzimas proteolíticas, ficando evidente a necessidade de métodos de purificação para tornar a enzima pura. Dependendo da aplicação uma pureza mais elevada é exigida. Neste trabalho toda a proteína purificada tem como destino a fabricação de pomadas, géis, cremes e loções.

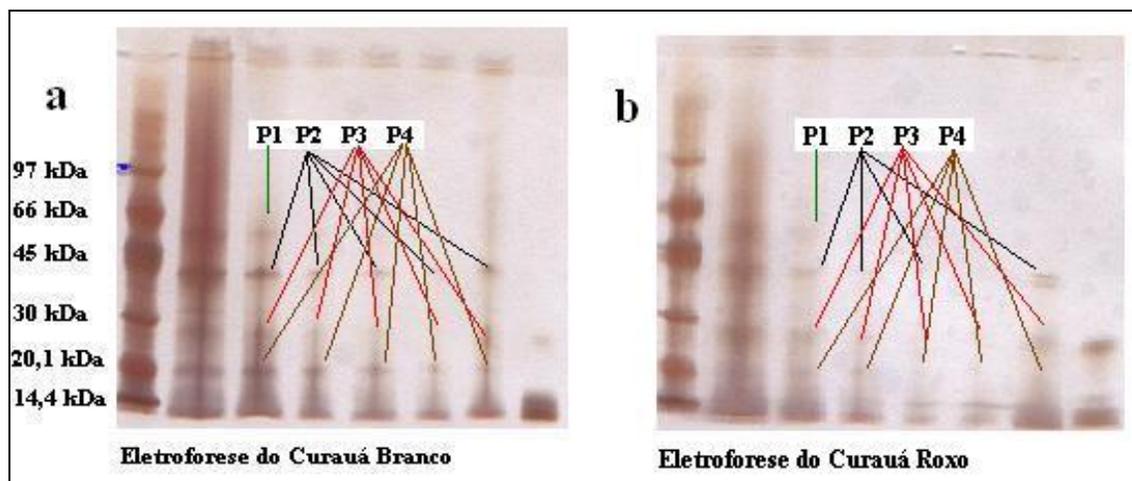


Figura 4.6 – Bandas de Massa Molar nos perfis eletroforéticos de proteínas de extrato de folhas de curauá. P1, P2, P3 e P4 indicam as bandas de diferentes massas molares em cada amostra de curauá branco (a) e roxo (b)

Lopes et al. (2009), utilizando eletroforese SDS-PAGE observaram que na purificação da bromelina da polpa do abacaxi (*Ananas comosus*) por ultrafiltração, a massa molar é de 24,5 kDa. Murachi (1976) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração, e determinou a massa molar da fração pura de 28 kDa, por SDS-PAGE. Yamada et al. (1975) caracterizaram o abacaxi e encontraram massas molares de 31 e 28 kDa para o fruto e talo, respectivamente.

4.1.4. Cinética da Reação de Hidrólise de BSA por Bromelina

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada a pH 8,5 tanto para o curauá branco quanto para o roxo, por ser neste pH a atividade máxima da enzima e temperatura de 30 °C para o curauá branco e 35 ° para o curauá roxo, para otimização dos resultados.

A reação catalisada por uma enzima utiliza a mesma quantidade de substrato e gera a mesma quantidade de produto que uma reação não catalisada. Tal como ocorre em outros tipos de

catálise, as enzimas não alteram em absoluto o equilíbrio da reação entre substrato e produto. Ao contrário do que acontece em outras reações químicas, as enzimas saturam-se. Isto significa que com uma maior quantidade de substrato, mais centros catalíticos estarão ocupados, o que aumentará a eficiência da reação, até o momento em que todos os sítios possíveis estejam ocupados. Nesse momento o ponto de saturação da enzima é alcançado e, embora se adicione mais substrato, não aumentará mais a eficiência (PESSOA JR., 2001).

A Figura 4.7 demonstra a influência da concentração do substrato, na velocidade de hidrólise de BSA por bromelina das folhas de curauá.

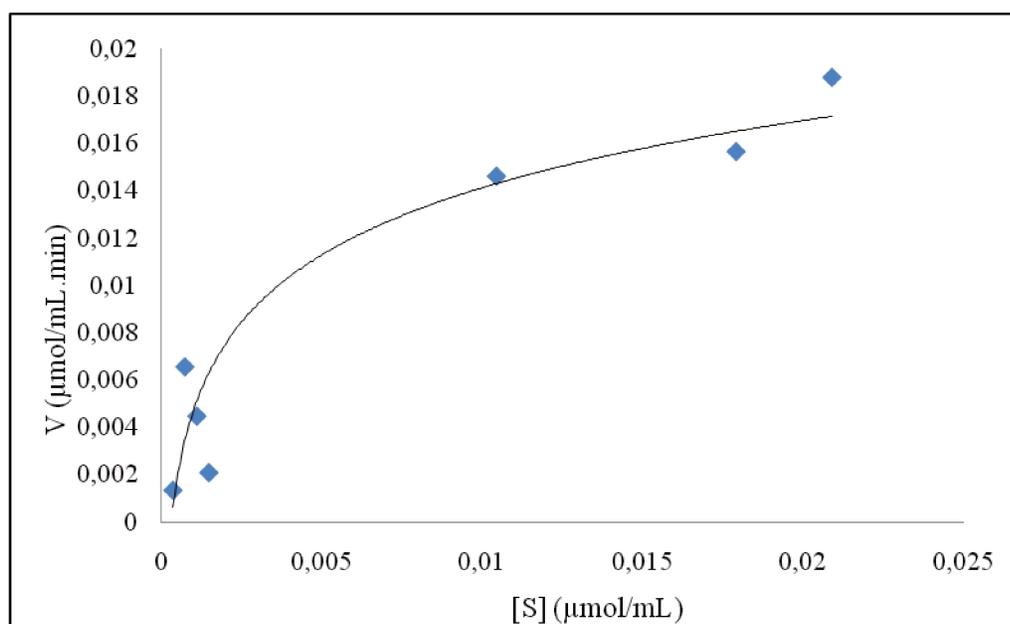


Figura 4.7 – Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas das folhas do curauá branco, a pH 8,5 e 30 °C.

Os dados cinéticos foram linearizados de acordo com a metodologia de Lineweaver-Burk e são apresentados na Figura 4.8.

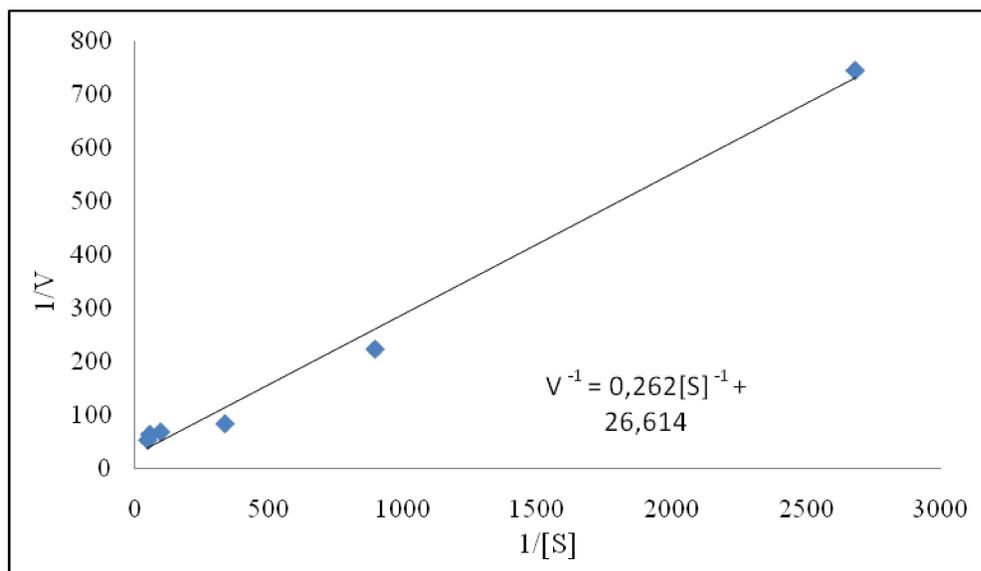


Figura 4.8 – Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk – Curauá branco, a pH 8,5 e 30 °C.

Quando os dados experimentais do curauá branco foram ajustados ao modelo da Equação 3.3, obteve-se o valor da constante K_m (concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima) igual a 0,00985 $\mu\text{mol/mL}$. O valor de V_{max} encontrado foi igual a 0,03757 $\mu\text{mol de BSA/mL.min}$.

A Figura 4.9 apresenta a influência da concentração do substrato, na velocidade de hidrólise de BSA por bromelina das folhas de curauá roxo.

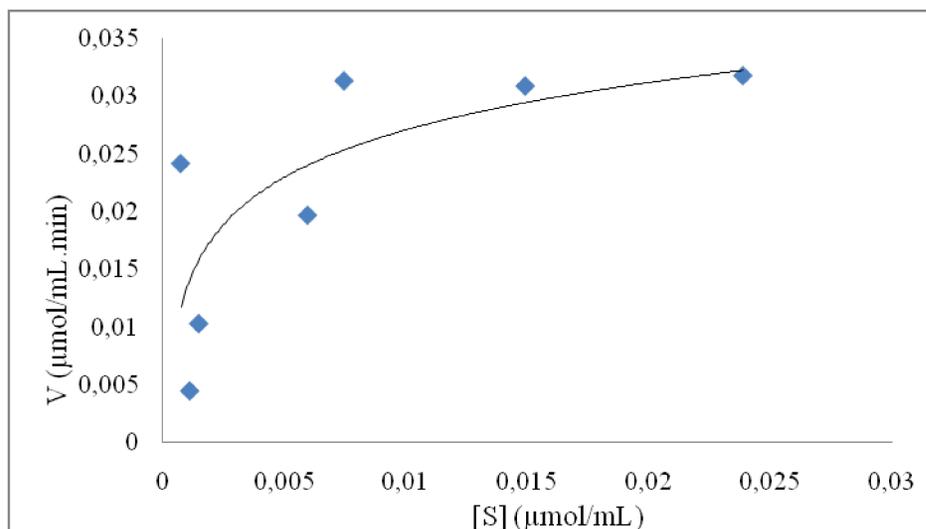


Figura 4.9 – Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas das folhas do curauá roxo, a pH 8,5 e 35 °C.

Novamente, os dados cinéticos foram linearizados de acordo com a metodologia de Lineweaver-Burk e são apresentados na Figura 4.10.

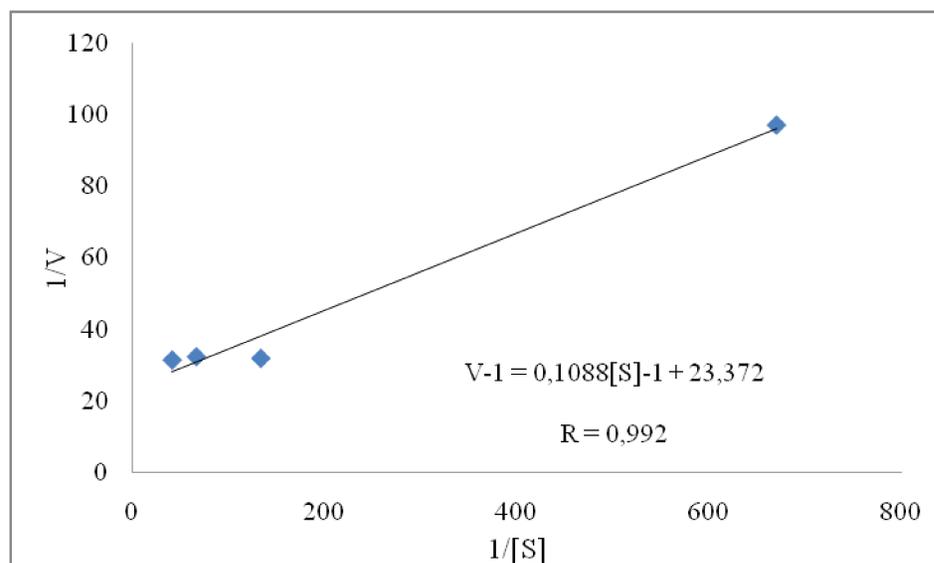


Figura 4.10 – Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk – Curauá roxo, a pH 8,5 e 35 °C.

Ajustando-se os dados experimentais do curauá roxo ao modelo da Equação 3.3, obteve-se o valor da constante K_m igual a 0,00465 $\mu\text{mol/mL}$. O valor de V_{max} encontrado foi igual a 0,0428 $\mu\text{mol de BSA/mL.min}$ para o curauá roxo.

Para melhor visualização dos dados cinéticos, estes foram agrupados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Parâmetros cinéticos do resíduo do curauá branco e roxo, antes da purificação em sistema bifásico aquoso.

Parâmetros cinéticos	Curauá branco	Curauá Roxo
K_m ($\mu\text{mol/mL}$)	0,00985	0,00465
$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol de BSA/mL.min}$)	0,03757	0,0428

Comparando-se os parâmetros cinéticos obtidos para a bromelina do curauá e do abacaxi, de acordo com Ferreira (2007), podemos notar valores bem próximos. O valor de V_{max} encontrado para a bromelina do abacaxi foi igual a 0,03789 $\mu\text{mol de BSA/mL.min}$.

4.2. Diagramas de Fases e Estabelecimento das Linhas de Amarração

As composições dos diagramas de fases PEG4000/Sal foram estabelecidas por Ferreira (2007) e utilizados neste trabalho. Foi verificado que massas molares de PEG maiores apresentavam melhores fatores de purificação. Sendo assim, novos testes foram feitos para sistemas com PEG 6000, para pHs 7, 8 e 9. Esses valores de pH foram escolhidos baseados no estudo anterior que prova que a atividade máxima da enzima é em pH 8,5.

A Tabela 4.2 apresenta as composições dos sistemas de duas fases aquosas, PEG/Sal para diferentes pHs, utilizados nesta pesquisa.

Tabela 4.2 - Composição dos sistemas PEG 6000/Sal a $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ nos diferentes pHs.

Linha de Amarração	Composição do Sistema para pH 7,0 (%m/m)			Composição do Sistema para pH 8,0 (%m/m)			Composição do Sistema para pH 9,0 (%m/m)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	11,60	21,00	67,40	10,50	23,70	65,80	11,29	18,99	69,72
2	11,10	17,50	71,40	10,10	21,10	68,80	10,78	17,78	71,44
3	10,80	14,60	74,60	9,90	18,30	73,50	10,38	16,37	73,24

A obtenção dos dados experimentais de equilíbrio se deu pelo método da turbidez. Concentrações de 15% de fosfato e 50% de PEG foram utilizadas. Essas concentrações foram escolhidas pela facilidade da dissolução dos sais de fosfato na temperatura ambiente e fácil manipulação do PEG na viscosidade característica da concentração de 50%.

4.3. Estudo da Partição da Bromelina das Folhas do Curauá

O parâmetro utilizado para se medir a eficiência do processo de purificação por sistema bifásico aquoso é o coeficiente de partição. Este leva em consideração as concentrações finais de proteína e atividade contidas na fase superior (Fase rica em PEG) e na fase inferior (rica em Sal).

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

Outro parâmetro importante e comumente utilizado para se determinar a eficiência do sistema bifásico aquoso é o fator de purificação, que mostra claramente quantas vezes a sistema se tornou mais pura.

A purificação de proteínas usando sistemas de duas fases aquosas é influenciada por vários fatores, tais como pH do sistema, massa molar do polímero, concentração e propriedades das proteínas, como estrutura, hidrofobicidade e massa molar, e tipo e concentração de sais presentes no sistema (ALMEIDA et al., 1998).

Este estudo, utilizando processo de extração em batelada e através da avaliação da atividade específica e do coeficiente e partição da proteína, tem a finalidade de encontrar as condições adequadas de um sistema bifásico aquoso, que permitam obter resultados viáveis de extração da bromelina das folhas do curauá, variando-se pH do sal, comprimento da linha de amarração (concentração de PEG e sal) e massa molar do PEG.

Pode-se observar nas Tabelas de 4.3 a 4.13 a atividade específica da enzima, quantidade de proteínas totais e fatores de purificação para cada linha de amarração em estudo.

Tabela 4.3: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 7.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	18,73471143	0,004778192	2,81070139
	Fase Pesada	32,57346645	0,004809287	2,82899229
2	Fase Leve	22,02277071	0,006301824	3,70695542
	Fase Pesada	35,75312817	0,006467662	3,80450688
3	Fase Leve	30,62231039	0,007711443	4,53614282
	Fase Pesada	54,72270098	0,007296849	4,29226417

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

Tabela 4.4: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 8.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	21,64940134	0,004919845	1,36662367
	Fase Pesada	47,8816106	0,004712548	1,30904121
2	Fase Leve	22,23956583	0,008043118	2,23419937
	Fase Pesada	37,74041675	0,006633499	1,84263866
3	Fase Leve	32,32053881	0,005078773	1,41077022
	Fase Pesada	87,74782392	0,00462272	1,28408882

Tabela 4.5: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 9.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	35,39180298	0,008395522	2,39872068
	Fase Pesada	113,0405877	0,007835821	2,23880597
2	Fase Leve	28,97828074	0,008675373	2,47867804
	Fase Pesada	74,14393028	0,008488806	2,42537313
3	Fase Leve	30,65844291	0,007773632	2,22103767
	Fase Pesada	68,16399828	0,008115672	2,31876333

Tabela 4.6: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 7.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	32,21214125	0,008706468	3,34864141
	Fase Pesada	54,86723106	0,005804312	2,23242761
2	Fase Leve	22,09503575	0,005555556	2,13675214
	Fase Pesada	50,09773847	0,005638474	2,16864396
3	Fase Leve	21,30012032	0,005348259	2,05702258
	Fase Pesada	31,63402094	0,005441542	2,09290088

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

Tabela 4.7: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato a pH 8.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	34,81368266	0,005721393	1,634683724
	Fase Pesada	88,61500439	0,00526534	1,504382848
2	Fase Leve	32,39280385	0,010033167	2,866619285
	Fase Pesada	77,55845338	0,008084577	2,309879176
3	Fase Leve	33,3141831	0,010281924	2,93769249
	Fase Pesada	61,91307238	0,004787728	1,367922293

Tabela 4.8: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 7.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	21,73371056	0,004477612	2,633889377
	Fase Pesada	50,3506661	0,006094527	3,585016096
2	Fase Leve	19,47542808	0,006716418	3,950834065
	Fase Pesada	45,02111946	0,005771144	3,394790752
3	Fase Leve	20,43293985	0,005870647	3,453321627
	Fase Pesada	38,64372974	0,006434494	3,784996586

Tabela 4.9: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 8.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	19,4212293	0,005317164	1,47699005
	Fase Pesada	32,79026156	0,004881841	1,356066888
2	Fase Leve	20,10774717	0,004975124	1,381978994
	Fase Pesada	34,66915258	0,005140962	1,42804496
3	Fase Leve	32,44700263	3,9801E-05	0,011055832
	Fase Pesada	51,81403315	3,9801E-05	0,011055832

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

Tabela 4.10: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 9.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	16,63902529	0,007835821	2,23880597
	Fase Pesada	38,17400699	0,009577114	2,736318408
2	Fase Leve	23,17901134	0,006281095	1,794598436
	Fase Pesada	42,72670446	0,007587065	2,167732765
3	Fase Leve	23,2874089	0,007960199	2,274342573
	Fase Pesada	37,74041675	0,006301824	1,800521204

Tabela 4.11: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 7.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	26,86452834	0,008291874	3,189182294
	Fase Pesada	55,87894161	0,005306799	2,041076668
2	Fase Leve	23,70895496	0,004988944	1,91882468
	Fase Pesada	49,47144146	0,006094527	2,344048986
3	Fase Leve	22,05890323	0,005306799	2,041076668
	Fase Pesada	45,14758328	0,005638474	2,16864396

Tabela 4.12: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá branco por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 8.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	34,19942983	0,006467662	1,84790334
	Fase Pesada	70,54874458	0,006384743	1,824212272
2	Fase Leve	20,57746993	0,005628109	1,608031272
	Fase Pesada	33,80197211	0,004291045	1,226012793
3	Fase Leve	27,26198606	0,007752902	2,215114902
	Fase Pesada	46,44835398	0,007089552	2,025586354

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

Tabela 4.13: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 8.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	16,63902529	0,007835821	2,23880597
	Fase Pesada	38,17400699	0,009577114	2,736318408
2	Fase Leve	23,17901134	0,006281095	1,794598436
	Fase Pesada	42,72670446	0,007587065	2,167732765
3	Fase Leve	23,2874089	0,007960199	2,274342573
	Fase Pesada	37,74041675	0,006301824	1,800521204

Tabela 4.14: Variáveis calculadas para a enzima bromelina proveniente do resíduo do curauá roxo por sistema bifásico aquoso PEG 6000/Fosfato a pH 9.

LA	Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	AE (U)	FP
1	Fase Leve	19,09604321	0,004519387	1,33846701
	Fase Pesada	45,79797191	0,005452397	1,60048921
2	Fase Leve	25,47343910	0,006447104	1,90924733
	Fase Pesada	45,70764319	0,008727856	2,57012394
3	Fase Leve	23,14288671	0,004726330	1,39204828
	Fase Pesada	37,01771777	0,004540489	1,54637600

Os coeficientes de partição estão representados nos Figuras 4.11 a 4.14.

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

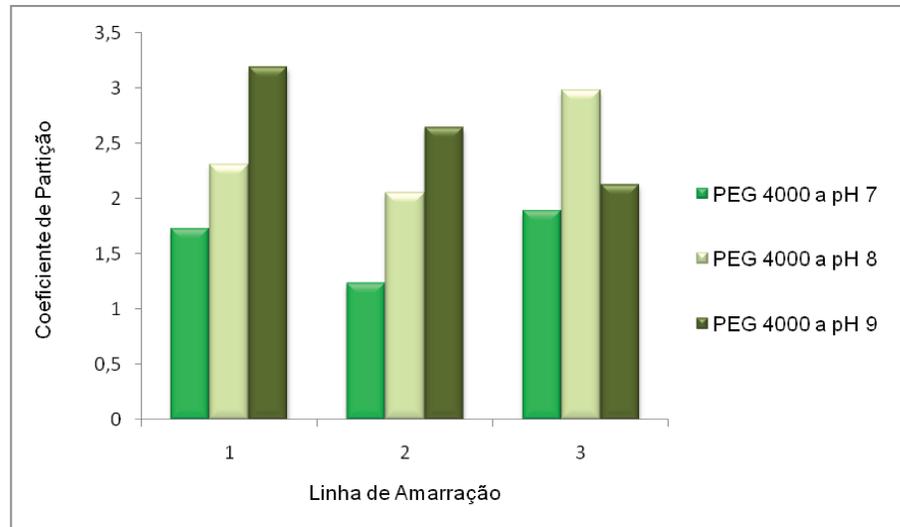


Figura 4.11. Coeficientes de partição para o SBA PEG 4000/Fosfato a pHs 7, 8 e 9 (Curauá Branco).

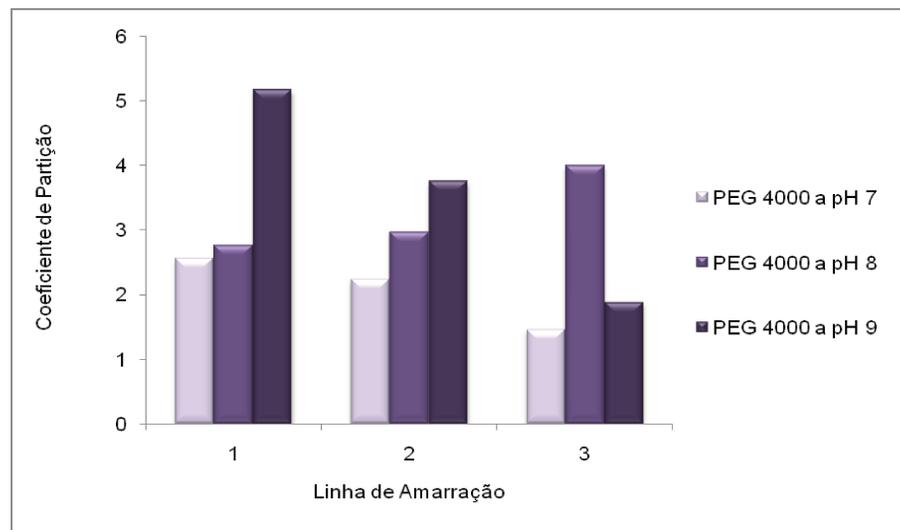


Figura 4.12. Coeficientes de partição para o SBA PEG 4000/Fosfato a pHs 7, 8 e 9 (Curauá Roxo).

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

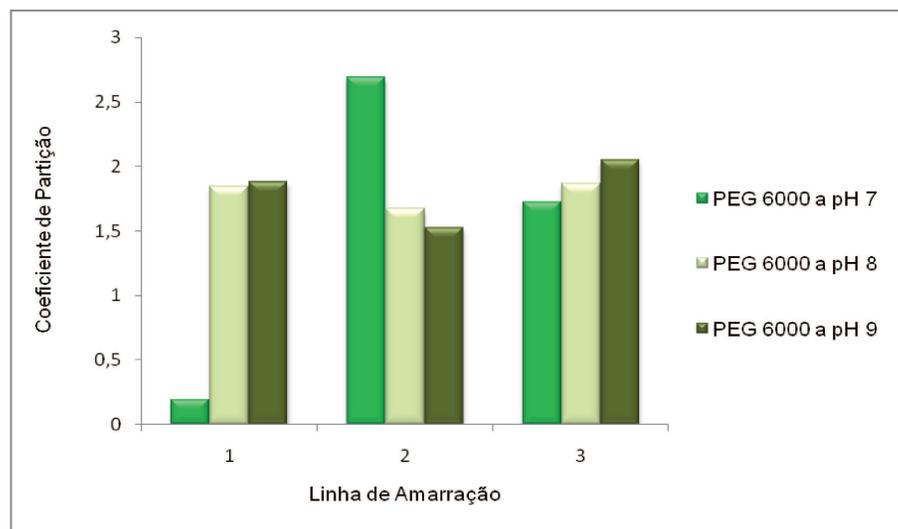


Figura 4.13. Coeficientes de partição para o SBA PEG 6000/Fosfato a pHs 7, 8 e 9 (Curauá Branco).

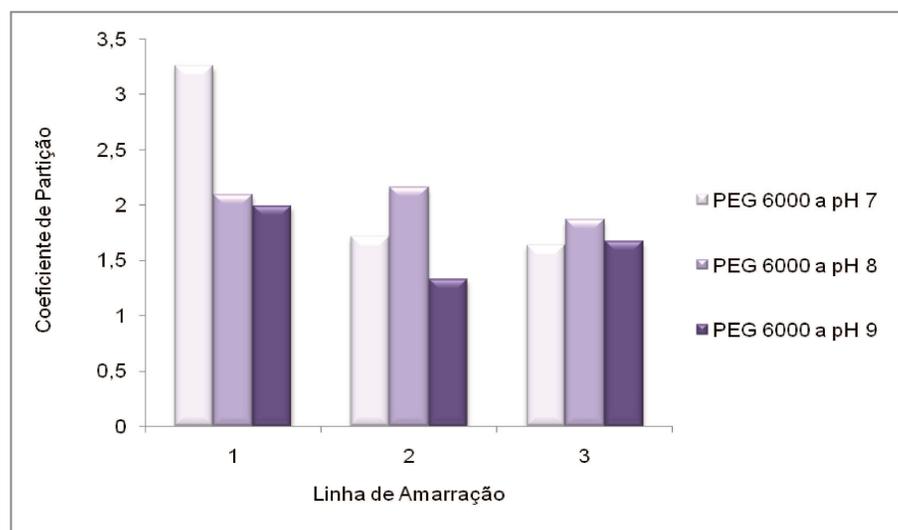


Figura 4.14. Coeficientes de partição para o SBA PEG 6000/Fosfato a pHs 7, 8 e 9 (Curauá Roxo).

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

Como se observa nos resultados apresentados nas Figuras 4.11 e 4.14, as partições foram superiores a unidade, indicando que as proteases das folhas de curauá branco e roxo, possuem afinidade com o PEG, ou seja, migram para a fase superior.

Nota-se que a melhor purificação do curauá branco em PEG 4000 se deu a pH 9, TL1, sendo $K = 3,3$. Já para o curauá roxo, em PEG 4000^o foi em pH 9, também na composição de equilíbrio da Linhas de amarração 1.

Pôde-se perceber também que quando se aumenta a massa molar do polímero constituinte do SBA, os valores de K não aumentam muito. Conclui-se então que o PEG 4000, dentre os estudados até agora é o que apresenta melhor eficiência.

A melhor purificação do curauá branco e roxo, para sistemas com PEG de massa molar 6000 se deu a pH 7, TL2 e pH 7, TL1, com valores de K de 2,7 e 3,3, respectivamente.

Nos sistemas em que foi utilizado o PEG 4000, observou-se que a partição tende a aumentar com o aumento do pH do sistema, mas quando se utiliza o PEG 6000, esta tendência não é observada.

Observa-se que os comportamentos do curauá branco e roxo são semelhantes, nos SBA com PEG 4000. Nas linhas de amarração 1 e 2 tendem a aumentar o K com o aumento do pH, enquanto que na linha de amarração 3, o K apresenta um comportamento parabólico com o aumento do pH.

Observa-se a variação do K com o aumento do pH para o curauá branco e roxo, nos SBA com PEG 6000. Neste caso, as tendências não apresentam semelhança quando comparados os curauás branco e roxo.

A bromelina comercial proveniente do abacaxi, fornecida pela SIGMA (2010), apresenta um teor de bromelina de 3 a 6 U com 35% de proteína total, medida por Biureto, segundo (SBRUZZI, 2010).

Em estudos efetuados por Ferreira (2007) na purificação da bromelina da casca e talo do abacaxi, foi verificado que na maioria dos SBA estudados a enzima se concentrou na fase inferior, indicando maior afinidade da enzima com a fase salina. Também concluiu que a purificação ocorreu melhor nos sistemas de pHs 9, 10 e 11.

A próxima etapa do trabalho consistiu em comparar o pH e temperatura ótimos antes e depois da purificação. Foram utilizados os sistemas que apresentaram melhor eficiência. Tanto para o curauá branco quanto para o roxo curauá branco PEG4000 a pH 9, TL1.

Os sistemas bifásicos foram reproduzidos em tubos graduados de 8 mL e analisadas as fases superior e inferior depois da purificação.

Os resultados podem ser vistos nos gráficos 4.15 e 4.16 para pH ótimo e 4.17 e 4.18 para temperatura ótima.

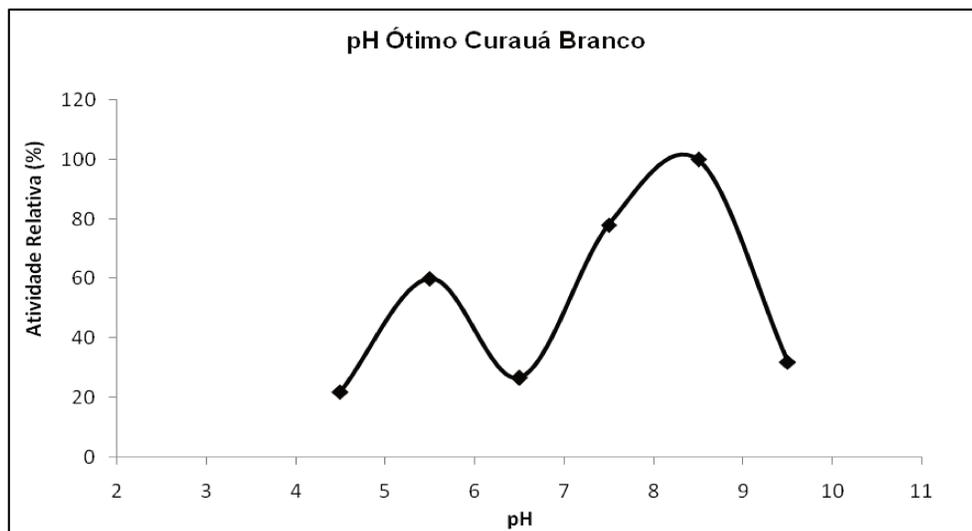


Figura 4.15. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá branco depois da purificação em SBA.

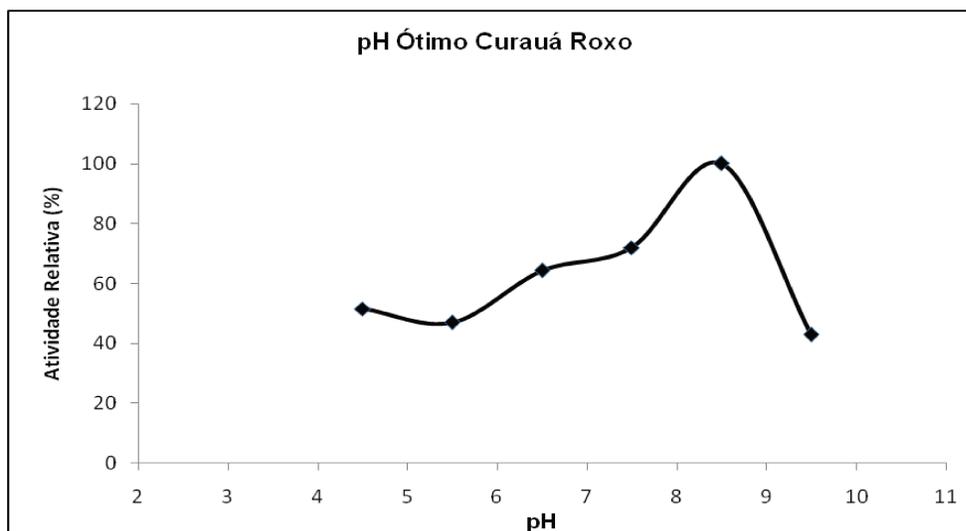


Figura 4.16. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá roxo depois da purificação em SBA.

Analisando-se os resultados obtidos para curauá branco, nota-se a presença de dois picos, um em pH 5,5 e outro em 8,5, o que confirma os valores ótimos de pH antes e depois da purificação.

Já para o curauá roxo pôde-se perceber claramente um pico em pH 8,5. Comparando-se os resultados obtidos antes e depois da purificação chega-se a conclusão que o pico em pH 5,5 que pôde-se observar no Figura teve sua concentração reduzida, tornando a enzima mais pura.

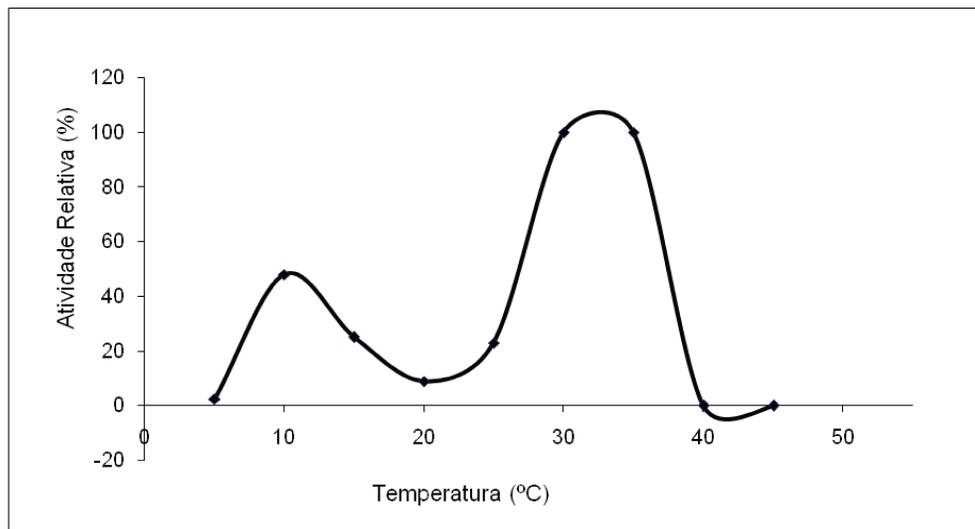


Figura 4.17. Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá branco depois da purificação em SBA.

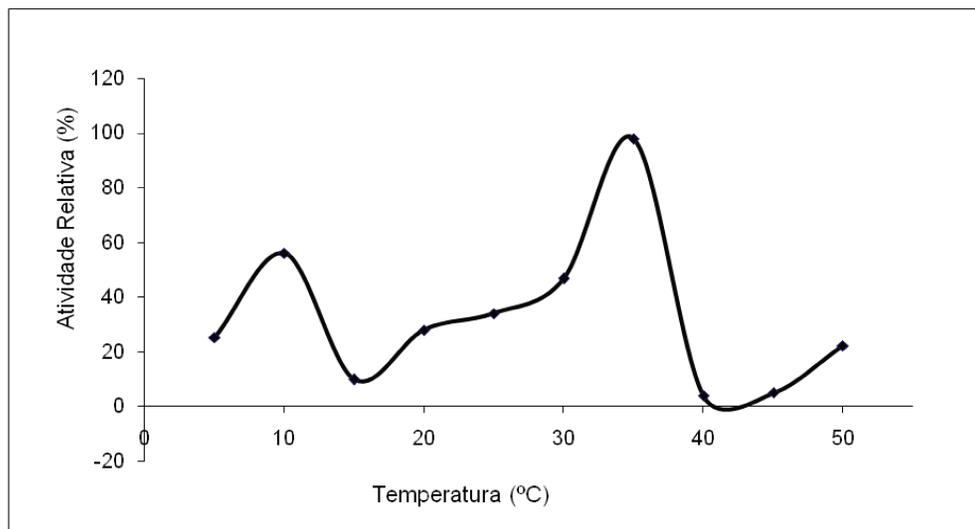


Figura 4.18. Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica do conjunto de enzimas bromelina do curauá roxo depois da purificação em SBA.

Analisando-se a temperatura ótima após a purificação, podem-se notar picos em 10° e 32°C para o curauá branco e 10° e 35°C para o curauá roxo. Pode-se dizer que os valores

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

apresentaram muita semelhança com os obtidos antes da purificação, exceto para o curauá roxo, que além dos picos em 10° e 35° apresenta também um em 20°C, que não se pode observar depois da purificação.

Capítulo 5 – CONCLUSÕES

Pôde-se concluir que os valores de pH ótimo foi de 8,5 antes e depois da purificação em SBA tanto para o curauá roxo quanto para o branco, onde a atividade da enzima é máxima.

Concluiu-se também valores de temperatura ótimos. Antes da purificação, picos em 10°C e 32°C para o curauá branco e 10°C, 20°C e 35°C para o roxo foram observados. Depois da purificação o sistema apresentou os mesmos picos, exceto para a temperatura de 20°C.

A presença de dois ou mais picos onde a atividade foi elevada, tanto no estudo do pH quanto no estudo da temperatura, indica que existe mais de uma protease nas folhas de curauá, por isso durante o trabalho chamamos a enzima bromelina de um conjunto de enzimas bromelinas, que apresentam características muito parecidas.

Na estimativa da Massa Molar das enzimas do curauá, verificou-se que, para ambas as espécies de curauá (branco e roxo), a eletroforese apresentou bandas de massa molar de 24 kDa, semelhante à bromelina comercial proveniente do abacaxi.

Na análise dos parâmetros cinéticos, obteve-se valores da constante K_m igual a 0,00985 $\mu\text{mol/mL}$ e o valor de V_{max} igual a 0,03757 $\mu\text{mol de BSA/mL.min}$ para o curauá branco e para o curauá roxo, os valores encontrados foram K_m igual a 0,00465 $\mu\text{mol/}$ e V_{max} igual a 0,0428 $\mu\text{mol de BSA/mL}$.

Notamos que a melhor purificação do curauá branco em PEG 4000 se deu a pH 9, TL1, sendo $K = 3,3$. Já para o curauá roxo, em PEG 4000 foi em pH 9, também na composição de equilíbrio da linhas de amarração 1.

A melhor purificação do curauá branco e roxo, para sistemas com PEG de massa molar 6000 se deu a pH 7, TL2 e pH 7, TL1, com valores de K de 2,7 e 3,3, respectivamente.

As partições foram superiores a unidade, indicando que as proteases das folhas de curauá branco e roxo, possuem afinidade com o PEG. Os sistemas bifásicos aquosos, em que se

Capítulo 5 – Conclusões e Sugestões

utiliza PEG 4000 apresentam melhores resultados na partição da bromelina, se comparados aos sistemas em que se utiliza PEG 6000.

Tanto para o curauá branco, quanto para o curauá roxo, o melhor sistema de partição da bromelina foi o SBA PEG 4000 em pH 9, linha de amarração 1, em que os coeficientes de partição encontrados foram 3,3 e 5,2 para o curauá branco e roxo respectivamente.

Por fim, conclui-se que o conjunto de enzimas proteolíticas presentes no resíduo do curauá apresenta comportamento semelhante a bromelina do abacaxi, apresentando quantidades de proteínas totais e atividade enzimática consideráveis. Com isso podemos ter uma nova fonte de obtenção da enzima bromelina, que atualmente é usada como ração e adubo orgânico.

Capítulo 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.A. *Chromatography and partition of cells and cell fragments*. Nature, 3. Ed. New York, 1956.

ALBERTSSON, P. A. *Particle fractionation in liquid two-phase systems*. The composition of some phase systems and the behaviour of some model particles in them. Application to the isolation of cell walls from microorganisms. *Biochim*, 1958.

ALBERTSSON, P.A. *Partition of cell particles and macromolecules*. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.

ALBERTSSON, P.A., TJERNELD, F. Phase diagrams. In: *Methods in Enzymology*, v. 228, p. 3-13, 1994.

ALMEIDA, M.C.; VENÂNCIO, A; TEIXEIRA, J.A; AIRES-BARROS, M.R. Cutinase purification on polyethylene glycol/hydroxypropyl starch aqueous two phase systems, *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 151-159, 1998.

ASENJO, J.A.; CHAUDHURI, J.B. Innovative separation methods in bioprocessing. In: *Separation processes in the food and biotechnology industries: Principles and Applications*.

ASENJO, J.A. *Separation processes in biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1990.

ASENJO, J.A. *Aqueous two-phase for: I. Systems, principles and manipulation of selectivity. II. Processes and models*. São Paulo: Apostila do Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1994.

BALDINI, V.L.; IADEROSA, M.; FERREIRA, E.A.; SALES, A.M.; DRAETTA, I.S.; GIACOMELLI, E.J. *Ocorrência da bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro*. Colet. ITAL, Campinas, v. 23, p. 44-55, 1993.

BAMBERGER, S.; BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; VAN ALSTINE, J.M.; WEBWE, T.J. Preparation of phase system and measurement of their 87 physicochemical properties. In:

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

Partitioning in aqueous two-phase systems. BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. Orlando: Academic Press, 1985.

BASKIR, J.N.; HATTON, T. A.; SUTTER, U.W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 34, p. 541-558, 1989.

BECZE, C.G. Food enzymes. *CRC Critical Reviews in Food Technology*. Cleveland, v. 1, p. 479-518, 1970.

BELTER P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W.S. *Bioseparations: Downstream processing for biotechnology*. New York: John Wiley & Sons, 1988.

BERGER, N. *Agronomische Optimierung des Anbaus von Curauá (Ananas lucidus Miller) in der östlichen Amazonas Region von Brasilien*. Relatório de Conclusão do Projeto de Pesquisa. Universidade de Hohenheim, DaimlerChrysler AG e DaimlerChrysler do Brasil. Hohenheim, 2003.

BORRACINI, H.M.P. *Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Tese (Mestrado)

BRADFORD, M. M.; *Analytical biochemistry*, 72, 248-254, 1976.

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Reversed micelles in liquid-liquid extraction. In: *Recovery processes for biological materials*. KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. (ed). New York: John Wiley & Sons, 1993.

CAMPESE, G.M., *Extração e recuperação da bromelina em sistemas de duas fases aquosas PEG4000 – POLICAJU*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Tese (Doutorado)

CASCONE, O.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Partition and purification of thaumatin in aqueous two-phase system. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 13, p. 629-635, 1991.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

CATÁLOGO SIGMA. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog>>. Acesso em: mar 2010.

CESAR, A. C. W. *Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi*. Dissertação de Mestrado. Campinas, SP, Brasil, FEQ/UNICAMP, 2000.

CESAR, A.C.W., *Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Tese (Doutorado).

CESAR, A.C.W.; SILVA, R.; LUCARINI, A.C. Recuperação das enzimas proteolíticas presentes na casca e talo do abacaxi. *Revista de Iniciação Científica*, São Carlos, v. 1, n. 1, p. 47-53, 1999.

COIMBRA, J.S.R., *Desempenho de um extrator tipo graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Tese (Doutorado).

UFPR, Departamento de Bioquímica, 2005.

ERENO, D. Leve e resistente. Curauá substitui fibra de vidro em peças de carro e entra na composição de vigas à prova de terremotos. Pesquisa FAPESP online. Ed. 141 - Novembro 2007. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=3391&bd=1&pg=1&lg>>. Acesso em: set 2008.

FEBRAFARMA. Disponível em: <<http://www.protec.org.br/noticias.asp?cod=1187>>. Acesso em jan 2009.

FERREIRA, J.F. *Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Tese (Mestrado)

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M. R. protein partition at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, p. 986-994, 1991.

FRANCO, T.T. *Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity and charge*. Reading, UK: School of Agriculture, Policy and Development, University of Reading, 1992. Tese (Doutorado)

FREIMANN, L.O.; SABAA SRUR, A.U.O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*, (L.) Merrill.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 19, n. 2, p.170-173, 1999.

GORTNER, W.A.; SINGLETON, V.L. Chemical and physical development of the pineapple fruit. nitrogenous and enzyme constituents. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 30, n.1, p. 24-9, 1965.

GRANDISON, A.S. (ed); LEWIS, M.J. (ed). Cambridge, U.K.: Woodhead Publ. Limited, 1996.

GREENBERG, D.M. Plant proteolytic enzymes. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, v. 1, p. 54-64, 1965.

GUAN, Y.; LILLEY, T.H.; TREFFRY, T.E. A new excluded volume theory and its application to the coexistence curves of aqueous polymer two-phase systems. *Macromolecules*, v. 26, p. 3971- 3979, 1993.

GUAN, Y.; TREFFRY, T.E.; LILLEY, T.H. Application of a statistical geometrical theory to aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 31- 45, 1994.

HALPERN, M.J. *Bioquímica*. 1. Ed. Lisboa: Editora Lidel Portugal, p. 233-303, 1997.

HARRIS, J.M. Poly(ethylene glycol). *Chemistry: Biotechnical and biomedical applications*. New York: Plenum Press, 1992.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

- HARRIS, E.L.V.; ANGAL, S. *Protein purification methods. A practical approach*. 5. ed. Oxford: IRL Press, 1994.
- HIRANO, Z.M.B.; SILVA FILHO, H.H.; MULLER, G.C.K. ; SCHIMIDT, S.R. *Bioquímica: manual prático*. Blumenau: Editora da FURB, 2001.
- HUSTEDT, H.; KRONER, K.H.; PAPAMICHAEL, N. Continuous cross-current aqueous two-phase extraction of enzymes from biomass: automated recovery in production, *Process Biochemistry*, v. 23, p. 129-137, 1988.
- JOHNSON, J.C. *Industrial enzymes: recent advances*. New Jersey: Noyes Data Corporation, 1977.
- KHAN, R.H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S.K. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Journal of Biosciences*, v. 28, p. 709-714, 2003.
- KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR, A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: *Biotechnologia industrial. Volume II. Engenharia Bioquímica*. Cood: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.
- KO, Y.H.; KANG, Y.J. Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju Island, *Nonmunjip-Cheju Taehakkyo, Chayon Wahakpyon*, 31, 137-142, 1990.
- KRONER, K.H.; HUSTEDT, H.; KULA, M.R. Extractive enzyme recovery: economic considerations. *Process Biochemistry*, v. 19, n. 5, p. 170-179, 1984.
- KULA, M.R. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 24, p. 73-118, 1982.
- KULA, M.R. Use of phase partitioning to scale up protein purification. In *Protein purification: micro to macro*. BURGESS R.J. (ed). New York: Liss, A.R., 1987.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

- KULA, M-R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation*, v. 1, p. 181-189 1990.
- LEÃO, A.L., TAN, I.H., CARASCHI, J.C. Curaua fiber – A tropical natural fibers from Amazon - Potential and application in composites. *International Conference on Advanced Composites*, pp. 557–564, Hurghada, Egito, 1998.
- LEDO, I.A.M. *O cultivo do curauá no Lago Grande da Franca*. Banco de Crédito da Amazônia S/A, 1967. 23p.
- LOPES, F.L.G. Recuperação da bromelina a partir da polpa do Ananas Comosus L. Merrill, utilizando processo de separação por membrana. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Tese (Doutorado)
- LOPES, F.L.G.; SEVERO JR, J.B.; SOUZA, R.R.; EHRHARDT, D.D.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOURGI, E.B. Concentration by membrane separation processes of a medicinal product obtained from pineapple pulp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 2, p. 457-464, 2009.
- MATTIASSON, B.; LING, T.G.I. Extraction in aqueous two-phase systems for biotechnology. In: *Separations for biotechnology*. VERRALL, M.S.; HUDSON, M.J. (Eds.). Chichester: Ellis Horwood, p. 270-292, 1987.
- MATTOS, P.E.O. *Validação clínica da suplementação de bromelaína para atletas. Projeto de Pesquisa*, Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular, UNIFESP, São Paulo, 2005.
- MEINIG, G.E. Bromelain. *Phytomedicine*, v. 2, p. 1-2, 1999.
- MICHELINI, J. *Atividade de bromelina em plantas de curauá (Ananas erectifolius L.B.Smith) em diferentes condições físico-químicas, na fase de extração da fibra*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2003. Relatório de Iniciação Científica
- MINAMI, N.M. *Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação da*

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

amiloglicosidase. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997. Tese (Mestrado)

MOORE, D.J.; CAYGILL, J.C. Proteolytic activity of malaysian pineapple. *Tropical Science*, London, v.21, n.2, p.97-102, 1979.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. *Manual de soluções, reagentes e solventes*. 2. Ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1986.

MORRIS, J. G. Cinética de reações catalisadas por enzimas. In: *Físico-química para biólogos*. 1. Ed. São Paulo: Editora Polígono, Edusp, p. 323 – 367, 1972.

MORRISON, R.T.; BOYD, R.N., *Química orgânica*. 8. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: *Methods in Enzymology*, vol. XLV. New York: Ed. L. Lorand, Academic Press, p. 475-485, 1976.

MURACHI, T.; NEURATH, H. Fractionation and specificity studies on stem bromelain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 235, n. 1, p. 99-107, 1960.

MYNOTT, T.L.; LADHAMS, A.; SCARMATO, P.; ENGWERDA, C.R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. *Journal of Immunology*, v. 163, p. 2568-2575, 1999.

PAPAMICHAEL, N. BÖRNER, B. E HUSTEDT, H. Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated and recycling of process chemicals, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 54, p. 47-55, 1992.

PATHAK, S.P.; SUDHA, S.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. New salt-polyethylene-glycol systems for two-phase aqueous extraction. *The Chemical Engineering Journal*, v. 46, p. b31-b34, 1991.

PEMATEC. Projeto Curauá. Disponível em <<http://www.pematecpara.com.br/projeto.asp>>.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

Acesso em: jul. 2009.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CASTRO, D.M.; RODRIGUES, H.C.A.; BEIJO, L.A.; LAMEIRA, O.A. *Caracteres anatômicos de fibras foliares de brotações de curauá propagadas in vitro* - ActaSciBiolSci. Maringá, v. 29, n. 1, p. 23-28, 2007.

PETER, H.W.; AHLERS, J.; MOREIRA, R.A. *Cinética enzimática*. 1. ed. Fortaleza: EDUFC, p. 12-21, 1987.

RASHEEDI, S.; HAQ, S.K.; KHAN, R.H. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Biochemistry*, v. 68, p. 1097-1100, 2003.

RAMALHO, E. *A folha amazônica que virou arte*. [s.l.: s.n.], 2005. Disponível em: <http://www.rfi.fr/actubr/articles/068/article_124.asp>. Acesso em: out. 2008.

REGULY, J, C, *Biotecnologia dos Processos Fermentativo*. Produção de enzimas–Engenharia das fermentações, Vol.3, Pelotas-RS: EDUFPel, 2000, 230p.

RICARDO, C.P.; TEIXEIRA, A. *Enzimas*. 4. ed. Lisboa: Editora Didática, 160 p. 1993.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B*, v. 807, p. 3–11, 2004.

ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J., BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, v. 266, n. 3, p. 869-875, 1990.

SANTANA J.C.C. *Caracterização e recuperação das enzimas α e β - amilases por sistema de adsorção em leito expandido*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 2006. Tese (Doutorado).

SATYANARAYANA, K.G.; GUIMARÃES, J.L.; WYPYCH, F. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production, morphology, properties and applications. *Composites*

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

Part A: Applied Science and Manufacturing, v. 38, p. 1694-1709, 2007.

SCHLUCK, A.; MAURER, G.; KULA, M.R. Influence of electrostatic interactions on partitioning in aqueous polyethylene glycol/dextran biphasic systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 46, p. 443-451, 1995.

SCHMITT, M. Ingredients, *Food Marketing and Technology*, v. 8, n. 2, p. 14-16, 1994.

SUBRAMANIAM, N.; CARTAXO, M.E.Q.; SUBRAMANIAM, S.; FARIAS, J.L. Study of bromelain present in the pineapple plant of Paraíba. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 30, n.11, p. 373-8, 1976.

SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y.; YANG, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple, v. 35, p. 300-307, 1992.

TAUSSIG, S.J.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 22, n. 2, p. 191-203, 1988.

TORRES, B.B. Elementos de enzimologia. In: *Biotecnologia Industrial. Volume I. Fundamentos*. Cood: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

WALTER, H.; JOHANSSON, G.; BROOKS, D.E. Partitioning in aqueous two-phase systems: recent results. *Analytical Biochemistry*, v. 197, p. 1-18, 1991.

WIELAND, H. *Enzymes in food processing and products*. New Jersey, Noyes Data Corporation, 1972.

YAMADA, F.; TAKAHASHI, N.; MURACHI, T. Purification and characterization of a protease from pineapple fruit, fruit bromelain FA2. *Journal of Biochemistry*, v. 79, n. 6, p. 1223-1234, 1976.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: Reed, G. *Enzymes in food processing*. 2. ed. New York: Academic Press, 1975.

YANG, W.Y.; LIN, C.D.; CHU, I.M.; LEE, C.J. Extraction of cephalosporin c from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, p. 439-445, 1994.

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*, v. 18, n. 4, p. 279-284, 2002.

ZAIA, D. A. M. *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes*. 1998.

ZANCAN, G.T. (Org). *Bioquímica - Aulas Práticas*. 6. Ed. Curitiba: Editora da UFPR, 2005.

Apêndice