

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

**Caracterização e purificação da enzima
bromelina derivada do curauá (*Ananas
erectifolius*) em sistema bifásico aquoso
PEG/fosfato.**

Autor: Kleber Vânio Gomes Barros

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

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

CAMPINAS – SÃO PAULO

XXX/2009

I

UNIDADE BC
Nº CHAMADA
T/UNICAMP/ B278c
V
TOMBO BC/ 85087
PROC 56.139.10
C D P
PREÇO R\$ 53,00
DATA 9-03-10
CÓD T 474580

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

B278c Barros, Kleber Vânio Gomes
Caracterização e purificação da enzima bromelina derivada do curauá (*Ananas erectifolius*) em sistema bifásico aquoso PEG/fosfato / Kleber Vânio Gomes Barros. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Biotecnologia. 2. Extração líquido-líquido. 3. Proteínas - Purificação. 4. Enzimas. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Purification and characterization of enzyme bromelain from curauá (*Ananas erectifolius*) in an aqueous phase system with PEG/phosphate

Palavras-chave em Inglês: Biotechnology, Liquid liquid extraction, Protein purification, Enzymes

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Pérola de Oliveira e Magalhães, Priscila Gava Mazzola

Data da defesa: 30/11/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado , defendida por Kleber Vânio Gomes Barros, em 30 de novembro de 2009 , e aprovada pela banca examinadora:

A
P. 5

Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

Dra Pérola de Oliveira e Magalhães – UNB

Dra Priscila Gava Mazzola – FCM-UNICAMP

026600708

Esta versão corresponde a final da Dissertação de Mestrado ,
defendida por Kleber Vânio Gomes Barros em 30 de novembro de 2009.



Prof Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

Dedico:

Aos meus pais, Luiz Barros da Cruz (in memoriam) e Teresinha Gomes Barros da Cruz, com todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao professor Dr. Elias Basile Tambourgi pela dedicação, incentivo, orientação, paciência, confiança e pela inestimável oportunidade de aprendizagem e crescimento pessoal que me proporcionou durante a execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Flávio Vasconcelos da Silva pela oportunidade, confiança e incentivo sem os quais seria impossível este trabalho.

Ao professor Dr. Isaac Stringueta Machado, da UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, UNESP, que cedeu as plantas para a realização deste estudo.

A toda minha família, em especial meus pais, Luiz Barros da Cruz (*in memorian*) e Teresinha Gomes Barros da Cruz, pelo maravilhoso exemplo de suas vidas, as minhas irmãs, Kelaine, Kilmara e Katiane, pelas palavras de apoio e a Janaína, minha eterna companheira, pelo constante incentivo indispensável ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Processos de Separação; a Dalva Sbruzzi, sem a qual seria impossível a realização deste projeto devido ao seu companheirismo e esforço, a Giovana, José Carlos, Edgar, Mariele, Thayse, Charles e Lara e em especial a minha grande amiga; Juliana Ferreira pela constante ajuda, incentivo, acompanhamento, grande conhecimento e pelas palavras de apoio e dedicação prestada a mim durante todo o projeto.

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, em especial ao grande amigo Ricardo Almeida, pelo incentivo e companheirismo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Obrigado a todos, serei sempre muito grato a vocês!

RESUMO

O curauá (*Ananas erectifolius*) é uma planta fibrosa proveniente da Amazônia brasileira, pertencente à família *Bromeliaceae* e ao gênero *Ananas*. A bromelina é uma protease de origem vegetal, obtida de diversas espécies da família *Bromeliaceae*. A bromelina tem utilização bastante difundida em processos industriais nas áreas alimentícia e farmacêutica. Efeitos antiinflamatórios da enzima, como também, o seu uso no tratamento da angina, na indigestão entre outros, estão documentados na literatura científica. Estudos de métodos para purificação de biomoléculas que viabilizem a sua obtenção em larga escala com custo reduzido são importantes áreas de pesquisa na biotecnologia. A extração líquido-líquido através de sistemas bifásicos aquosos (SBA) pode ser usada como técnica de pré-purificação de bioprodutos. Estes sistemas formam duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si. Podem ser formados a partir da mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal, a exemplo do sistema PEG (polietilenoglicol)/fosfato de potássio. Foi estudada a enzima bromelina derivada das folhas de ambas as variedades: curauá branco e curauá roxo. Pesquisou-se também a recuperação da enzima por extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas PEG/fosfato. Realizou-se ensaios em batelada para a extração e recuperação da enzima, utilizando como indicador o coeficiente de partição. Obteve-se fatores de purificação da enzima bromelina para o sistema fosfato de potássio e polietileno glicol 4000 e 6000, nos pH de 7,0; 8,0 e 9,0 a 25 °C. Estudou-se a partição em três diferentes "tie-lines". Analisou-se a influência do pH e do comprimento das linhas de amarração no coeficiente de partição da enzima. Na purificação da bromelina derivada das folhas do curauá branco, observou-se os melhores resultados no sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato em pH 7,0. Observou-se que o sistema PEG 6000/Fosfato em pH 7,0 apresentou os melhores resultados em relação à purificação da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo.

ABSTRACT

The curauá (*Ananas erectifolius*) is a fibrous plant from Brazilian Amazon, belonging to the *Bromeliaceae* family and *Ananas* genus. Bromelain is a protease from vegetable origin, obtained from several species of this family. The bromelain has widespread use in industries process, such as in food and pharmaceutical areas. Anti-inflammatory effects enzyme and also it uses in angina treatment, indigestion among others are documented in scientific literature. Methods' studies to purification of biomolecules that allow their achievement in large scale with low cost are important research's areas in biotechnology. The liquid-liquid extraction through aqueous two-phase system (ATPS) can be used as technical of pre-purification of bioproduct. These systems form aqueous two-phase immiscible or partially miscible within themselves. They can be obtained by the addition of two polymers or one polymer and a salt, such as the PEG - poly(ethyleneglycol) - and potassium phosphate salt system. In the present report we characterized the bromelain enzyme that comes from the leaves of white curauá and purple curauá, and also investigated the recuperation of the enzyme by liquid-liquid extraction in aqueous two-phases PEG-phosphate systems (ATPS). The assays to extraction and recovery of the enzyme were carried out in batch mode, using the partition coefficient as indicator. Getting to factors purification of the enzyme bromelin to PEG 4000 and 6000 and potassium phosphate salt in ATPS, at pH 7.0, 8.0 and 9.0 at 25 °C. We studied the partition through three different tie-lines. The influences of pH and tie-line length in partition coefficient of enzyme were analyzed. In the purification of bromelain derived from the leaves of white curauá, we observed the best results in PEG 4000/phosphate ATPS at pH 7.0. Furthermore, the system PEG 6000/phosphate at pH 7.0 showed the best results in relation to the purification of the enzyme bromelain derived from the leaves of purple curauá.

SUMÁRIO

1 - Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Introdução	1
1.2 - Objetivos	4
Capítulo 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 – Enzimas	5
2.2 - Curauá: cultivo, mercado e subprodutos	6
2.3 – Bromelina: breve histórico de pesquisas e aplicações	7
2.4 – Desnaturação	11
2.5 - Breve histórico de técnicas utilizadas na separação e purificação de proteínas.....	12
2.6 - Extração líquido-líquido.....	15
2.7 - Extração em duas fases aquosas.....	17
2.7.1 - Aplicação analítica do SBA	20
2.7.2 - SBA e a recuperação de produtos biotecnológicos.....	21
2.7.3 - Outras aplicações do SBA.....	22
2.7.4 - Aplicações do SBA em larga escala.....	23
2.7.5 - Seletividade da extração por SBA.....	26
2.7.6 - Aspectos econômicos do SBA.....	27
2.7.7 - Tipos de sistemas de duas fases aquosas.....	30
2.7.8 - Fosfato de potássio monobásico e dibásico.....	31
2.7.9 – Polietilenoglicol.....	31
2.8 - Diagrama de fases.....	32
2.9 - Partição das proteínas.....	36
2.10 - Coeficiente de partição.....	37
2.11 - Fatores que influenciam o coeficiente de partição.....	38
2.11.1 - Interações entre a proteína e os componentes do sistema.....	38

2.11.2 - Concentração dos componentes do sistema.....	39
2.11.3 - Massa molecular da proteína e do polímero.....	40
2.11.4 - Potencial hidrogeniônico.....	40
2.12 - Tempo de separação das fases.....	41
2.13 - Equação do coeficiente de partição.....	42
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 – Materiais.....	44
3.1.1 – Reagentes.....	44
3.1.2 – Equipamentos.....	45
3.2 – Métodos.....	46
3.2.1 - Preparo das amostras.....	46
3.2.1.1 - Preparação da amostra a partir da folha do curauá, variedades roxa e branca.....	46
3.2.1.2 - Preparo do reativo de biureto.....	47
3.2.1.3 - Preparo da solução padrão de proteína.....	47
3.2.1.4 - Preparo do reagente de Bradford.....	47
3.2.1.5 - Preparo das soluções de fosfato de potássio mono e dibásico.....	48
3.2.1.6 - Preparo das soluções de PEG.....	48
3.2.1.7 - Preparo dos tampões.....	48
3.2.2 - Determinação da temperatura ótima.....	49
3.2.3 - Determinação do pH ótimo.....	50
3.2.4 - Metodologia de obtenção do coeficiente de partição da enzima bromelina derivada do curauá.....	51
3.2.5 - Calibração do espectrofotômetro.....	52
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
4.1 - Determinação do pH ótimo.....	53
4.2 - Obtenção da temperatura ótima.....	55
4.3 - Cinética da reação de hidrólise de BSA por bromelina derivada da folha do curauá variedade branca.....	57

4.4 - Diagrama de fases.....	58
4.5 - Estudo de partição da bromelina derivada do curauá.....	59
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	76
5.1 – Conclusões.....	76
5.2 – Sugestões.....	77
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de um diagrama de fases.....	33
Figura 2 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco.....	53
Figura 3 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo.....	54
Figura 4 - Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco.....	55
Figura 5 - Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo.....	56
Figura 6 - Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelina derivada da folha do curauá branco.....	57
Figura 7 - Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/Fosfato em pH 7,0.....	60
Tabela 2 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/Fosfato em pH 8,0.....	60
Tabela 3 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/Fosfato em pH 9,0.....	61
Tabela 4 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/Fosfato em pH 7,0.....	61
Tabela 5 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/Fosfato em pH 8,0.....	62
Tabela 6 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/Fosfato em pH 9,0.....	62
Tabela 7 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/Fosfato em pH 7,0.....	63
Tabela 8 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/Fosfato em pH 8,0.....	63
Tabela 9 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/Fosfato em pH 9,0.....	64
Tabela 10 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/Fosfato em pH 7,0.....	64
Tabela 11 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/Fosfato em pH 8,0.....	65
Tabela 12 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/Fosfato em pH 9,0.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfico comparativo dos valores de K_{Ativ} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	66
Gráfico 2. Gráfico comparativo dos valores de K_{Prot} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	67
Gráfico 3. Gráfico comparativo dos valores dos fatores de purificação (FP) obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	67
Gráfico 4. Gráfico comparativo dos valores para K_{Ativ} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	68
Gráfico 5. Gráfico comparativo dos valores para K_{Prot} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	68
Gráfico 6. Gráfico comparativo dos valores para os fatores de purificação (FP) obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	69
Gráfico 7. Gráfico comparativo dos valores para K_{ativ} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	69
Gráfico 8. Gráfico comparativo dos valores para K_{prot} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	70

Gráfico 9. Gráfico comparativo dos valores para os fatores de purificação (FP) obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	70
Gráfico 10. Gráfico comparativo dos valores para K_{Ativ} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	71
Gráfico 11. Gráfico comparativo dos valores para K_{Prot} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	71
Gráfico 12. Gráfico comparativo dos valores para os fatores de purificação (FP) obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AE - Atividade enzimática (UI/mL).

BSA - Albumina de Soro Bovina.

SBA – Sistema Bifásico Aquoso.

CL - Concentração de proteína na fase leve no equilíbrio.

CP - Concentração de proteína na fase pesada no equilíbrio.

FL – Fase leve.

FP – Fase pesada.

FP – Fator de purificação.

K – Coeficiente de Partição.

K_{eletro} – Coeficiente de partição sob influência do fator eletroquímico.

K_{hidrofob} - Coeficiente de partição sob influência do fator de afinidade hidrofóbica.

K_{bioesp} - Coeficiente de partição sob influência do fator de afinidade bioespecífica.

K_{tam} - Coeficiente de partição sob influência do tamanho.

K_{conf} - Coeficiente de partição sob influência do fator de conformação.

K_0 - Valor inicial do coeficiente de partição.

K_m - Constante de Michaelis–Menten.

MM – Massa Molar (g/mol).

PEG – Polietilenoglicol.

PI - Ponto isoelétrico.

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

t – Tempo (min).

T – Temperatura.

V_0 – Velocidade inicial de reação (micromol de BSA/mL.min).

V – Volume (L).

V_{max} - Velocidade máxima da reação (micromol de BSA/mL.min).

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Introdução

Uma das condições fundamentais para a vida é a capacidade que os organismos vivos apresentam de catalisar reações químicas de forma eficiente e seletiva. Catalisadores são compostos capazes de aumentar a velocidade da reação sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem efetivamente consumidos durante o processo (BORZANI, 2001). Sem a catálise, as reações químicas não poderiam ocorrer em uma escala de tempo conveniente (LEHNINGER, 2007).

As enzimas estão no centro de todos os processos bioquímicos, pois possuem um grande poder catalítico, superior ao apresentado pelos catalisadores sintéticos e inorgânicos. Possuem um elevado grau de especificidade com respeito ao substrato, acelerando reações químicas específicas e atuam em soluções aquosas em condições suaves de temperatura e pH. De modo que as enzimas tem se convertido em ferramentas importantes, não apenas na medicina como também na indústria química, alimentícia e na agricultura (LEHNINGER, 2007).

O curauá (*Ananas erectifolius*) é uma planta fibrosa, pertencente à família *Bromeliaceae* e ao gênero *Ananas*. Encontrada nos estados do Pará, Acre, Mato Grosso, Goiás, Amapá e Amazonas. Há dois tipos distintos de curauá: um de folhas verde-claro, chamado de curauá branco e outro de folhas roxo avermelhadas, conhecido como curauá roxo (LEDO, 1967).

Dentre as proteases de utilização industrial destaca-se a bromelina; conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*. A bromelina é utilizada na indústria farmacêutica, alimentícia e têxtil em diversos processos tais como: a fabricação de queijos, o amaciamento de carnes, o processo de tratamento do couro, a clarificação de cervejas, o tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios

digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, entre outros. (BORRACINI, 2006).

A dosagem de enzimas é feita através da medida de sua atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada à especificidade das enzimas, essa medida é possível, mesmo na presença de outras enzimas (BORZANI, 2001). O pH e a temperatura são fatores que influenciam a ação enzimática. As enzimas possuem grupos químicos ionizáveis (carboxila $-\text{COOH}$; amino $-\text{NH}_2$) nas cadeias laterais de seus aminoácidos. De acordo com o pH do meio, estes grupos podem apresentar carga elétrica positiva, negativa ou neutra.

A conformação das proteínas depende, em parte, de suas cargas elétricas, de modo que há um pH no qual a conformação da enzima será a mais adequada para a obtenção da atividade catalítica (KIELING, 2002), este valor é conhecido como pH ótimo. Em princípio, aumentos de temperatura levam a aumentos de velocidade da reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. Temperaturas mais altas, no entanto, levam à desnaturação da enzima, ou seja, à perda de sua estrutura tridimensional catalítica. A temperatura que provoca desnaturação varia para cada enzima, mas geralmente, encontra-se pouco acima de sua temperatura ótima (BORZANI, 2001).

Biomoléculas podem ser separadas e purificadas através da partição entre duas fases de polímeros imiscíveis. Através com este método as macromoléculas podem ser separadas de acordo com as suas propriedades de superfície. A separação pode ser baseada no tamanho, carga elétrica e características hidrofílicas (ASENJO, 1990).

Sistemas de duas fases aquosas podem ser formados, quando dois polímeros são dissolvidos juntos acima de certas concentrações. A mais importante característica destes sistemas é que ambas as fases são aquosas (de 85 a 99% de água), permitindo a separação de biomoléculas de diversas origens, em um ambiente não desnaturante. Vários pares de polímeros podem ser utilizados para formar o sistema aquoso de duas fases: PEG (polietilenoglicol) e dextrana (ALBERTSSON, 1986); PEG e hidroxipropil amido (TJERNELD *et al.*, 1986). Muitos polímeros formam sistemas de duas fases aquosas combinados com sais apropriados; tais como fosfato e sulfato de potássio

(ALBERTSSON, 1986). Devido ao seu baixo custo, sistemas de PEG/sal têm sido utilizados na extração de enzimas (KULA *et al.*, 1982).

O processo de separação depende de muitos fatores, como o tipo de polímero utilizado, seu peso molecular, a composição iônica e características da substância a ser extraída: tamanho, carga, propriedades hidrofóbicas na sua superfície, entre outras (ASENJO, 1990).

Utilizou-se como matéria-prima neste trabalho, o extrato proveniente das folhas de curauá, variedades branca e roxa, para extração e purificação da bromelina.

1.2 – Objetivos

Geral:

- Purificar a enzima bromelina derivada das folhas do curauá (roxo e branco) através de sistema bifásico aquoso PEG/Fosfato.

Específicos:

- Determinar pH e temperatura ótimos e parâmetros cinéticos da enzima bromelina;

- Testar diferentes condições para extração da bromelina; alterando as seguintes variáveis: valores de pH; massa molar do polímero e concentração entre as fases;

- Determinar o coeficiente de partição por meio de ensaios em batelada em sistemas de duas fases aquosas.

Capítulo 02 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1 – Enzimas.

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).

Os aumentos de velocidades nas reações proporcionados pelas enzimas são da ordem de 10^5 a 10^{17} . As enzimas são também muito específicas, reconhecendo facilmente entre substratos com estruturas muito similares. Entre os substratos e os grupos funcionais das enzimas ocorrem reações químicas variadas. Os grupos funcionais catalíticos das enzimas podem formar ligações covalentes transitórias com um substrato, ativando-o para uma determinada reação, ou então pode transferir transitoriamente um grupo funcional do substrato para a enzima. Na maioria dos casos, estas reações apenas ocorrem no sítio ativo das enzimas. A interação covalente entre enzimas e substratos reduz a energia de ativação (portanto, acelerando a reação), proporcionando uma via alternativa, com menor dispêndio de energia (LEHNINGER, 2007).

2.2. Curauá: cultivo, mercado e subprodutos

O cultivo do curauá teve início no Lago Grande de Curuai, no município de Santarém - PA e vem se expandindo para outras regiões do estado. De cada colheita são retiradas aproximadamente 24 folhas maduras/planta, que pesam em média dois quilos. A comercialização pode ser através da folha madura, fibra, mucilagem e mudas (CORDEIRO, 2008).

Pesquisas demonstraram que a fibra do curauá apresenta excelente qualidade, sendo comparável à fibra de vidro, devido a sua resistência, maciez e peso reduzido (LEÃO *et al.*, 1998; FROLLINI *et al.*, 2000).

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).

Portanto o curauá apresenta-se como uma importante fonte de matéria prima para diversos setores industriais tais como: indústrias têxteis e automobilísticas, indústrias de celulose, farmacêutica, náutica, indústrias de plásticos além da construção civil, ração animal dentre outras (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

Na indústria automobilística vem sendo usado para fabricação de pára-sóis de caminhão (MOTHÉ, 2003).

No ano de 2003, a demanda por fibras de curauá a partir da indústria automobilística e têxtil girava em torno de 500 ton/mês para uma oferta de 8 ton/mês (LAMEIRA, 2003).

Em 2006, o estado do Pará apresentava uma capacidade produtiva em torno de 20 ton/mês para uma demanda de 1000 ton/mês, tornando a cultura do curauá uma das mais promissoras culturas em termos de alternativas em curto prazo. Porém, estando limitado à expansão da cultura, devido à escassez de mudas (LAMEIRA, 2006).

Na área farmacêutica, testes microbiológicos demonstraram que o curauá apresenta propriedade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (FUJIHASHI, 2002).

2.3. Bromelina: breve histórico de pesquisas e aplicações.

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica.

A bromelina é uma enzima sulfídrica e como característica das enzimas pertencentes a esse grupo, requer grupamentos sulfídricos livres para sua atividade catalítica (BALDINI *et al.*, 1993). 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.

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

A bromelina foi reconhecida como agente medicinal em 1957 e, desde então, mais de 200 documentos integraram a literatura medicinal. Pesquisas laboratoriais demonstraram que animais tratados somente com bromelinas reagem da mesma forma, em se tratando de inibição de edemas e inflamação, que os tratados com antibióticos, mas que, quando ministrados em conjunto (bromelinas e antibióticos) a resposta era melhor (NEUBAUER, 1961)

Demonstrou-se que em condições iguais de dosagem, as bromelinas são superiores aos outros agentes antiinflamatórios, tais como a papaína, proteases de fungos, tripsina, etc (MARTIN *et al.*, 1962).

A bromelina pode modificar a permeabilidade de órgãos e tecidos a diferentes drogas. A bromelina prolongou o tempo de sono em camundongos que receberam administração de pentobarbital e aumentaram os níveis de penicilina e gentamicina em ratos (MOSS, 1963).

Comprovou-se que a bromelina, além de ser um ótimo anti-inflamatório, apresenta ainda as qualidades de ser fácil de administrar, barato, abundante e de fácil obtenção (SELTZER, 1964).

Ao diminuir o edema há, conseqüentemente, uma diminuição da dor, devido a menor compressão das terminações nervosas, mas a bromelina age, ainda, antagonizando a capacidade da bradicinina em provocar a dor (BODI, 1966).

A primeira evidência conclusiva de que a bromelina previne a agregação sanguínea foi reportada em 1972. A bromelina foi administrada por via oral a 20 voluntários com histórico de ataque cardíaco ou com altos níveis de agregação plaquetária. A bromelina reduziu a agregação plaquetária em 17 dos voluntários e normalizou os valores em 8 dos 9 que previamente apresentavam altos níveis de agregação plaquetária (HEINICKE, 1972).

Em 1972 foi reportado o uso de bromelina em pacientes com câncer. A administração diária de 600mg de bromelina em mulheres portadoras de câncer de mama e ovário demonstrou redução de metástases nas pacientes (GERARD, 1972).

Doses de bromelina superiores a 1000mg diárias foram combinadas com agentes quimioterápicos tais como vincristina resultando em regressão tumoral (GERARD, 1972; NIEPER, 1974).

A atividade fibrinolítica da bromelina foi atribuída ao aumento da conversão do plasminogênio em plasmina, o qual limita o processo de coagulação (DE-GIULLE, 1978).

A administração concomitante de bromelina ocasionou níveis mais elevados no sangue e em tecidos para tetraciclina e amoxicilina (TINOZZI, 1978).

Estudos “in vitro” demonstraram que a bromelina inibe a agregação plaquetária estimulada por epinefrina, como também por precursores de prostaglandinas (MORITA, 1979).

A bromelina também foi analisada quanto as suas propriedades mucolíticas (LIVIO, 1978), digestivas (DE-GIULI, 1978), ação fibrinolítica (TAUSSIG, 1979), como adjuvante na absorção de drogas (MORITA *et al.*, 1979); e sua ação anti-tumoral (JEUNG, 1980).

A bromelina demonstrou ser a mais potente entre nove substâncias antiinflamatórias testadas em edemas induzidos em ratos (UHILG, 1981). A atividade antiinflamatória da bromelina foi comparada a de outras enzimas de origem vegetal - escina e papaína. Investigou-se a atividade reparadora em ratos submetidos a intervenções cirúrgicas no osso mandibular. Observou-se que os animais tratados com bromelina apresentaram recuperação óssea mais rápida do que aqueles tratados com os demais antiinflamatórios de origem vegetal e do que o grupo controle (ARAUZ, 1982). A prednisona e a bromelina apresentaram resultados comparáveis em relação as suas atividades antiinflamatórias em ratos (VELLINI, 1986). Em humanos, a administração de bromelina propiciou o aumento dos níveis de antibióticos no sangue e urina (TAUSSIG, 1988). Estudou-se ainda a sua atuação de modulação sobre citocininas e sobre o sistema imune (WHITE, 1988). A bromelina foi avaliada quanto a sua ação antiinflamatória (HARRACH *et al.*, 1995).

Apesar de todos os seus mecanismos de ação ainda não estarem totalmente esclarecidos, foi demonstrado que é um seguro e efetivo suplemento. A bromelina parece ter tanto ação direta quanto indireta, envolvendo outros sistemas enzimáticos, ao exercer seus efeitos antiinflamatórios (MATTOS, 2005).

A bromelina é também usada em forma de solução para preparação de suspensão de hemácias a ser utilizada na tipagem sanguínea.

Em relação à bromelina derivada do abacaxi (*Ananas comosus*), verificou-se que a enzima do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos. A atividade proteolítica da bromelina derivada do fruto mostrou-se máxima em pH 8,0 e a temperatura de 70°C, enquanto que a bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0 (ROWAN et. al., 1990).

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

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. 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.

A extração da bromelina utilizando sistema bifásico formados por PEG/sal (fosfato de potássio) foi realizada apresentando resultados favoráveis e promissores (Cesar, 2000).

Na indústria alimentícia o uso de proteases na quebra do material fibroso de carnes promovendo o amaciamento já está bem estabelecido. O tratamento da carne é realizado pela injeção de enzimas proteolíticas nas carcaças de animais. Foi desenvolvido um processo no qual a enzima é injetada antes da morte do animal, tendo a vantagem de circular por todo sistema vascular uniformemente (FREIMAN, 2001).

Na fabricação de pães e biscoitos a adição de proteases na farinha de trigo, tem mostrando-se bastante eficiente. Essas enzimas proteolíticas tornam a massa mais maleável, e ainda retém gás, o que facilita o processo de panificação. Viabilizam ainda a fabricação de biscoitos.

Enzimas proteolíticas, quando adicionadas na fase final do processo de fabricação de cervejas, hidrolisam certos complexos proteínas/taninos formados durante a fermentação. Precipitados presentes na cerveja, tornam-se insolúveis e formam turvações quando submetida a refrigeração (FREIMAN, 2001).

A bromelina derivada do abacaxi também tem aplicação no tratamento de couros, nas indústrias têxteis para o amaciamento de fibras e na produção de detergentes (SANTOS, 1995).

Nas indústrias farmacêuticas as enzimas proteolíticas são aplicadas em formulações tópicas com a finalidade de reduzir a espessura da camada córnea da pele, por hidrolisar em pontos específicos, a queratina cutânea. É um peeling mais suave e seguro, comparado ao tradicional peeling químico e mais eficaz que os métodos físicos comumente usados em formulações cosméticas (RACINE, 2004).

O principal foco industrial da produção de bromelina é a indústria farmacêutica, um dos setores que mais investe em tecnologias e novos produtos. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Farmacêutica – ABIFARMA - a previsão de investimentos no período de 1997 – 2000 foi de US\$ 1.300 milhões.

2.4 Desnaturação.

A alteração da estrutura tridimensional de uma enzima pode ocasionar a perda de sua atividade funcional, fenômeno denominado de desnaturação. A maioria das proteínas sofre desnaturação mediante o calor, a qual afeta suas frágeis interações moleculares, principalmente as pontes de hidrogênio, alterando suas conformações. Com o aumento lento da temperatura, a conformação das proteínas permanece geralmente intacta, até que, de forma abrupta, ocorra a perda de sua estrutura original e conseqüentemente de sua atividade, dentro de uma estreita margem de temperatura (LEHNINGER, 2007).

Em condições apropriadas, um aumento modesto na temperatura resulta em desdobraimento da estrutura natural da enzima e perda de sua estrutura secundária e

terciária. Em condições fisiológicas, a maior parte de proteína é estável em temperaturas até 50°C a 60°C (HORTON, 2002).

A desnaturação de proteínas não ocorre apenas pela ação do calor, mas também em faixas extremas de pH, na presença de certos solventes orgânicos miscíveis em água como álcool e acetona, na presença de alguns solutos como uréia ou cloreto de guanidina ou de detergentes.

Os solventes orgânicos, a uréia e os detergentes atuam principalmente rompendo as interações hidrofóbicas que formam o núcleo estável das proteínas globulares. As faixas extremas de pH alteram a carga da proteína, dando lugar a aparição de repulsões eletrostáticas e a destruição de algumas ligações de hidrogênio (LEHNINGER, 2007).

2.5. Breve histórico de técnicas utilizadas na separação e purificação de proteínas.

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

Muitas técnicas, sejam cromatográficas e não cromatográficas, 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, porém baixa capacidade de purificação. Enquanto que 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 as biomoléculas.

Técnicas como ultrafiltração, combinada com diafiltração, 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 adenosina obtida pela fermentação do *Bacillus strain*, foi purificada por coluna cromatográfica. O sobrenadante do caldo de fermentação foi ajustado a pH 4,0. Logo após passado através de uma coluna de carbono ativado para a adsorção da adenosina. A coluna foi lavada com a água e então a adenosina foi eluída com metanol/isooctanol/amônia/água (50:1:2:47). A solução foi concentrada e então separada por cromatografia de resina de troca iônica e adquiriu-se uma fração de adenosina pura (KOMATSU, 1973).

A técnica foi utilizada no processo de recuperação de proteína com alta pureza derivada do soro do leite de queijo (JONES, 1976; PALMER, 1977).

As resinas de troca iônica foram usadas na separação de materiais protéicos em faixas determinadas de pH. A proteína foi adsorvida nas resinas em pH 4.5. Depois da adsorção da mistura de proteínas, as frações de proteínas individuais, foram retiradas da coluna pelo aumento controlado do pH do eluente (SASAKI, 1979).

A técnica de cromatografia de afinidade foi utilizada para a purificação em larga escala de antitrombina III a partir de plasma humano (WICKERHAUSER, 1979).

A cromatografia de troca iônica foi utilizada para purificar a gliadina da farinha de trigo (CHARBONNIER, 1980), além de proteínas da soja e do amendoim (SATYANARAYANA *et al.*, 1981).

Lewis (1982) utilizou a ultrafiltração para promover a separação de três proteínas de peso moleculares diferentes, presentes em igual concentração numa mistura.

Kato *et al.*, (1982) examinaram o efeito da variação no gradiente do eluente, comprimento de coluna e quantidade de amostra, na retenção e purificação da ovoalbumina comercial.

Marshall (1982) usou uma adaptação da cromatografia em coluna para a separação em escala industrial de um tipo específico de glucoamilase utilizado na produção de bebidas alcoólicas. O procedimento proposto por ele permitiu a purificação de α -amilase, α -glucosidase, glucoamilase e um tipo especial de enzima glucoamilase, com alta capacidade de degradar polissacarídeo.

As enzimas malato desidrogenase e 3-hidroxi-butirato desidrogenase foram purificados a partir de extratos de *Rhodopseudomonas spheroides* usando-se colunas de cromatografia de afinidade (SCAWEN, 1982).

Outra vantagem da recuperação da proteína do soro do leite através de cromatografia de troca iônica é o aumento da estabilidade térmica do leite (KELLY, 1982). Diversas proteínas foram purificadas através da cromatografia de troca iônica de alta performance (REGNIER, 1983).

A cromatografia de troca iônica obteve sucesso na purificação da globulina derivada de ervilha (GUEGUEN *et al.*, 1984). Fisher *et al.*, em 1984 desenvolveram um procedimento que combinava a eluição da adenosina kinase a partir de uma coluna de filtração em gel e posterior adsorção da enzima através de cromatografia de afinidade.

Várias β -lactamases foram purificadas através da cromatografia de afinidade (CARTWRIGHT, 1984). A purificação cromatográfica de proteínas recombinantes foi realizada com efeito mínimo na sua estrutura terciária e nenhum efeito em sua atividade biológica (SASSENFELD, 1984).

Diversas pesquisas demonstraram a purificação em larga escala de várias enzimas. Por exemplo, α -amilase recuperada a partir de *Aspergillus awamori* (BHELLA, 1985) ou L-leucina desidrogenase do *Bacillus cereus* (SCHUETTE *et al.*, 1985), ambas através da troca iônica.

McGregor (1986) examinou uma larga variedade de membranas para a ultrafiltração de proteínas a partir de uma mistura complexa. Kelley *et al.*, (1986) examinaram o uso do cromatografia em gel para a purificação industrial de proteínas.

A purificação com até 99% de pureza de proteínas derivadas do plasma seminal de touro foi demonstrada pela cromatografia de afinidade (COMTE, 1986).

A técnica também se mostrou compatível com a extração e recuperação da caseína (NG-KWAI-HANG, 1989).

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).

2.6 Extração líquido-líquido.

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 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.*, 1985).

A extração líquido-líquido é utilizada na indústria de antibióticos há várias décadas. 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. Atualmente há várias linhas de estudo destacando a sua utilização como um passo de separação potencialmente útil em recuperação de proteína e

separação. Em particular pela facilidade do aumento de escala e pela possibilidade de funcionamento em modo contínuo. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases e a miscibilidade parcial dos líquidos (RABELO, 1999).

Os fatores físico-químicos das proteínas que determinam a sua partição durante o processo começam a se melhor entendidos. O processo ainda oferece alta capacidade produtiva e boa seletividade quanto à proteína a ser purificada. Contudo, a baixa solubilidade das grandes moléculas de proteína em solventes orgânicos típicos e a necessidade de garantir meio inerte, restringe a variedade de solventes disponíveis para o uso em tal processo de separação (GRANDISON, 1996).

Duas classes de sistemas que oferecerem vantagens na separação e recuperação de proteínas. São eles o sistema bifásico aquoso polímero/sal (em alguns casos também polímero/polímero) e sistemas de micelas.

Em ambos os casos, duas fases são formadas e a separação ocorre pela diferença na partição da proteína entre as mesmas. Nos sistemas de separação de polímero/sal aquosos a divisão em compartimentos da proteína ocorre entre duas fases aquosas imiscíveis; um rico em um polímero (normalmente polietilenoglicol) e outro em um sal (por exemplo fosfato ou sulfato). Esses sistemas mostram-se como um ambiente não desnaturante, com pequena resistência interfacial a transferência de massa e alta seletividade (GRANDISON, 1996).

As micelas reversas, micro-emulsões óleo em água, são constituídas de agregados de moléculas surfactantes. Constituem-se de um núcleo polar e uma camada interna formada pela porção hidrofílica do surfactante. O processo de extração líquido-líquido através de micelas reversas pode ser realizado em uma ou duas etapas. O procedimento formado por um único estágio consiste simplesmente da etapa de extração, onde os contaminantes são transferidos de uma solução aquosa para a fase orgânica micelar, levando à purificação das biomoléculas alvo. O processo em duas fases, por sua vez é composto por uma etapa pré-liminar de extração e uma etapa posterior na qual as biomoléculas são liberadas das micelas reversas e recuperadas em uma nova fase aquosa (MAZZOLA *et al.*, 2008).

2.7 Extração em duas fases aquosas.

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 g/cm³) (HUSTEDT, 1985), de suas viscosidades e também devido ao tempo de coalescimento entre as pequenas gotículas, formadas durante o processo de mistura (WALTER, 1985).

Ambos os sistemas bifásicos aquosos (polímero-polímero, sal-polímero), apresentam vantagens em relação à extração convencional que usa solventes orgânicos. Desde o fato de que ambas as fases compõem-se de água, proporcionando assim um ambiente ameno para biomoléculas. A tensão interfacial é extremamente baixa, entre 0.0001 e 0.1 dine/cm comparadas com 1 - 20 dine/cm apresentados pelos sistemas solventes orgânicos de água, criando uma alta área de contato interfacial das fases dispersadas e assim uma transferência de massa eficiente. Além disso, sabe-se que polímeros ajudam a estabilizar e manter as atividades de biomoléculas (ALBERTSSON, 1986).

O método também não apresenta algumas das desvantagens típicas da centrifugação e da filtração que surgem devido à alta viscosidade e a distribuição heterogênea do tamanho das partículas. Além disso, se adequadamente implementado o SBA pode fornecer a integração entre os processos de clarificação, de concentração e de purificação parcial da biomolécula em estudo. Influenciando diretamente a redução

do número de passos do *downstream processing*, ocasionando a melhoria dos rendimentos e reduzindo o preço final do processo de recuperação.

Desta forma, o sistema permite que uma terceira substância introduzida no sistema fosse coletada, preferencialmente, numa das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos. Devido a esta particularidade os sistemas de duas fases aquosas são empregados no isolamento e purificação de biomoléculas de importância comercial, tais como, proteínas, vírus, fragmentos de membranas e organelas celulares (ALBERTSSON, 1986).

Partição em sistema bifásico aquoso (SBA) pode ser usada para a separação de proteínas a partir de fragmentos celulares bem como para a sua purificação a partir de outras proteínas. A separação pode ocorrer em um passo único ou como um processo composto por vários estágios. Grandes diferenças entre os coeficientes de partição em um mistura de proteínas, podem fazer com que um único passo seja suficiente para a extração (GRANDISON, 1996).

Algumas características importantes para sistemas aplicados a purificação de biomoléculas podem ser citadas: 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 (PORTO, 1998).

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. A partição em um sistema bifásico aquoso é a distribuição seletiva de substâncias entre as duas fases. Geralmente, moléculas menores apresentam distribuição mais uniforme entre as fases; a partição de macromoléculas, entretanto é extremamente variável, podendo direcionar-se praticamente a apenas uma das fases. Esta distribuição é governada por um grande número de parâmetros que se relacionam com as propriedades do sistema de fase e a substância, bem como as interações entre os dois (ALBERTSSON, 1986). Este grande elenco de influencias torna

a previsão do comportamento da partição em sistemas bifásicos aquosos, em particular referentes a grandes moléculas, uma tarefa difícil.

Na área da biotecnologia a escolha de meios adequados para a extração é um fator importante para a manutenção da atividade das biomoléculas. 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. Assim nos processos biotecnológicos, existe um número muito limitado de solventes adequados a serem usados. 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).

Os sistemas bifásicos aquosos tem se tornado um instrumento poderoso de separação e purificação de uma grande variedade de biomoléculas, inclusive de células derivadas de plantas e animais, microrganismos, fungos e os seus esporos, vírus, cloroplastos, mitocôndrias, proteína e ácidos nucléicos. Os sistemas de duas fases aquosas formados por PEG/dextrana e PEG/sal têm sido, nos últimos anos, os mais freqüentemente estudados e utilizados para purificação de um grande número de biomoléculas (DIAMOND *et al.*, 1992).

O SBA mostra-se ainda como uma promessa para a isolamento rápido do DNA. Utilizando-se novos sistemas aquosos bifásicos PEG/sal contendo agentes caotrópicos e detergentes, obteve-se a partição de ácidos nucléicos com altos rendimentos na fase salina, ao passo que as demais proteínas e os materiais celulares são concentrados em outra fase ou precipitam-se na interface (COLE, 1991).

Os sistemas bifásicos aquosos também apresentam potencialidade quanto à extração de bioprodutos com baixo peso molecular tais como aminoácidos. Em um sistema de duas fases excepcional obtido em altas temperaturas que usam PEG e cloreto de sódio, os aminoácidos são eficientemente extraídos na fase polimérica (SIKDAR, 1991). O produto é então recuperado em uma solução límpida precipitando o PEG através de resfriamento.

Além de enzimas intracelulares derivadas de células microbianas, proteínas de matérias-primas mais complexas tais como; tecido animais e mucilagens vegetais (JORDAN, 1991), foram convenientemente purificados pela extração em SBA.

O isolamento de proteína através de SBA é projetado para ajustar-se ao sistema em estudo. Dois passos de extração são comumente utilizados. No primeiro passo, o material celular, os ácidos nucléicos, os polissacarídeos e as proteínas contaminantes são coletados na fase mais densa e inferior do sistema, ao passo que a partição da proteína de interesse ocorre na fase superior. Um segundo passo de extração pode ser aplicado para transferir a proteína de interesse para uma nova fase inferior. O procedimento de extração em duas etapas pode ser conduzido de modo contínuo e automatizado. A proteína pode ser alternativamente recuperada diretamente da fase rica em PEG por ultrafiltração (VEIDE, 1989) ou a fase pode ser conectada diretamente a um processo cromatográfico (FREJ, 1986).

2.7.1 Aplicação analítica do SBA.

A sensibilidade da partição por sistemas bifásicos aquosos às propriedades superficiais e conformacionais, seja de material solúvel ou particulado, tornou a técnica um instrumento analítico muito útil em várias áreas de aplicações. Além da sensibilidade e rapidez, o método ainda permite análises em macromoléculas e estruturas celulares.

Uma das aplicações mais importantes do SBA é a sua capacidade de fracionar células em frações, investigar suas cargas e propriedades hidrofóbicas de superfície e traçar alterações ocorridas na superfície celular em consequência de processos *in vivo*, tais como; diferenciação, maturação e envelhecimento celular, bem como derivadas de tratamentos *in vitro* (WALTER, 1985; WALTER, 1994). As informações obtidas através do SBA mostraram-se inestimáveis para a pesquisa em bioquímica e biomedicina.

A partição em SBA em condições variáveis de pH e tipos de sais utilizados foi útil na estimativa das cargas superficiais e dos pontos isoelétricos das proteínas em estudo.

A determinação da hidrofobicidade e modificações conformacionais sofridas pelas proteínas foram possíveis utilizando-se SBA na presença respectivamente, de ligantes hidrofóbicos e ligantes de afinidade (WALTER, 1994).

A partição entre fases foi usada para descobrir e quantificar interações biomoleculares, com base na alteração da partição das substâncias em análise, causada pelo aumento ou diminuição das interações (WALTER, 1985). A modificação na partição de um dos compostos como uma função da concentração crescente do outro pode ser usada para o cálculo de constantes de dissociação. Este conceito foi explorado por Mattiasson *et al.*, (1983) para desenvolver um imuno ensaio com SBA, conhecido como “ensaio de partição com ligantes de afinidade”, destinado à quantificação rápida de antígenos.

Em comparação com os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e o radioimunoensaio (RIA), a separação do antígeno livre ou ligado ocorre através da partição em fases diferentes. Se necessário, pode-se realizar a modificação química com um grupo apropriado para propiciar a partição de um dos componentes na fase desejada (LING, 1983).

2.7.2 SBA e a recuperação de produtos biotecnológicos.

Tradicionalmente a purificação de proteína é executada em etapas distintas que implicam na clarificação, por técnicas de separação sólido-líquido, na concentração em pequenos volumes, seguida por fim, pelo fracionamento através de técnicas cromatográficas de alta resolução. Um dos principais problemas apresentados é que este elevado número de etapas acaba por resultar numa maior perda do produto.

O sistema bifásico aquoso mostra-se como um método relativamente simples do ponto de vista técnico, apresenta facilidade no aumento de escala, mostra-se energeticamente eficiente e ainda propício à recuperação de produtos biotecnológicos.

A grande maioria dos produtos biotecnológicos, moléculas solúveis e particulados são obtidos a partir de soluções muito diluídas. De modo que geralmente o

primeiro passo a ser seguido para a sua recuperação é a concentração. Em condições adequadas o SBA é capaz de executar tal concentração, de modo que a maior parte da substância desejada seja transferida a uma determinada fase que apresente um pequeno volume em comparação com a solução original (ALBERTSSON, 1986).

Diferentes procedimentos são utilizados para recuperação do PEG tais como; desproteíntização, dessalinização por ultrafiltração e extração do PEG com solvente orgânico seguido de evaporação.

As partículas também podem ser concentradas na interface. Um processo com uma única etapa ou composto por múltiplos passos, pode ser aplicado dependendo da partição do produto e dos contaminantes existentes. A partição em SBA é bastante utilizada na concentração e purificação de vírus. O aumento do uso da técnica pode ser previsto para a preparação de diferentes tipos celulares com grande diversidade de aplicações.

O uso crescente da tecnologia de DNA recombinante na produção de proteína tem aumentado o foco sobre o *downstream processing* e suas operações de recuperação de biomoléculas.

2.7.3 Outras aplicações do SBA.

As aplicações do 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.

2.7.4 Aplicações do SBA em larga escala.

Muitas das técnicas usuais de separação apresentam dificuldades quando há necessidade de ser implementado o aumento da escala laboratorial para uma produção industrial. A extração em BSA em muitos casos mostra-se como a melhor alternativa nas primeiras etapas de separação de proteínas em larga escala.

Algumas das vantagens do processamento em larga escala do SBA 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).

Em processos de purificação em larga escala, múltiplas etapas podem ser demandadas até a obtenção do produto na especificação desejada. 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). Aumento dos custos de produção inviabilizando muitas vezes, a aplicação industrial de determinados processos de purificação enzimática.

A aplicação de SBA que atraiu a maior parte de interesse na biotecnologia é o seu uso como uma operação primária de separação e recuperação de proteínas a partir de uma matriz. Atualmente o método é empregado em escala no processo de recuperação protéica por algumas indústrias.

A partição de proteínas em larga escala através de sistemas bifásicos tem sido demonstrada, nos últimos anos, através da utilização de centrífugas e extratores (DIAMOND, 1992; WALTER *et al*, 1991).

A facilidade em se obter o *scale up* pode ser demonstrada pela independência do coeficiente de partição com relação ao volume dos sistemas. A literatura menciona aumentos de escala com ótimos resultados. No entanto, faz-se necessária a adequada caracterização do sistema bifásico para a partição de uma determinada proteína e a correlação deste com o coeficiente de partição da biomolécula (DIAMOND, 1992).

A facilidade de execução do SBA em qualquer escala técnica deve-se principalmente a rapidez com que ocorre o equilíbrio das fases permitindo um coeficiente de partição constante devido à baixa tensão interfacial destes sistemas, a simplicidade das unidades de operação e a disponibilidade comercial dos equipamentos necessários (CABRAL, 1993).

Para obter-se as condições ideais é fundamental otimizar o rendimento e a partição *versus* o restante dos componentes da mistura, isto é, tornar máximo o fator de purificação.

A grande vantagem é que os componentes que podem prejudicar os passos de purificação são removidos sem a necessidade da utilização de centrifugações e filtrações por membranas. A partição espontânea de proteínas reside no fato de que o material contaminante é facilmente removido em um só passo. Sob condições favoráveis, é possível atingir-se um elevado fator de purificação no primeiro passo de extração (MATIASSEN, 1987).

A purificação em um único passo da proteína taumatina com PEG 6000/ fosfato na presença de NaCl, a partir de extrato bruto livre de fragmentos de células, propiciou valores de rendimento e fator de purificação de 90-95% e 20, respectivamente (CASCONE *et al.*, 1991).

Estudos comparativos entre os processos de purificação em larga escala utilizando os sistemas de duas fases aquosas e um processo convencional constituído essencialmente por precipitação seguida por dois passos cromatográficos mostraram que o método de extração líquido-líquido apresentou melhores resultados (KRONER *et al.*, 1992).

De modo geral, algumas vantagens da aplicação do SBA em processos de separação e recuperação de biomoléculas em larga escala podem ser elencadas (ALBERTSSON, 1986; WALTER *et al.*, 1991):

- Facilidade no aumento de escala;
- Rápida transferência de massa;
- Equilíbrio alcançado com recurso a baixas energias na forma de mistura mecânica;
- Possibilidade de operação em sistema contínuo e possibilidade de operação em temperatura ambiente sendo mais econômico que outros processos de separação.

Contudo, apesar de suas vantagens técnicas, as aplicações ainda são limitadas devido ao fato dos mecanismos que determinam a partição não serem completamente compreendidos. O que torna o desenvolvimento metodológico e sua adaptação a cada processo, uma tarefa empírica. São estudados pontos críticos, como o tipo de seletividade necessária durante a extração de determinada proteína, o preço dos componentes que formarão o sistema bifásico e o tratamento das águas residuais. Esses tópicos formam o foco principal do desenvolvimento da tecnologia dos sistemas bifásicos aquosos.

2.7.5 Seletividade da extração por SBA.

Um dos focos de estudos sobre o SBA é tentativa de aumentar a sua seletividade da partição de proteínas a fim de tornar a extração mais previsível. Também se deseja atingir altos níveis de purificação de modo que passos subseqüentes do *downstream processing* sejam descartados, ou pelo menos que sejam reduzidos no número de etapas.

Uma abordagem estudada durante um longo tempo foi a incorporação de ligantes de afinidade, capazes de se interagirem especifica e reversivelmente com a proteína de objetivo, em uma das fases do sistema.

Normalmente este tipo de incorporação implica a ligação covalente do agente ligante com o polímero do sistema. Assim, para aplicações em larga escala, é fundamental a reciclagem eficiente dos agentes ligantes. O tamanho e as propriedades do polímero ao qual os agentes ligantes unem-se podem ser variados, modificando conseqüentemente o comportamento da partição. A interação dos agentes ligantes com polímeros de alto peso molecular geralmente cria um sistema mais previsível em comparação quando a ligação ocorre com um polímero solúvel com baixo peso molecular. O emprego de componentes que permitam uma partição adequada do agente ligante também foi objeto de estudo (SIKDAR, 1991).

O uso de agentes ligantes e componentes mais baratos torna a extração economicamente viável e produz um produto substancialmente mais valorizado (KULA, 1990). Outra abordagem estuda o aumento da seletividade da extração de proteínas geneticamente modificadas acrescentando determinados aminoácidos, visando direcionar a partição numa fase predeterminada (ENFORS, 1990).

2.7.6 Aspectos econômicos do SBA.

O grau de pureza exigido para uma proteína depende diretamente da utilização da mesma. Proteínas destinadas à terapêutica ou uso direto em humanos requerem alto grau de pureza e geralmente demandam maior custo de produção. Exigência que geralmente não se aplica aquelas proteínas destinadas a operações industriais e unitárias.

O custo dos compostos químicos é fator predominante na recuperação em larga escala de proteínas a partir de matriz celular. Deste modo a utilização de componentes de custo reduzido e sua posterior reciclagem são consideradas essenciais para viabilidade do processo. Isto tem favorecido a escolha de sistemas de PEG/sal no uso industrial. Estes sistemas também apresentam a vantagem que as fases têm uma viscosidade mais baixa, tornando a separação de fase mais rápida.

Uma análise econômica da recuperação e purificação da enzima desidrogenase a partir de *Candida biondii* demonstrou que o uso de sistemas bifásicos aquosos possui vantagens econômicas quando comparado a outros métodos. O tempo de operação reduzido, que influencia diretamente nos custos de energia, constitui o maior fator do baixo custo operacional da partição com sistemas bifásicos aquosos (CABRAL, 1993).

A possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao se efetuar o *scale up*, pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com a escala de produção (KRONER *et al.*, 1992).

A reciclagem de PEG pode ser facilmente integrada ao processo, chegando a níveis de recuperação em torno de 90 a 95% (HUSTEDT *et al.*, 1988).

As técnicas de recuperação de PEG mais usadas são a ultrafiltração e a extração com solvente orgânico seguida de evaporação (COIMBRA, 1995).

O descarte de sais é geralmente mais problemático. Em sistemas contendo células, ácido nucléico, proteínas solúveis e insolúveis, a separação de sais da fase primária por técnicas de separação mecânica, tais como a centrifugação ou ultrafiltração é muito difícil de ser conduzida eficientemente. A eletrodialise é

considerada um método geral para reciclagem de sais e para dessalinização da fase rica em PEG (HUSTEDT *et al.*, 1988).

Sais também podem ser recuperados usando uma mistura álcool alifático/sal/água. Especificamente para separação de fosfato de potássio, um resfriamento abaixo de 6°C provoca a precipitação do sal, possibilitando a sua reutilização (PAPAMICHAEL *et al.*, 1992; COIMBRA, 1995).

Greve *et. al.*, (1991) recentemente estudaram maneiras de reciclar a fase fosfato desses sistemas para minimizar a poluição ambiental. A reciclagem de fase fosfato foi obtida pela sua separação através do uso de álcoois. O PEG da fase do topo rica em PEG pode também ser reciclado.

Os sais, como fosfatos ou sulfato, também devem ser reciclados, auxiliando desta maneira no tratamento dos resíduos de esgoto. A reciclagem dos sais mostrou-se possível; no entanto, não resultou em economia quando comparados aqueles em que não ocorre a reciclagem salina (Greve, 1991). Isto motivou o uso de sais que são facilmente degradados durante o tratamento de esgoto, como por exemplo; citratos (VERNAU, 1990) ou sais voláteis, tais como o carbamato de amônio (VAN BERLO, 1998).

Novos sistemas formados por PEG/FeSO₄ e PEG/Na₂SO₄ apresentam 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).

Muitos estudos foram realizados visando substituir a dextrana por outros polímeros mais baratos como amidos, maltodextrinas e polissacarídeos naturais como o pululan. Tem-se recorrido também ao hidroxipropilamido, composto similar a dextrana, porém mais econômico. As substituições reduzem o custo do processo de purificação por sistemas bifásicos aquosos (HUSTEDT, 1985; SIKDAR, 1991; NGUYEN, 1988).

O sistema PEG/dextrana possui características importantes como a biodegradabilidade, além de reunir uma elevada gama de informações sobre a partição de vários compostos ao longo dos anos. O uso prático da dextrana apenas seria

justificado em casos raros, como na produção de produtos especiais (MATIASSON, 1987).

A técnica de extração por SBA mostrou-se competitiva com outras técnicas como a centrifugação, filtração com tambor e filtração com membranas. Apesar do elevado consumo de reagentes, cerca de 53% do custo total, os custos foram compensados pelo baixo custo observado para o consumo energético e para o investimento em equipamento (KRONER *et al.*, 1992).

O PEG, no entanto apresenta baixo custo e forma sistema bifásico aquoso com outros polímeros neutros e com sais. Nos últimos anos, o uso de polímeros com capacidade de uma pronta recuperação modificando-se apenas alguma das condições do meio, como temperatura ou pH é uma área da pesquisa intensa (PATRICKIOS, 1992).

O custo operacional está intimamente ligado ao tipo e concentração dos polímeros necessários para a formação das fases do sistema e sua capacidade.

Realizou-se uma análise econômica comparativa entre dois processos de purificação; um utilizando os sistemas de duas fases aquosas e outro constituído essencialmente por precipitação seguida por dois passos cromatográficos. O estudo 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 (KRONER *et al.*, 1992).

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).

O SBA é um método simples e eficaz de separação de biomoléculas. Porém sua utilização é limitada pela complexidade de prever a partição de bioprodutos. Os aspectos de engenharia da extração por SBA não apresentam nenhum obstáculo e o método é bem adaptado para o uso com os equipamentos comercialmente disponíveis.

2.7.7 Tipos de sistemas de duas fases aquosas.

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

1- Dois polímeros não iônicos.

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

2- Um polieletrólito e um polímero não iônico.

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

3- Dois polieletrólitos.

Exemplos: sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio, carbometildextrana de sódio/carboximetil celulose de sódio;

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

Exemplos: 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, entre outros.

2.7.8 Fosfato de potássio monobásico e dibásico.

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 fosfatos são sais inorgânicos utilizados em sistemas bifásicos aquoso do tipo polímero/sal e, portanto, formam duas fases na presença do polímero.

Apresentam vantagem em relação à dextrana devido ao um menor custo e maior facilidade de utilização industrial (FORCINITI *et al.*, 1991).

2.7.9 Polietilenoglicol.

O polietilenoglicol (PEG), $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, é atualmente o poliéster mais importante do ponto de vista comercial. Sintético e neutro, apresenta cadeia linear ou ramificada, disponível numa grande variedade de pesos moleculares, 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.

Para pesos moleculares acima de 20000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas se possuírem pesos moleculares 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).

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 sangüíneos.

O PEG forma uma camada protetora e segura, para ser empregada em aparelhos de diagnósticos, substituição de artérias e dispositivos relacionados a hematologia. Esta camada pode ser usada 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. Compostos insolúveis em água podem tornar-se solúveis quando ligados ao PEG, como por exemplo, substratos de enzimas, co-fatores, corantes, etc. (HARRIS, 1992).

2.8 Diagrama de fases.

O diagrama de fases delinea o comportamento de um determinado sistema bifásico e é único para cada sistema em condições determinadas de pH, temperatura e

concentração de sal. A formação das duas fases aquosas depende da concentração dos componentes do sistema. O diagrama de fases mostra a região monofásica e bifásica de acordo com a concentração de cada componente expressa em % p/p.

O diagrama 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. 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 1 mostra um exemplo esquemático de um diagrama de fases.

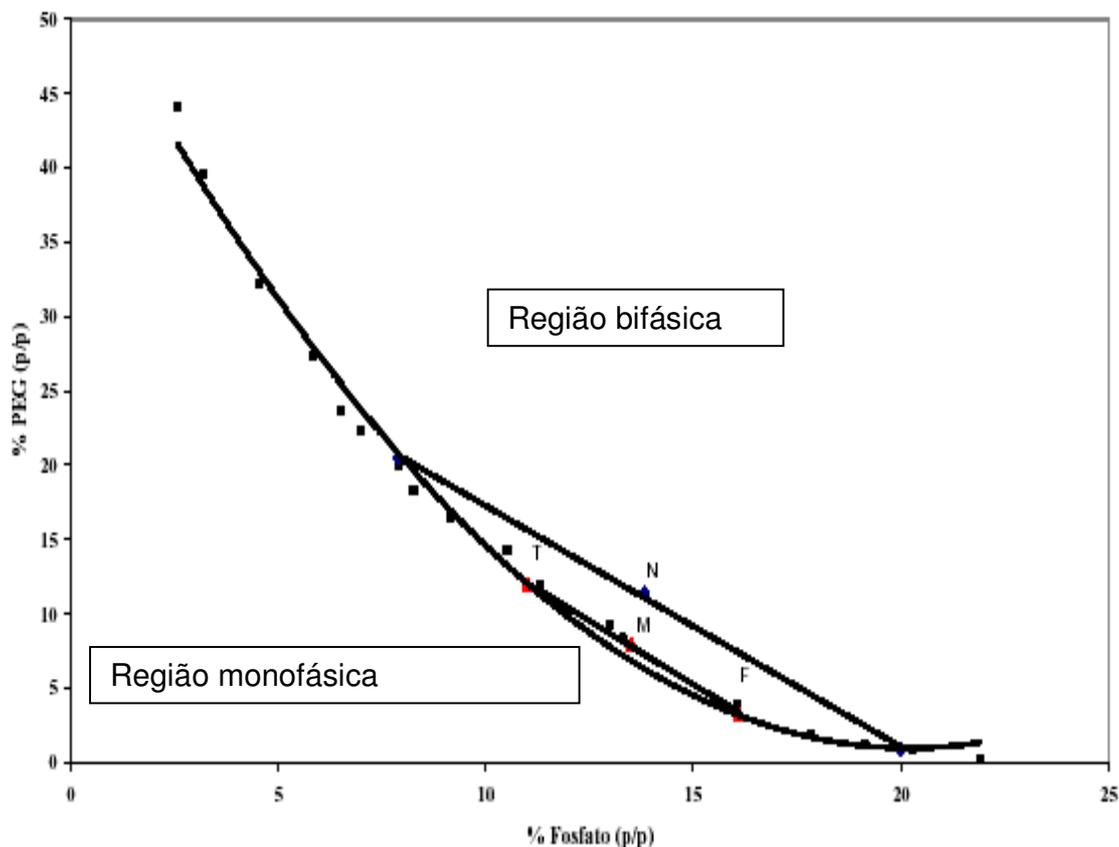


Figura 1 – Esquema de um diagrama de fases (FERREIRA, 2007)

A composição inicial do sistema é dada pelo ponto M e a composição final de cada fase após atingir o equilíbrio é dada pelos pontos T (fase superior ou de topo) e F

(fase inferior ou de fundo). O segmento TMF é chamado de “tie-line” ou linha de amarração, e todos os sistemas cuja composição inicial está contida nessa linha possuem a mesma composição de fases após o equilíbrio, porém com diferentes razões de volumes entre as fases, superior e inferior. Já a linha de amarração determinada pelo ponto N define uma nova linha de amarração (FERREIRA, 2007).

A tie-line por sua vez, conecta os pontos que indicam a concentração final dos componentes do sistema nas fases, superior e inferior. Os sistemas que se encontram ao longo de uma mesma “tie-line” apresentam diferentes composições totais e diferentes proporções volumétricas entre fases, no entanto apresentam a mesma concentração final dos componentes nas fases, superior e inferior. A curva binodal apresenta também um ponto crítico; onde a composição e o volume de ambas as fases são praticamente iguais (RAJNI, 1999)

Os fatores que influenciam no sistema de fases e conseqüentemente determinam o diagrama de fases são: concentração dos componentes do sistema, massa molar do polímero, pH e temperatura.

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).

A concentração dos polímeros ainda afeta o comprimento da linha de amarração, que tende a aumentar com o aumento das concentrações dos polímeros (FORCINITI *et al.*, 1991).

De modo geral quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração necessária para a formação de duas fases. A curva binodal desloca-se no sentido da região monofásica à medida que a massa molar do polímero aumenta.

Em sistemas polímero-polímero, como por exemplo; PEG/dextrana, a curva binodal torna-se cada vez mais assimétrica à medida que a diferença entre os pesos moleculares dos polímeros aumenta.

A massa molar do polímero atua também sobre o tempo de separação das fases, sendo por vezes necessária a utilização de centrifugação após a mistura de fases (ALBERTSSON *et al.*, 1994).

O valor de pH influencia no diagrama de fases, como também o tipo de cátion em solução. De modo geral diminuindo-se o valor do pH, as concentrações necessárias de polímero e sal de um sistema PEG/sal aumentam, deslocando a curva binodal para a direita. Esta tendência pode ser explicada 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 (fenômeno de expulsão devido ao tamanho do PEG), será necessária uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico.

Em relação ao 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).

A temperatura altera a composição das fases no equilíbrio, desloca a curva binodal e modifica também o comprimento da linha de amarração.

O comprimento da linha de amarração geralmente diminui com o aumento de temperatura. O efeito, no entanto 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 (CESAR, 2005).

2.9 Partição das proteínas.

Devido à atenção que vem sendo dada à produção de proteínas pela bioengenharia e o desenvolvimento da tecnologia de enzimas, renovou-se o interesse pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas que servem de base para o *scale up*. Os fundamentos de partição de biomoléculas entre as duas fases ainda não são totalmente compreendidos.

A tendência de separação de fases apresentada por dois polímeros quando adicionados num solvente comum, ocorre porque a baixa concentração molar dos polímeros na solução (tipicamente menor que 0,05 M) leva a um pequeno ganho de entropia durante a mistura. Por outro lado, cadeias poliméricas têm uma área superficial por molécula maior do que compostos de baixa massa molar, tanto que as energias de interação entre dois polímeros se sobrepõem à energia de Gibbs do sistema. Estes fatores levam à formação de duas fases em sistemas ternários polímero/polímero/água, em baixas concentrações de polímeros (CESAR, 2005).

Se o processo de partição protéica pudesse ser adequadamente predito, a extração em SBA poderia ser otimizada através de métodos matemáticos. Contudo, a modelagem quantitativa destes processos apresenta-se como um problema extremamente complexo devido a sua interdependência com uma larga gama de fatores.

Tentativas de modelagem complementares têm sido utilizadas no estudo da influência de vários mecanismos a nível molecular sobre a partição protéica. Os modelos desenvolvidos fornecem uma base para a tentativa de compreensão e posterior previsão do processo de partição de proteínas em SBA.

Contudo, o modelo contempla apenas a partição protéica em polímeros com diferentes pesos moleculares e em concentrações variadas de sais, sem tratar, porém da influência de um grande número de parâmetros relacionados a fenômenos físicos complexos que não estão ainda completamente elucidados (BASKIR, 1989; ABBOT, 1990).

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 (BASKIR *et al.*, 1989).

As condições adequadas para a partição devem ser encontradas experimentalmente devido à interdependência dos fatores abaixo:

- 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.
- Temperatura e pH

2.10 Coeficiente de partição

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

$$K = \frac{C_L}{C_P} \tag{1}$$

Onde:

C_L é a concentração da substância de interesse na fase leve no equilíbrio;

C_p é a concentração da substância de interesse na fase pesada no equilíbrio.

O coeficiente de partição mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse, pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar estes valores.

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

2.11 Fatores que influenciam o coeficiente de partição:

2.11.1 Interações entre a proteína e os componentes do sistema

A superfície molecular de uma proteína apresenta regiões carregadas positivamente e negativamente e regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. A distribuição destas áreas é característica de cada tipo de proteína e influencia a solubilidade da mesma quando em contato com solventes.

De modo geral o aumento de zonas hidrófobas na superfície da proteína resulta no aumento da afinidade com solventes apolares, como é o caso do PEG, fazendo com que esta permaneça na fase superior. De modo que a interação hidrofóbica entre a biomolécula e o grupo etileno do PEG explica a alta tendência das proteínas hidrófobas

de se deslocarem para a fase superior rica no polímero. O polietilenoglicol interage fortemente com as regiões apolares da proteína (SCHMIDT *et al.*, 1996).

2.11.2 Concentração dos componentes do sistema.

A partição de biomoléculas em SAB é especialmente influenciada pela concentração dos componentes do sistema. Em sistemas próximos ao ponto crítico geralmente as proteínas apresentam uma partição igual entre as duas fases, portanto o valor de K é igual a 1. Procedendo-se o aumento da concentração dos componentes e conseqüentemente o aumento no comprimento da linha de amarração, a partição da biomolécula se altera. Podem ocorrer, no entanto, casos excepcionais em que sistemas próximos ao ponto crítico, apresentem mesmo assim, valores de coeficiente de partição diferentes da unidade. E casos, onde o aumento da concentração dos componentes do sistema, ocasiona o aumento de K até um valor máximo para em seguida 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 (BAMBERGER *et al.*, 1985; ALBERTSSON, 1986; MINAMI, 1997).

2.11.3 Massa molecular da proteína e do polímero.

De modo geral em sistema composto por PEG/sal, à medida que se eleva a massa molar do polímero, a partição da proteína tende a ser mais favorável na fase salina. Massas molares baixas ocasionam o processo inverso, tornando a partição favorável na fase rica em PEG.

Em sistemas PEG/dextrana, de modo idêntico; PEG com massa molar elevada e dextrana com massa molar baixa, a partição tende a ser favorável à fase rica em dextrana. O aumento do efeito do volume excluído na fase PEG parece explicar este fenômeno. Esse efeito é menor para substâncias de baixa massa molar.

Quanto maior o tamanho da proteína, teoricamente maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema. Conseqüentemente de acordo com as características da molécula e com o tipo de interação, a sua partição será mais favorável a uma das fases. Esse fator é muito importante quando se deseja separar duas substâncias com pesos moleculares muito diferentes (JOHANSSON, 1994; ALBERTSSON, 1986; YANG *et al.*, 1994).

O coeficiente de partição de modo geral diminui com o aumento da massa molar da proteína. Esta influência é maior quando o sistema é formado por PEG de baixa massa molar e tende a ser minimizada com PEG de alta massa molar (ALBERTSSON, 1986; FORCINITI *et al.*, 1991).

2.11.4 Potencial hidrogeniônico.

A distribuição de cargas na superfície da proteína é alterada com variações no valor do pH. O meio ácido promove o aumento das cargas positivas, enquanto que valores mais elevados de pH causam o aumento de cargas negativas. Deste modo, ajustando-se o pH do meio, a valores próximos ao ponto isoelétrico (pI) da proteína -

valor de pH onde a molécula apresenta carga elétrica líquida próxima a zero – tem-se reduzido os efeitos que atuam sobre a partição em SBA, apenas aos efeitos 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).

Observou-se que na partição da cutinase os coeficientes de partição atingiram maiores valores, à medida que se utilizou maiores valores de pH. Valores maiores de pH causaram o aumento da concentração do ânion HPO_4^{2-} em relação ao ânion H_2PO_4^- , resultando no incremento do efeito “salting out”, aumentando por fim, a partição da cutinase na fase “rica” em PEG (SEBASTIÃO *et al.*, 1994).

2.12 Tempo de separação das fases.

De modo geral sistemas contendo PEG/sal possuem um tempo de separação das fases muito menor que os sistemas PEG/dextrana devido à densidade e viscosidade do sistema. Em sistemas dextrana/ficoll, o tempo varia de 1 a 6 horas pela ação da gravidade, enquanto em sistemas PEG/dextrana esse valor cai para 5 a 30 minutos dependendo da concentração e da massa molar dos polímeros. Nos sistemas PEG/fosfato, o tempo de separação entre as fases é inferior a 5 minutos (COIMBRA, 1995).

Nos sistemas próximos ao ponto crítico, o tempo de separação é maior devido a pequena diferença de densidade. Já no caso dos sistemas muito distantes do ponto crítico, a viscosidade aumenta devido ao aumento da concentração do polímero, tornando a separação de fases mais lenta.

A velocidade de separação também é influenciada pela velocidade de coalescência das pequenas bolhas que se formam durante a agitação. Quando se agita um sistema de fases de maneira a uniformizá-lo, inicialmente ocorre a formação de pequenas regiões ricas em cada componente. Com o tempo, essas regiões aumentam e separam-se em duas regiões distintas (BAMBERGER *et al.*, 1985).

2.13 Equação do coeficiente de partição.

O desenvolvimento de equações específicas que possam prever o valor de K tem sido alvo de estudo (ASENJO *et al.*, 1994; EITEMAN *et al.*, 1994).

De acordo com o tipo de substância e do sistema de fases empregado, a partição de substâncias sofre influência de cinco fatores que ora atuam separadamente - com predominância de um fator em relação aos outros - ora em conjunto (ALBERTSSON, 1986).

A influência desses fatores sobre o valor final de K foi expressa pela seguinte equação:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{eletr} + \ln K_{bioesp} + \ln K_{tam} + \ln K_{conf} + \ln K_{hifob} \quad (2)$$

sendo:

K_{eletr} o fator eletroquímico. Surge quando o potencial elétrico existente entre as fases do sistema é usado para separar as moléculas de acordo com a sua carga elétrica;

K_{hifob} o fator de afinidade hidrofóbica. É a utilização das propriedades hidrofóbicas do sistema de fases para separar as moléculas em função da sua hidrofobicidade;

K_{bioesp} o fator de afinidade bioespecífica. Baseia-se na afinidade entre os locais da molécula como ligantes do polímero para a separação e fator de conformação, que é considerado quando a conformação da molécula é o fator predominante.

K_{tam} o fator do tamanho. Atua quando a partição depende do tamanho da molécula ou da área superficial das partículas.

K_{conf} o fator de conformação. Baseia-se na alteração da estrutura terciária da proteína, de modo a tornar mais ou menos expostos grupos carregados que podem interagir com os componentes do sistema.

K^0 o valor inicial do K .

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Processos de Separação II, DESQ/FEQ/UNICAMP.

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

Constituintes do sistema de duas fases aquosas.

1) Os sais utilizados foram:

Fosfato de potássio monobásico anidro P.A, de fórmula molecular KH_2PO_4 e massa molar de 136,09 g/mol. Fosfato de potássio dibásico anidro P.A., de fórmula molecular K_2HPO_4 e massa molar de 174,18 g/mol, ambos fornecidos pela Synth.

2) Foi utilizado polietilenoglicol (PEG) com pesos moleculares de 4000 e 6000, fornecidos pela Synth.

Constituintes das soluções utilizadas para a determinação da atividade enzimática e quantidade total de proteínas.

1) Solução padrão de proteína:

Foi utilizada a proteína padrão albumina de soro bovino (BSA) de massa molar 66.500-67.500 Da (ponto isoelétrico 5,1) obtida da Sigma Chemical.

2) Reagente de Bradford:

Reagente de Bradford Coomassie Brilliant Blue *G-250*, de fórmula molecular $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$, fornecido pela VETEC.

Álcool Etílico 99,5% de pureza, de massa molar 46,07 g/mol, fornecido pela Ecibra.

Ácido o-fosfórico 85%, de fórmula molecular H_3PO_4 , massa molar de 98g/mol, fornecido pela Synth.

3) Reagente do biureto:

Tartarato duplo de sódio e potássio. Fórmula molecular $NaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$, massa molar de 282,22 g/mol, fornecido pela Synth.

Sulfato de cobre pentahidratado. Fórmula molecular: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, da marca Synth.

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

4) Solução de $NaOH$ 1 M

O reagente hidróxido de Sódio foi fornecido pela Synth.

3.1.2. Equipamentos

- Multiprocessador Walita.
- Balança Eletrônica Marte, modelo AL 200.

- Agitador Biomatic, modelo 1005.
- pHmêtro Analyser pH 300.
- Agitador magnético com aquecimento NOVA ÉTICA, modelo 119, potência: 300 W, RPM: 3000.
- Banho termostatizado FANEM, modelo 100.
- Estufa de secagem.
- Micropipetas automáticas.
- Espectrofotômetro UV/VIS Spectronic 21D.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo das amostras.

3.2.1.1. Preparação da amostra a partir da folha do curauá, variedades roxa e branca.

Preparou-se as amostra a partir da folha do curauá através das seguintes etapas:

1) Moagem da folha em um multiprocessador em velocidade baixa, por 5 minutos, em temperatura ambiente (24 ± 2 °C), com adição de solução tampão.

2) Filtração em tela de Nylon para retirada de fibras e particulados presentes no extrato.

3) Acondicionamento à temperatura de -5 °C.

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.

Adicionou-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 dissolveu-se em 100 mL de tampão fosfato.

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, adicionou-se 100mL de ácido fosfórico 85%.

Agitou-se a solução por mais 2 horas e completou-se o volume para 1L com água deionizada. Deixou-se agitar por 12 horas.

Filtrou-se o reagente com papel de filtro para filtração rápida, em frasco coberto com papel alumínio. Deixou-se em repouso na geladeira por horas antes de utilizar (BRADFORD, 1976).

Obs.: 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 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 22 % (p/p).

Os sais foram secos em estufa para retirada total da umidade.

Pesou-se certa quantidade do sal fosfato de potássio dibásico. Completou-se com água deionizada até atingir a massa de desejada para se obter a concentração de 22% (p/p). 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.

3.2.1.6 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% (p/p).

3.2.1.7 Preparo dos tampões.

Preparou-se as soluções tampão pH 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5 a partir de soluções de fosfato de potássio mono e dibásico a 15% (p/p) (MORITA, 1995).

Preparou-se soluções padrão de fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico. Misturou-se em um béquer, contendo um eletrodo de cloreto de prata, para medir o pH do meio, até atingir o pH desejado.

3.2.2 Determinação da temperatura ótima.

Com o pH fixado em 7,0, foram feitos ensaios em batelada para se medir a atividade enzimática e quantidade de proteínas totais em amostras a diversas temperaturas, do seguinte modo:

Em vários tubos foram colocados 5 mL de solução de BSA 5g/L em várias temperaturas. Essa solução foi deixada 10 minutos para estabilizar a temperatura no biorrretor. As temperaturas foram: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C.

Com o pH fixado e com as respectivas temperaturas, realizou-se a medição da atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais, de acordo com o seguinte procedimento:

Colocaram-se 5 mL de BSA em um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL da enzima (extrato da folha do 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 um outro tubo e adicionou-se 5 mL de biureto, imediatamente.

Depois de retirada a amostra, deixou-se a amostra inicial reagir por 10 minutos na temperatura desejada e depois desse tempo retirou-se outra amostra e seguiu-se o mesmo procedimento anterior.

As amostras foram lidas no espectrofotômetro somente depois de 10 minutos de descanso da amostra, para que esta se estabilizasse.

Todas as amostras foram feitas em triplicata.

3.2.3 Determinação do pH ótimo.

Com a temperatura ótima obtida pelos ensaios anteriores, foi possível também, pelas análises de atividade enzimática e proteínas totais se obter o pH ótimo da enzima, de acordo com o seguinte procedimento:

Foram adicionadas ao extrato soluções tampões de modo a obter os pHs desejados: 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5.

Colocou-se 5 mL de BSA (Soro Albumina Bovina) em um tubo, adicionou-se 1 mL da enzima (extrato das folhas 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 5 mL de biureto, imediatamente.

Depois de retirada a amostra, deixou-se a amostra inicial reagir por 10 minutos e depois desse tempo retirou-se outra amostra e seguiu-se o mesmo procedimento anterior.

As amostras foram lidas no espectrofotômetro somente depois de 10 minutos de descanso da amostra, para que esta se estabilizasse. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

A determinação do atividade enzimática foi realizada através do método de Murachi e Baldini modificado (LOPES, 2005). Utilizou-se como padrão o BSA e o método de biureto, como reagente reativo.

A equação de Michaelis-Menten foi utilizada para obtenção dos modelos cinéticos (equação 3)

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m [S]} \quad (3)$$

Sendo que V_{max} é a velocidade máxima da reação, K_m é a constante de Michaelis–Menten e $[S]$ a concentração do substrato.

Os parâmetros foram encontrados pelo modelo M-M linearizado (equação 4), de acordo com Lineweaver-Burk (HALPERN, 1997; MORRIS, 1972; PETER *et al.*, 1987).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} \quad (4)$$

Foram utilizados sistemas bifásicos aquosos PEG/sal de acordo com os descritos por Ferreira (2007), obtidos a partir do método da turbidez (ALBERTSSON, 1971).

3.2.4 Metodologia de obtenção do coeficiente de partição da enzima bromelina derivada do curauá.

Os sistemas foram reproduzidos em tubos graduados com massa total do sistema entre 6 e 8 g. A estes tubos foi adicionado, com o auxílio de uma pipeta automática o extrato derivado das folhas do curauá, variedade branca e roxa, tamponado nos pHs de 4,5 a 9,5. Assim que o equilíbrio atingiu o equilíbrio difusivo (entre 12 e 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 do Bradford.

Para o cálculo dos parâmetros K_{prot} , K_{ativ} e FP, importantes para a análise dos resultados, utilizaram-se as equações 5, 6 e 7 respectivamente.

$$K_{prot} = \frac{\text{Proteína (FL)}}{\text{Proteína (FP)}} \quad (5)$$

$$K_{ativ} = \frac{\text{Atividade (FL)}}{\text{Atividade (FP)}} \quad (6)$$

$$FP = \frac{AE (FL)}{AE (Bruta)} \quad (7)$$

Sendo:

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

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

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

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

3.2.5 Calibração do espectrofotômetro

Adicionou-se em um tubo de ensaio, 1 mL de água e 5 mL de biureto, que corresponde ao branco.

Colocou-se esta solução numa cubeta e leu-se no espectrofotômetro num comprimento de onda de 540 nm. Para esta amostra os valores da Transmitância e da Absorbância devem ser 100 e 0, respectivamente.

Para a calibração do equipamento utilizando-se reagente de Bradford, o mesmo procedimento é feito, somente ao invés de biureto é adicionado 5 mL do reagente de Bradford e a leitura é feita no comprimento de onda de 595 nm.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação do pH ótimo.

A variação dos valores de pH exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. Isto se dá devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de H⁺ (RICARDO, 1993).

O gráfico da figura 2 apresenta o efeito do pH sobre a atividade da bromelina derivada da folha do curauá branco. Observou-se que a atividade enzimática foi afetada na faixa de pH estudada. Observou-se o valor de pH ótimo da bromelina derivada do curauá branco em 8,5 onde a mesma apresentou o máximo de atividade.

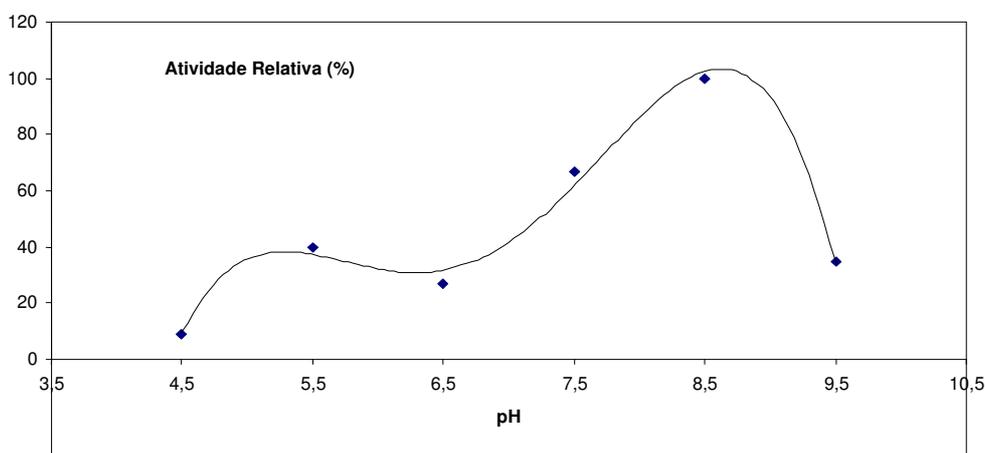


Figura 2: Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco.

A figura 3 descreve o efeito da variação do pH sobre a atividade da bromelina derivada da folha do curauá roxo. Observou-se que a atividade enzimática foi afetada na faixa de pH estudada. Observou-se também para a bromelina derivada das folhas do curauá roxo, o valor de pH ótimo em 8,5.

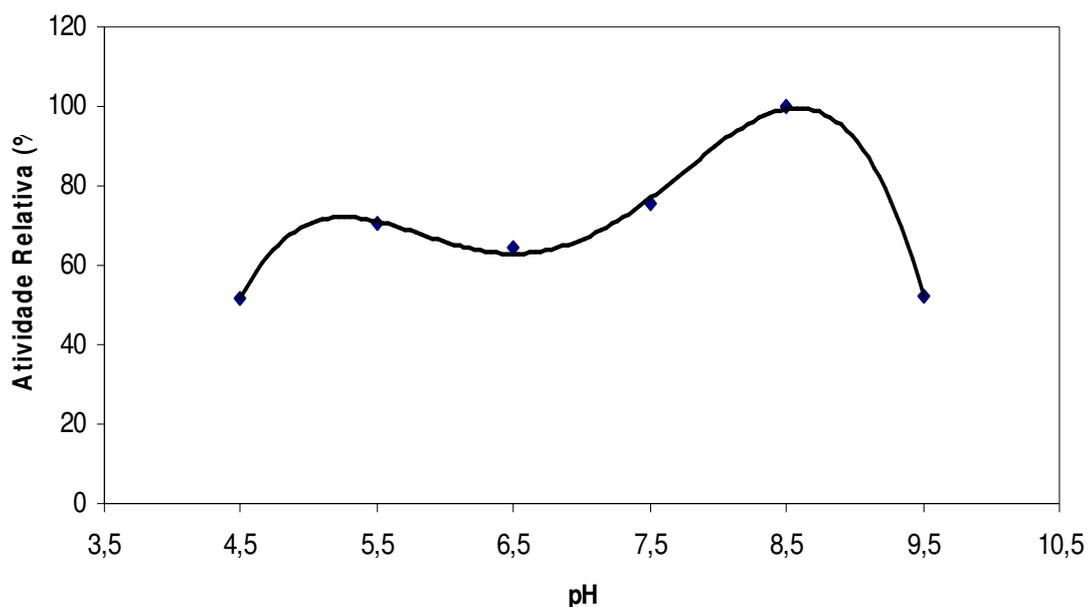


Figura 3: Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo

A obtenção dos valores de pH ótimos é de extrema importância na estratégia de purificação enzimática, pois evita a perda de atividade pelo uso de faixas de pH agressivos às enzimas e a redução na eficiência do método empregado (SANTANA, 2006).

4.2 Obtenção da temperatura ótima.

A Figura 4 descreve o perfil da atividade proteolítica da enzima bromelina derivada do curauá branco em diferentes temperaturas. Observou-se que a atividade enzimática foi afetada pela variação da temperatura. A atividade proteolítica foi máxima na temperatura de 30°C.

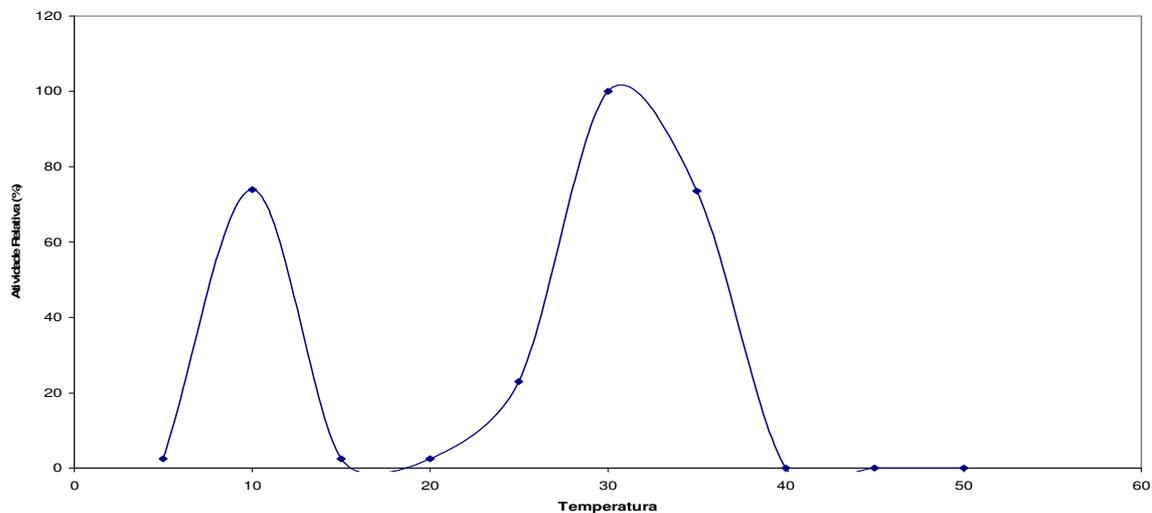


Figura 4: Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco.

Este valor está de acordo com Ferreira (2007), que analisou a temperatura ótima da enzima bromelina derivada do abacaxi, e encontrou como melhor faixa de utilização da enzima a temperatura entre 30 e 40°C.

Rasheedi *et al.* (2003) caracterizaram a bromelina derivada do talo do abacaxi (*Ananas comosus*) encontrando temperatura ótima em 37 °C. Do mesmo modo, Khan *et al.* (2003) encontraram temperatura ótima de 37 °C. No entanto, Ko *et al.* (1990) encontraram temperatura ótima de 62,5 °C.

A Figura 5 descreve o perfil da atividade proteolítica da enzima bromelina derivada da folha do curauá roxo quando exposta a diferentes temperaturas. Observou-se que a atividade enzimática foi afetada pela variação da temperatura, porém para a variedade roxa, foram detectados três valores de temperatura ótima; 10, 20 e 35°C.

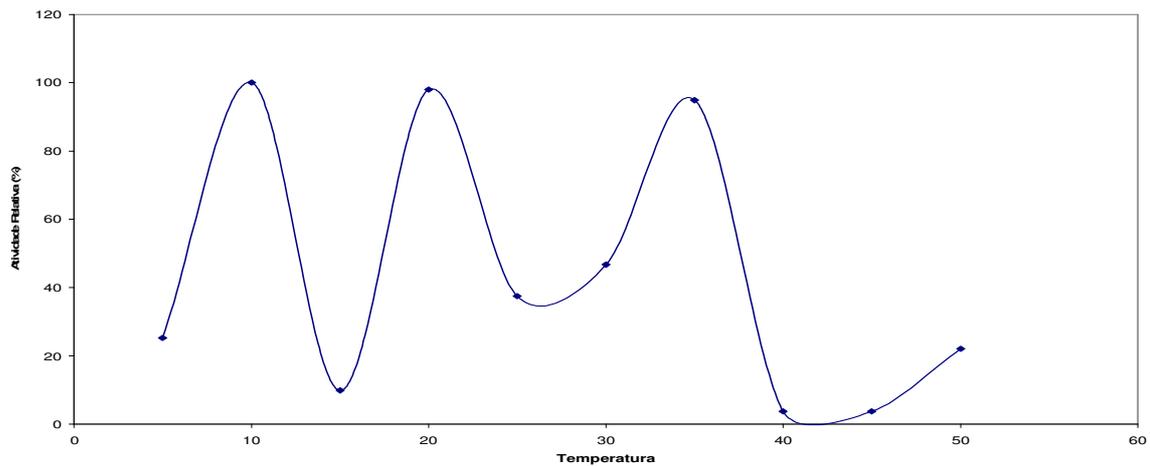


Figura 5: Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo.

Possivelmente este comportamento poderá indicar a existência de mais de uma enzima proteolítica no curauá variedade roxa. Portanto em estudos futuros sobre a planta, uma confirmação através de método cromatográfico ou outro método de identificação, poderá ser realizada a fim de confirmar esta possibilidade.

4.3 Cinética da reação de hidrólise de BSA por bromelina derivada da folha do curauá variedade branca.

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada a pH 8,5 numa temperatura de 30 °C. A partir dos dados obtidos experimentalmente obteve-se a curva cinética descrita na figura 6. O gráfico demonstra a influência da concentração do substrato na velocidade de hidrólise de BSA pela bromelina derivada da folha do curauá branco.

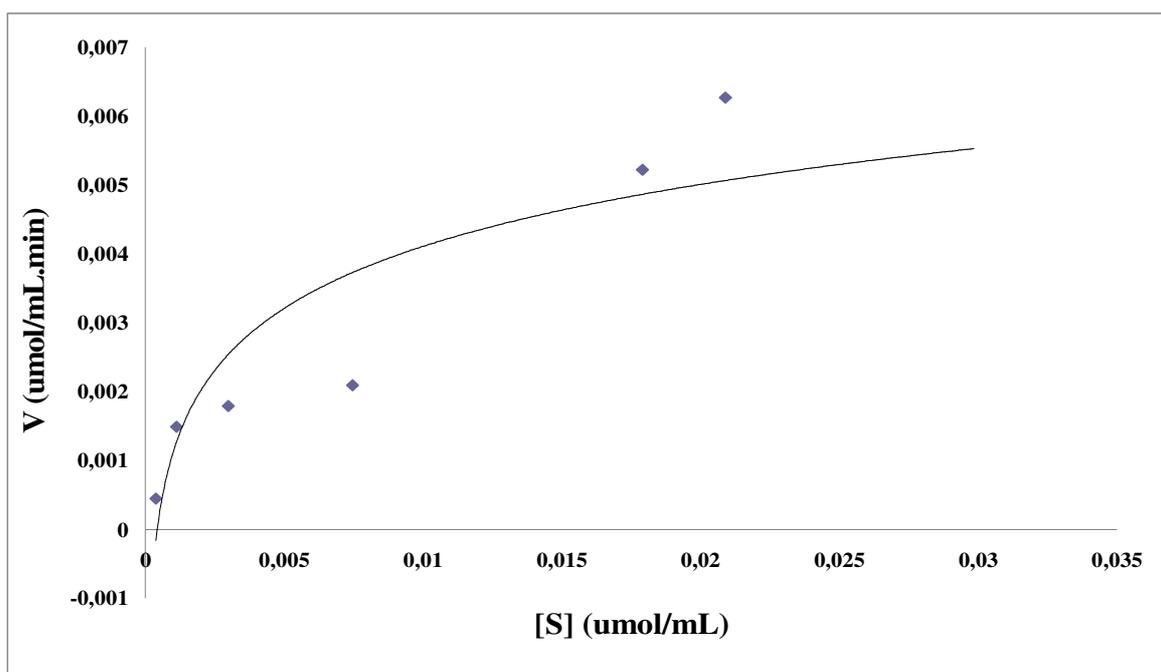


Figura 6 Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelina derivada da folha do curauá branco.

A partir da metodologia para linearização dos dados cinéticos de Lineweaver-Burk obteve-se a figura 7. Ajustando-se os dados experimentais ao modelo mostrado na equação 4 tem-se que o valor da constante K_m foi 0,003636364 micromol/mL e o valor de $V_{máx}$ foi 0,004914005 micromol de BSA/mL.min.

O K_m corresponde à concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima.

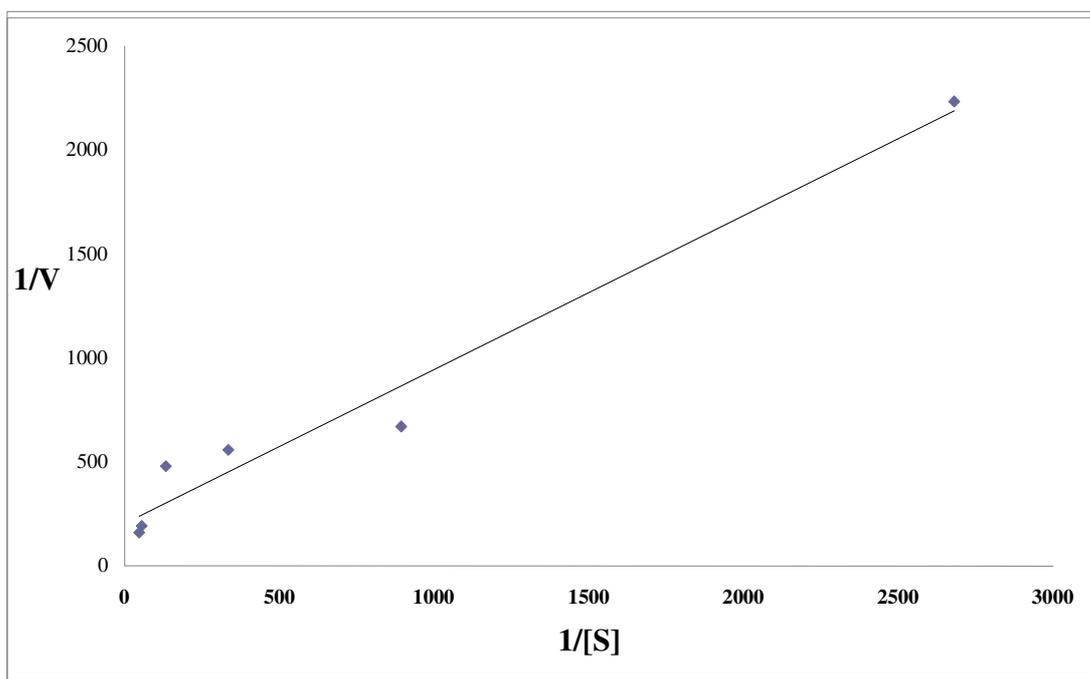


Figura 7 Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk.

4.4 Diagrama de fases.

Dentro das muitas áreas que abrangem a biotecnologia os processos de recuperação e purificação de produtos biológicos são atualmente uma das mais importantes e com maior destaque. Neste contexto a extração com sistemas bifásicos aquosos é uma técnica bastante atrativa, devido ao fato de que possibilita condições suaves e seguras para trabalhar-se com produtos biológico.

A escolha dos constituintes do sistema bifásico aquoso deve-se a características próprias dos mesmos. O PEG além de ser biodegradável e atóxico, forma fases em meio aquoso e ainda possibilita um meio propício a manutenção da atividade de biomoléculas. O fosfato de potássio por sua vez, foi selecionado por apresentar alto coeficiente de partição de biomoléculas em relação a outros sais, tais como: NaCl e Na₂SO₄, além de ser uma boa alternativa de baixo custo aos processos convencionais, que utilizam a dextrana.

Neste trabalho utilizou-se os diagramas de fases descritos por Ferreira (2007) para sistemas PEG/sal, também em relação à extração e purificação da enzima bromelina.

4.5 Estudo de partição da bromelina derivada do curauá.

Devido aos complexos fatores que influenciam o processo de partição é difícil prever o comportamento de determinada proteína e assim selecionar previamente as melhores condições experimentais. Assim sendo, a grande maioria dos estudos relacionados à purificação de proteínas é empírica e se dá através da variação sistêmica de diversos fatores.

Estudou-se a influencia do pH, massa molar do polímero e comprimento da “tie-line” na purificação da enzima bromelina derivada de ambas as variedades do curauá.

Os resultados para o sistema PEG/sal em relação à purificação da enzima bromelina derivada do Curauá, variedade branca e roxa, estão descritos nas tabelas 1 à 12.

Tabela 1 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/fosfato em pH 7,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0017				
1			Fase leve	0,004778	18,735	0,9935	0,5751	2,82
PEG	Sal	Água						
16,23	13,5	70,27	Fase pesada	0,004809	32,573			
2			Fase leve	0,006301	22,023	0,9743	0,6159	3,80
PEG	Sal	Água						
12,4	13,4	74,2	Fase pesada	0,006467	35,753			
3			Fase leve	0,007711	30,622	1,0568	0,5595	4,53
PEG	Sal	Água						
8,51	13,5	77,99	Fase pesada	0,007296	54,723			

Tabela 2 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/fosfato em pH 8,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0036				
1			Fase leve	0,004919	21,649	1,0439	0,4521	1,36
PEG	Sal	Água						
16,95	11,9	71,37	Fase pesada	0,004712	47,881			
2			Fase leve	0,008043	22,239	1,2125	0,5892	2,23
PEG	Sal	Água						
14,88	11,5	73,73	Fase pesada	0,006633	37,740			
3			Fase leve	0,005078	32,320	1,0986	0,3683	1,41
PEG	Sal	Água						
12	11	77	Fase pesada	0,004622	87,747			

Tabela 3 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/fosfato em pH 9,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0035				
1			Fase leve	0,007524	35,392	1	0,3130	2,14
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,007524	113,041			
19,8	13,5	66,7						
2			Fase leve	0,004337	28,978	1,0219	0,3908	1,23
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,004244	74,143			
18,5	12,2	69,3						
3			Fase leve	0,003886	30,658	0,9578	0,4497	1,15
PEG	Sal	Água	Fase pesada	,004057	68,163			
16,03	11,2	72,77						

Tabela 4 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/fosfato em pH 7,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0017				
1			Fase leve	0,00445	20,950	0,9227	0,4092	2,84
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,004830	51,193			
21	11,6	67,4						
2			Fase leve	0,00671	19,475	1,1637	0,4325	3,95
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,005771	45,021			
17,5	11,1	71,4						
3			Fase leve	0,00587	20,432	0,9123	0,5287	3,78
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,006434	38,643			
14,6	10,8	74,6						

Tabela 5 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/fosfato em pH 8,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0036				
1			Fase leve	0,005317	19,421	1,0891	0,5922	1,47
PEG	Sal	Água						
23,7	10,5	65,8	Fase pesada	0,004881	32,790			
2			Fase leve	0,004975	20,107	0,9677	0,5799	1,42
PEG	Sal	Água						
21,1	10,1	68,8	Fase pesada	0,005140	34,669			

No sistema PEG 6000/Fosfato em pH 8,0 descrito acima, foram pesquisadas apenas 2 “tie-lines”.

Tabela 6 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/fosfato em pH 9,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0035				
1			Fase leve	0,007835	16,639	0,8181	0,4358	2,73
PEG	Sal	Água						
18,99	11,3	69,71	Fase pesada	0,009577	38,174			
2			Fase leve	0,006260	23,540	0,9679	0,5197	1,84
PEG	Sal	Água						
17,77	10,8	71,44	Fase pesada	0,006467	45,292			
3			Fase leve	0,007960	23,287	1,2631	0,6170	2,27
PEG	Sal	Água						
16,37	10,4	73,24	Fase pesada	0,006301	37,740			

Tabela 7 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato em pH 7,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0026				
1			Fase leve	0,008706	32,212	1,5	0,5870	3,34
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,005804	54,867			
16,23	13,5	70,27						
2			Fase leve	0,005555	22,095	0,9852	0,4410	2,16
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,005638	50,098			
12,4	13,4	74,2						
3			Fase leve	0,005348	21,300	0,9828	0,6733	2,09
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,005441	31,634			
8,51	13,5	77,99						

Tabela 8 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato em pH 8,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0035				
1			Fase leve	0,005721	34,813	1,0866	0,3928	1,63
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,005265	88,615			
16,95	11,7	71,37						
2			Fase leve	0,010033	32,392	1,2410	0,4176	2,86
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,008084	77,558			
14,88	11,5	73,73						
3			Fase leve	0,010281	33,314	1,2916	0,5388	2,93
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,007960	61,822			
12	11	77						

Tabela 9 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato em pH 9,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0034				
1			Fase leve	0,005576	22,637	1,0717	0,2074	1,64
PEG	Sal	Água						
19,8	13,5	66,7	Fase pesada	0,005203	109,138			
2			Fase leve	0,011318	24,660	1,3718	0,3835	3,32
PEG	Sal	Água						
18,5	12,2	69,3	Fase pesada	0,008250	64,297			
3			Fase leve	0,004436	17,795	0,9907	0,5247	1,31
PEG	Sal	Água						
16,03	11,2	72,77	Fase pesada	0,004477	33,910			

Tabela 10 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/fosfato em pH 7,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0026				
1			Fase leve	0,009535	26,864	1,4556	0,4807	3,66
PEG	Sal	Água						
21	11,6	67,4	Fase pesada	0,006550	55,878			
2			Fase leve	0,006232	23,708	0,8493	0,4792	2,82
PEG	Sal	Água						
17,5	11,1	71,4	Fase pesada	0,007338	49,471			
3			Fase leve	0,006550	22,058	0,9518	0,4885	2,64
PEG	Sal	Água						
14,6	10,8	74,6	Fase pesada	0,006882	45,147			

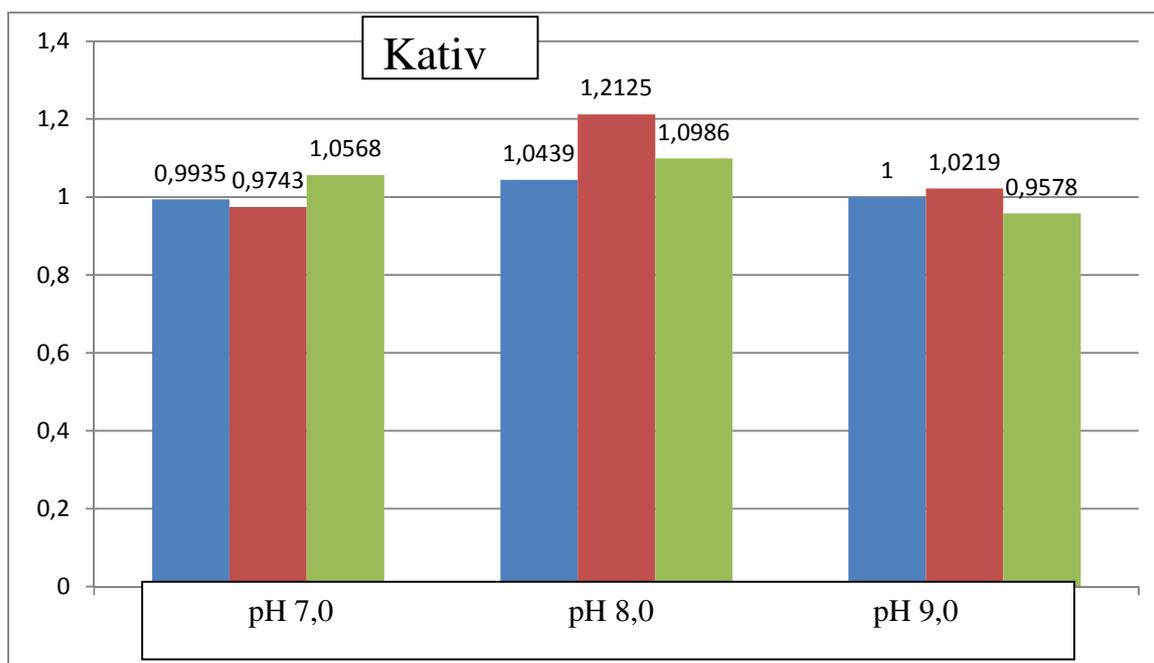
Tabela 11 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/fosfato em pH 8,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0035				
1			Fase leve	0,006467	34,199	1,0129	0,4847	1,84
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,006384				
23,7	10,5	65,8						
2			Fase leve	0,007587	28,562	1,0701	0,5104	2,16
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,007089				
21,1	10,1	68,8						
3			Fase leve	0,007752	27,261	1,0935	0,5869	2,21
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,007089				
18,3	9,9	73,5						

Tabela 12 Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/fosfato em pH 9,0.

Tie line - Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	Proteínas (µg/mL)	K_{Ativ}	K_{Prot}	FP
			Bruta	0,0034				
1			Fase leve	0,005192	17,687	1,0915	0,4655	1,52
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,004757				
18,99	11,3	69,71						
2			Fase leve	0,007296	25,708	0,7489	0,5707	2,86
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,009742				
17,77	10,8	71,44						
3			Fase leve	0,004757	25,925	1,0132	0,5756	1,39
PEG	Sal	Água	Fase pesada	0,004695				
16,37	10,4	73,24						

Gráfico 1. Gráfico comparativo dos valores de K_{Ativ} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.



Legenda referente aos gráficos 1 ao 12:

Coluna azul	Tie line 1
Coluna vermelha	Tie line 2
Coluna verde	Tie line 3

Gráfico 2. Gráfico comparativo dos valores de K_{Prot} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

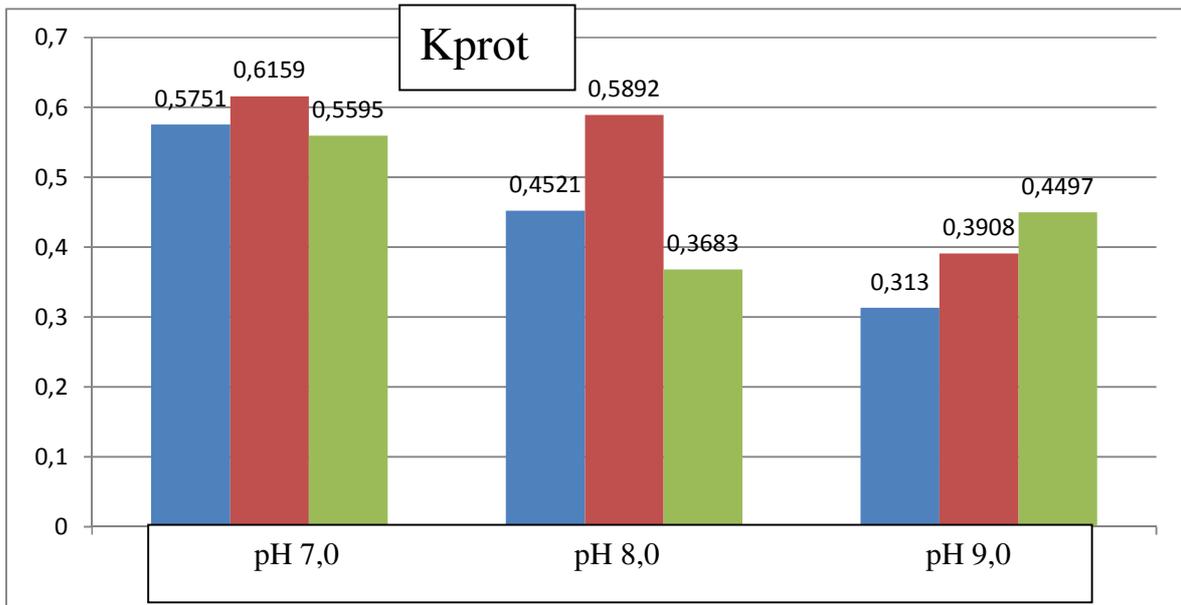


Gráfico 3. Gráfico comparativo dos valores dos fatores de purificação (FP) obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

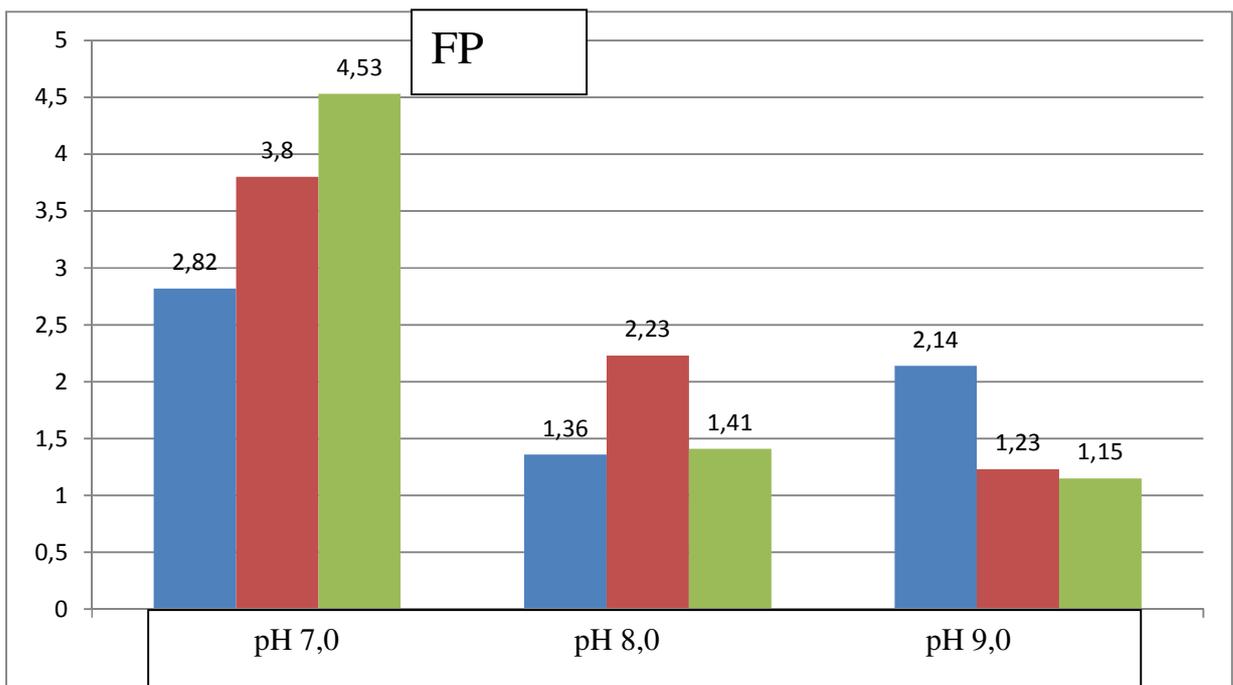


Gráfico 4. Gráfico comparativo dos valores para K_{Ativ} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

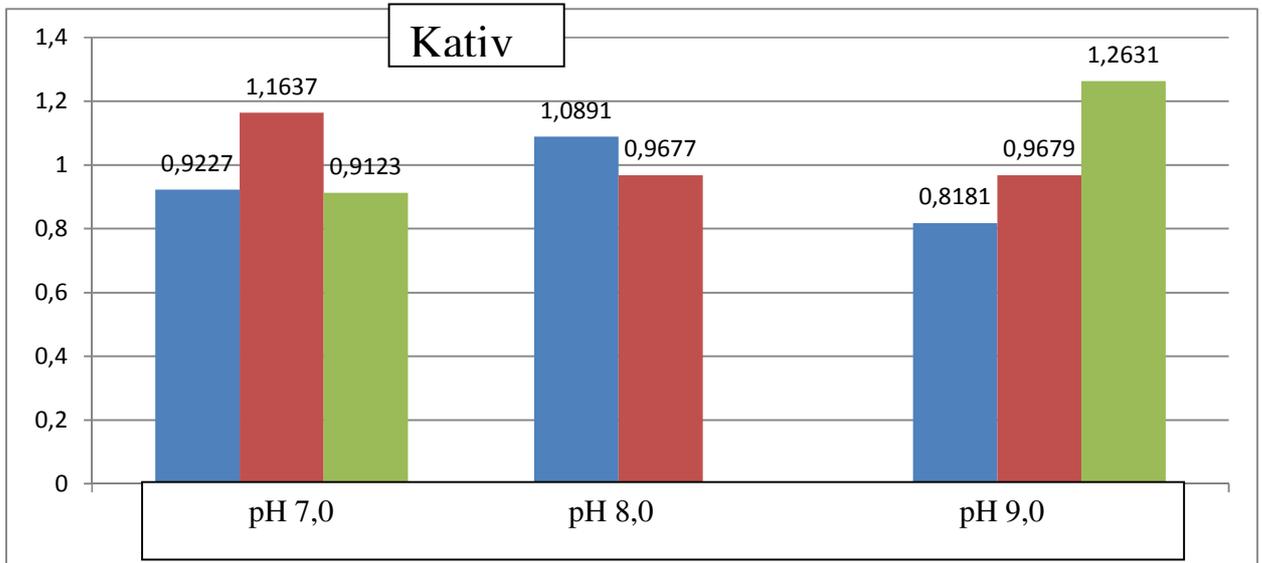


Gráfico 5. Gráfico comparativo dos valores para K_{Prot} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

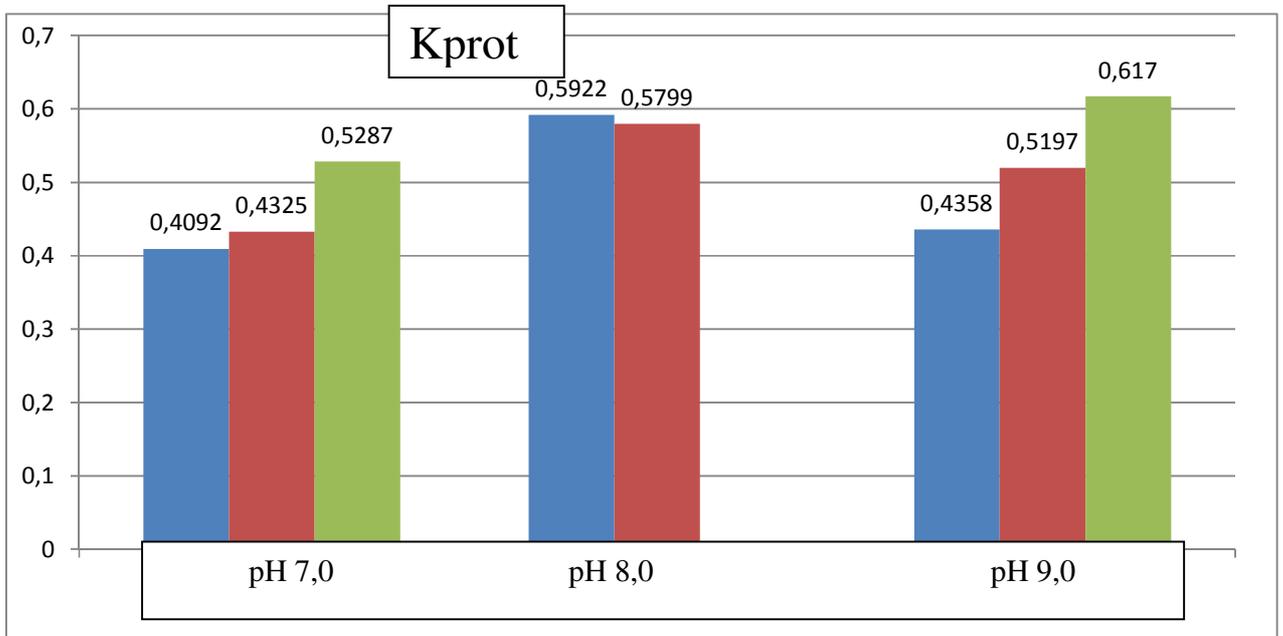


Gráfico 6. Gráfico comparativo dos valores para os fatores de purificação (FP) obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá branco, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

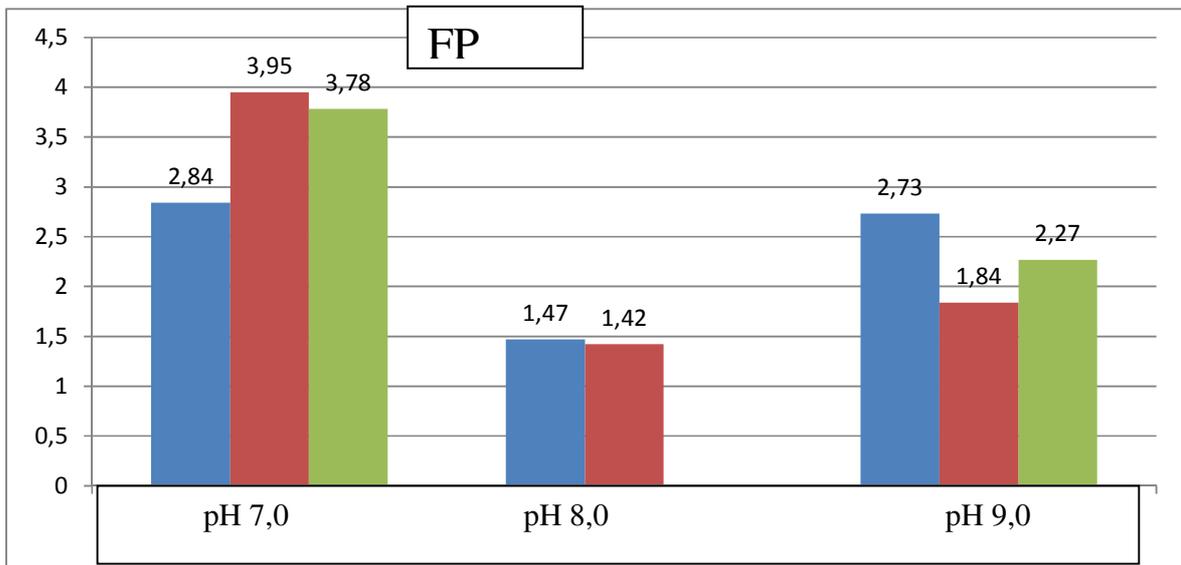


Gráfico 7. Gráfico comparativo dos valores para K_{ativ} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

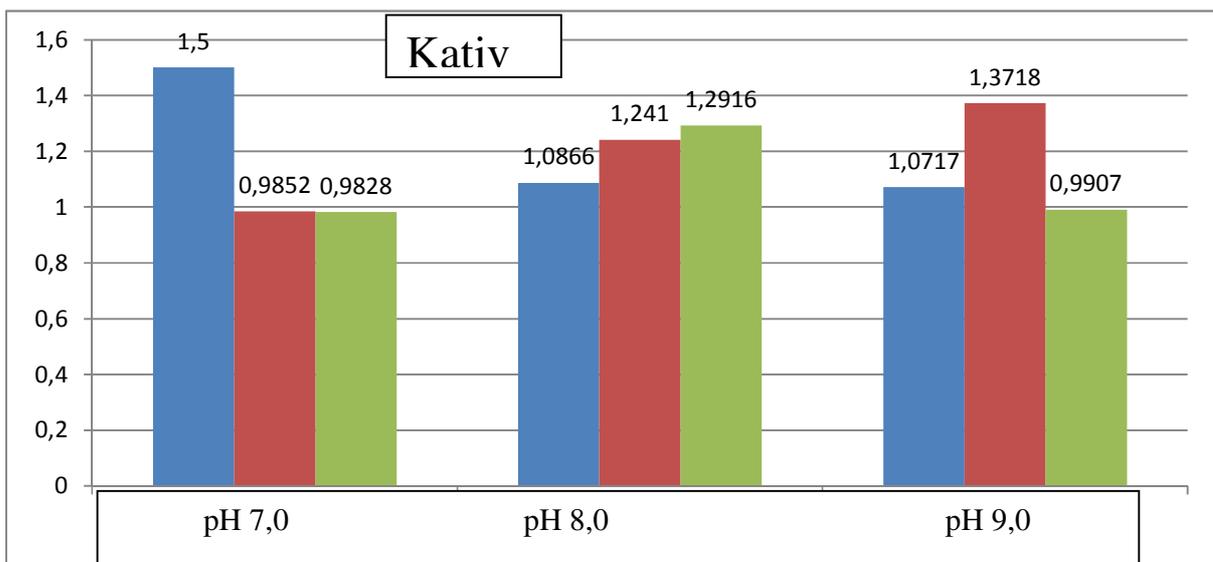


Gráfico 8. Gráfico comparativo dos valores para K_{prot} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

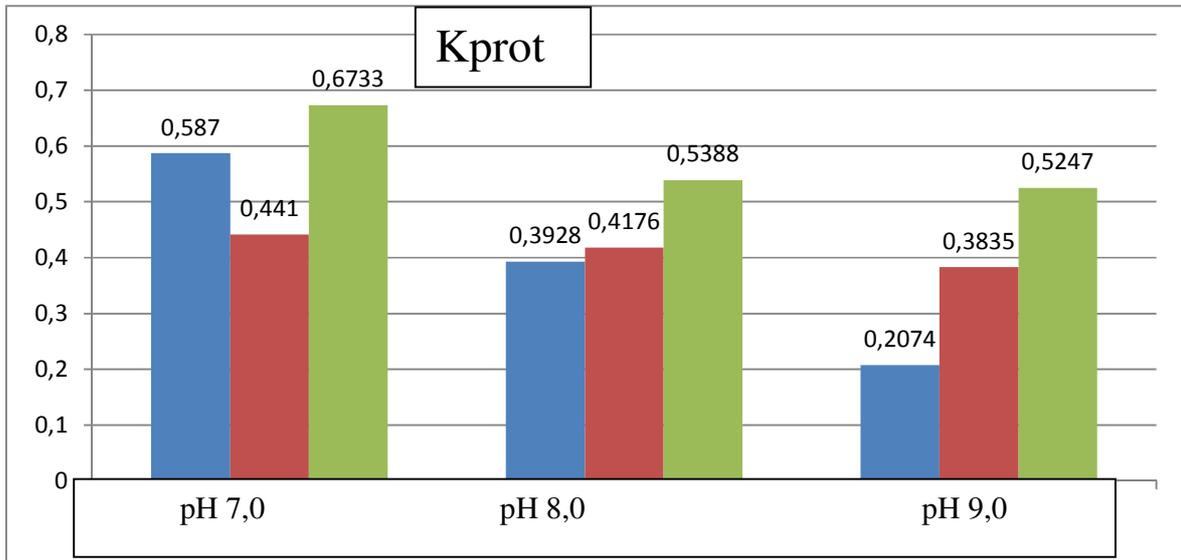


Gráfico 9. Gráfico comparativo dos valores para os fatores de purificação (FP) obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

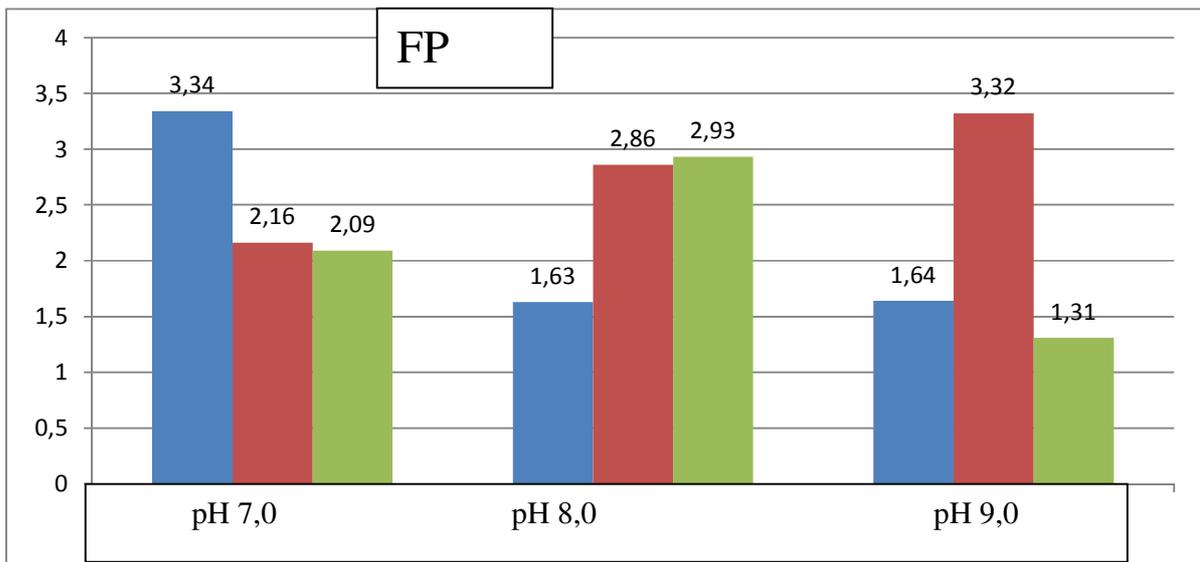


Gráfico 10. Gráfico comparativo dos valores para K_{Ativ} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

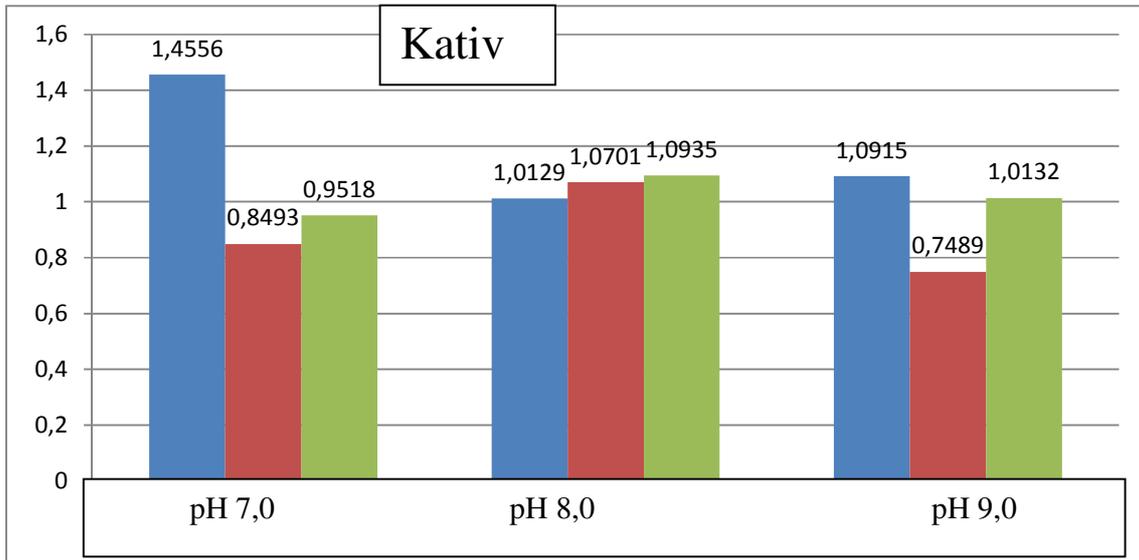


Gráfico 11. Gráfico comparativo dos valores para K_{Prot} obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

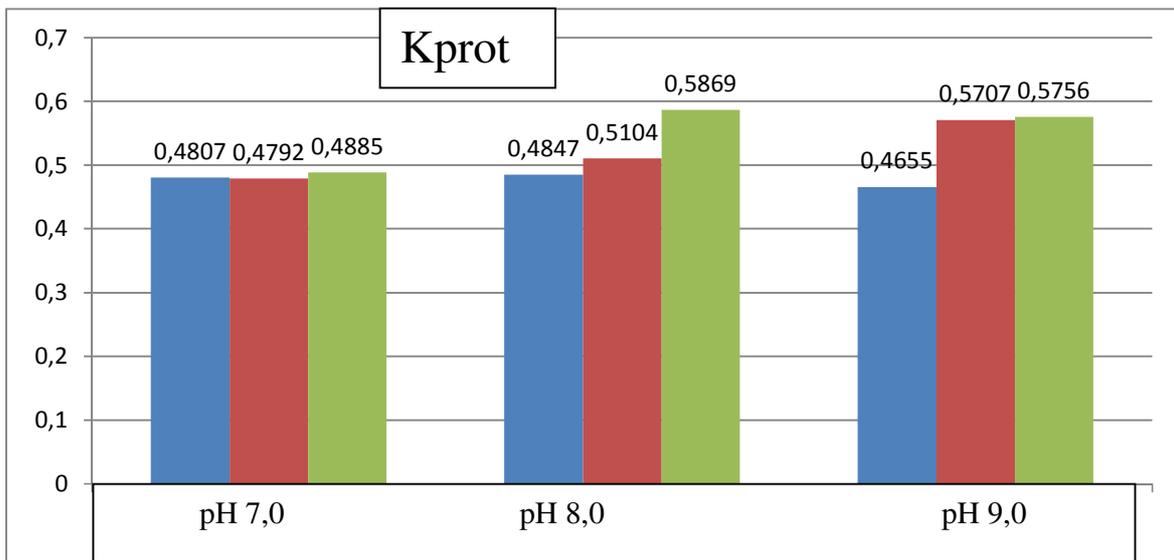
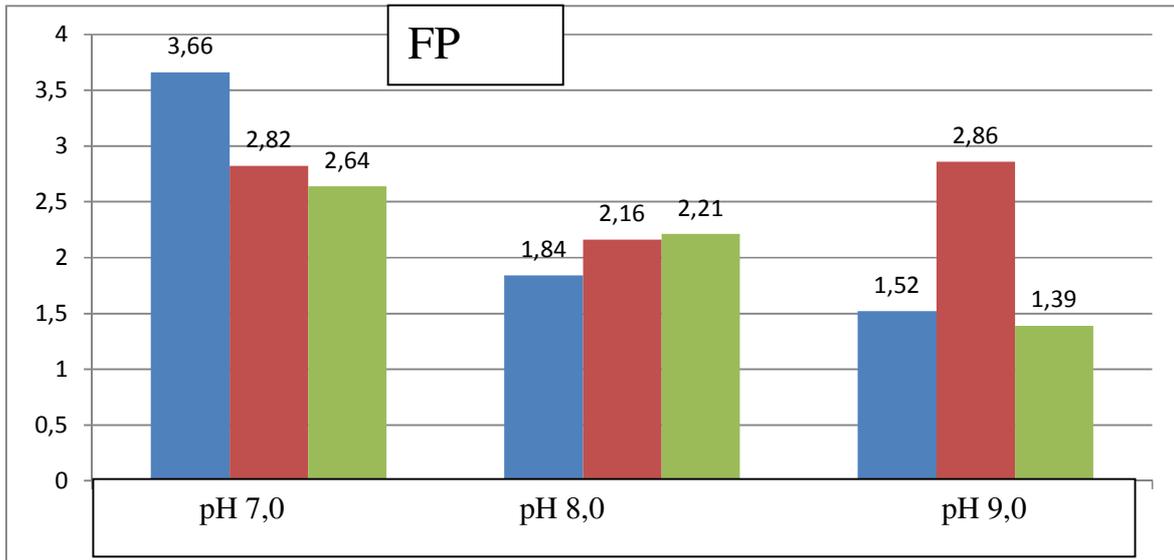


Gráfico 12. Gráfico comparativo dos valores para os fatores de purificação (FP) obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 6000/fosfato nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.



Analisando-se o fator de purificação da enzima derivada de ambas as variedades do curauá, observou-se que os melhores resultados foram demonstrados em sistemas com pH 7,0, independentemente da massa molecular do polímero utilizado.

Em relação à purificação da enzima bromelina derivada do curauá branco o sistema PEG 4000 - pH 7,0 (*tie-line* 3) apresentou o melhor resultado, com o valor para o fator de purificação de 4,53. Analisando-se o comportamento apresentado pelas três *tie lines* deste sistema, observa-se uma tendência de aumento da purificação à medida que a linha de amarração do sistema diminui. Todavia este comportamento não se apresentou como padrão nos demais sistemas analisados na purificação da enzima derivada do curauá branco. Os fatores de purificação obtidos pelo sistema PEG 4000 - pH 9,0 apresentaram tendência de aumento concomitantemente ao aumento na concentração dos componentes do sistema.

O sistema bifásico aquoso que apresentou melhor resultado na purificação da enzima bromelina derivada do curauá, variedade roxa, foi o sistema PEG 6000 - pH 7,0 (*tie line* 1), com o valor para o fator de purificação de 3,66. Analisando-se o comportamento das três *tie lines* deste sistema, observa-se uma tendência de aumento dos fatores de purificação à medida que se aumenta o comprimento das linhas de amarração. A mesma tendência foi observada no sistema PEG 4000 - pH 7,0. Entretanto os sistemas PEG 4000 - pH 8,0 e PEG 6000 - pH 8,0 mostraram comportamento inverso; maiores valores referentes aos fatores de purificação em concentrações menores dos componentes dos sistemas.

De modo geral, em sistemas com PEG 4000 e 6000, em todos os valores de pH e em todas as *tie lines* analisadas, observou-se que a partição das proteínas totais, ocorreu preferencialmente na fase salina.

Em relação à partição das proteínas totais a partir da amostra derivada do curauá branco, observou-se nos sistemas PEG 4000 - pH 9,0 e PEG 6000 - pH 7,0 e pH 9,0, que a diminuição da linha de amarração foi seguida por um aumento da partição das proteínas totais na fase polimérica.

Os sistemas PEG 4000 - pH 8,0 e 9,0 e PEG 6000 - pH 8,0 e 9,0, apresentaram aumento da partição das proteínas totais derivadas do curauá roxo na fase leve, à medida que procedeu-se a diminuição de suas linhas de amarração.

Em relação à partição da enzima bromelina derivada do curauá variedade branca, não se observou um padrão em relação às concentrações dos componentes do sistema e dos valores de pH. No entanto para o sistema PEG 6000 pH 9,0, a diminuição da linha de amarração foi seguida pelo aumento da partição enzimática na fase rica em PEG.

Para a bromelina derivada do curauá roxo, observou-se no sistema PEG 4000 - pH 7,0, uma tendência de aumento de sua partição na fase leve com o aumento do comprimento da linha de amarração do sistema bifásico aquoso. Tendência que se apresenta de acordo com outros estudos de partição de biomoléculas, tais como: partição do citocromo b5 em sistemas PEG/sais de fosfato (SARMENTO *et al.*, 1994) e partição do ácido clavulânico (VIDEIRA, 1994) que demonstraram também um aumento do coeficiente de partição com o aumento do comprimento da “tie-line”.

Este comportamento está de acordo com resultados obtidos para soluções individuais de polietilenoglicol e de fosfatos que demonstraram que o aumento do comprimento da “tie-line” promove um aumento de concentração de fosfatos na fase rica em sal, enquanto que na fase rica em polietilenoglicol esta permanece relativamente constante e igual ao seu limite de solubilidade em soluções daquele polímero. Proporcionando na prática, o processo de “salting-out” das proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG e conseqüentemente num aumento do coeficiente de partição até que os limites de solubilidade das proteínas na fase rica em sal, motivada pelo aumento da concentração de fosfatos, dá origem à transferência daquelas para a fase rica em polímero. O coeficiente de partição de proteínas é então um parâmetro que depende das suas solubilidades relativas em cada uma das fases.

O coeficiente de partição da bromelina derivada do curauá roxo, apresentou tendência de crescimento com a diminuição do comprimento da linha da amarração nos sistemas PEG 4000 - pH 8,0 e PEG 6000 - pH 8,0.

Observou-se também, principalmente na análise da bromelina derivada do curauá branco, uma tendência de partição na fase pesada, na maioria das “tie-lines”. A

ocorrência de turbidez na fase leve, indicando a presença de outras substâncias, possivelmente corantes naturais, com maior tendência a fase superior, mostra-se de acordo com o descrito em recentes estudos acerca da purificação da bromelina derivada do abacaxi, através de sistemas bifásicos aquosos PEG/sal (FERREIRA, 2007)

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 – CONCLUSÕES

Determinou-se os valores de pH e temperaturas ótimos da bromelina das folhas do curauá e os parâmetros cinéticos da enzima derivada da variedade branca. Informações importantes na estratégia de purificação da enzima de modo a garantir a sua estabilidade, evitando a perda de atividade devido à exposição a temperaturas e valores de pH agressivos.

Obteve-se para a bromelina derivada do curauá branco e roxo o valor de pH ótimo em 8,5, onde ambas as variedades apresentaram o máximo de atividade.

Observou-se que a temperatura ótima para a bromelina derivada do curauá branco foi 30°C, enquanto que a enzima da variedade roxa apresentou o máximo de atividade nas 10, 20 e 35°C.

Obteve-se de acordo com o modelo linearizado da equação de Lineweaver-Burk, os seguintes parâmetros cinéticos da bromelina derivada da folha do curauá branco; valor da constante K_m foi 0,003636364 micromol/mL e o valor de $V_{m\acute{a}x}$ que foi 0,004914005 micromol de BSA/mL.min.

De modo geral, observou-se nos sistemas com PEG 4000 e 6000, em todos os valores de pH analisados e em todas as *tie lines*, que a partição das proteínas totais, ocorreu preferencialmente na fase salina.

Analisando-se o fator de purificação da enzima bromelina derivada de ambas as variedades do curauá, observou-se que os melhores resultados foram demonstrados em sistemas com pH 7,0, independentemente da massa molecular do polímero utilizado.

Observou-se que a purificação da enzima bromelina derivada do curauá branco apresentou melhor resultado no sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato - pH 7,0. Enquanto que a purificação da enzima bromelina derivada do curauá, variedade roxa, mostrou-se mais eficiente no sistema PEG 6000/fosfato - pH 7,0.

5.2 – Sugestões

Determinação do ponto isoelétrico da enzima derivada da folhas de curauá, utilização de método cromatográfico de purificação na variedade roxa, afim de verificar a ocorrência de mais de uma enzima proteolítica.

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, N. L.; BLANKSCHTEIN, D.; HATTON, T. A. On protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. *Bioseparation*, 1, p. 191–225, 1990.

ALBERTSSON, P. Å. Chromatography and partition of cells and cell fragments. *Nature (Lond.)*, 177, p. 771–774, 1956.

ALBERTSSON, P. Å. Particle fractionation in liquid two-phase systems. The composition of some phase systems and the behavior of some model particles in them. Application to the isolation of cell walls for microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 27, p. 378–395, 1958.

ALBERTSSON, P. Å. Partition of proteins in liquid polymer–polymer two-phase systems. *Nature (Lond.)*, 182, p. 709–711, 1958.

ALBERTSSON, P. Å. Nyns, E. J. Counter-current distribution of proteins in aqueous polymer phase systems. *Nature (Lond.)*, 184, p. 1465–1468, 1959.

ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules, John Wiley, 2ª edição, 1971.

ALBERTSSON, P.A. Partition of cell particles and macromolecules, John Wiley, 3ª edição, 1986.

ALBERTSSON, P.A.; TJERNELD, F. Phase diagrams. *Methods in enzymology*, v. 228, p.3-13, 1994.

ARAUZ, J. F. S. Estudo comparativo dos antiinflamatórios de origem vegetal (bromelina, escina e papaína) em cirurgia. Dissertação de mestrado. Faculdade de odontologia de piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba, 1982.

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

ASENJO, J. A. New separation processes in biotechnology, Proc. *6th European Cong. Biotechnol.*, Alberghina, L., Frontali, L. and Sensi, P. (eds.), Elsevier, Amsterdam., 1993.

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

ASENJO, J.A. Industrial prospects of aqueous two-phase processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 59, p.109, 1994.

BALDINI, V. L. S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E. A. H; SALES, A. M.; RAETTA, I. S.; GIACOMELLI, E. J. Ocorrência da bromelina e cultivares do abacaxizeiro. *Colet. Ital*, v. 23, n. 1, 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: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. *Partitioning in aqueous two phase systems*. Orlando, Academic Press, 1985.

BASKIR, J. N.; HATTON, T. A.; SUTER, U. W. Protein partitioning in two phase aqueous polymer systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, p. 541–558, 1989.

BELÉM, S. A. Fibras da Amazônia. *Revista Agroamazônia*, ano 1, v. 8, p. 47 – 49, out., 2002.

BELTER P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. S. Bioseparations: downstream processing for biotechnology. Minneapolis, John Wiley & Sons, 1988.

BHELLA, R. S.; ALTOSAAR, I. Purification and some properties of the extra-cellular alpha-amylase from *Aspergillus awamori* - an excellent source for commercial production, *Can. J. Microbiol.*, 31, p. 149-153, 1985.

BODI, B. The effect of oral bromelians on tissue permeability to antibiotics and pain response to bradykinin: double-blind studies on human subjects. *Clinical medicine*, 73(8): p. 61-63, 1966.

BORRACINI, H. M. P. Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2006.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia industrial, v. 1, 1ª edição. São Paulo – SP, editora Edgar Blücher LTDA, p. 154–170, 2001.

BRADFORD, M. M.; *Analytical. Biochem.*, 72, p. 248, 1976.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Reversed micelles in liquid-liquid extraction. in: KENNEDY, J. F., CABRAL, J. M. S. *Recovery processes for biological materials*. Chichester: John Wiley & Sons, p. 247-271, 1993.

CARTWRIGHT, S.J.; WALEY, S.G. *Biochem J*, 221:505, 1984.

CASCONE, O.; ANDREWS, B.A.; ANSEJA, J.A. Partitioning and purification ofthaumatin in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microbiology and Tecnology*, v.13, p. 629-635, 1991.

CÉSAR, A. C. W. Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2000.

CÉSAR, A. C. W. Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2005.

CHARBONNIER, L.; MOSSE, J. Large scale isolation of gliadin fractions, *J. Sci. Food Agric.*, 31, p. 54-61, 1980.

COIMBRA, J. S. R. Desempenho de um extrator tipo grasser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.

COLE, K. D. Preparation of plasmid and high molecular weight DNA by the use of salt-polymer two-phase extraction. *Biotechniques*, 11, p. 18–24, 1991.

COMTE, M.; MALNOE, A. Cox, J.A., *Biochem J*, 240:567, 1986.

CORDEIRO, I. C.; SILVA, I. M. Avaliação econômico-financeira da cultura de curauá (*Ananas comosus var. erectifolius* (L. B. SMITH) Coppus & Leal: um estudo de caso no município de Santo Antônio do Tauá, estado do Pará. *XLVI Congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural*. Rio branco – Acre, 2008.

DAVIS, R.B.; ABRAHAM, E.P.; MELLING, J. *Biochem J*, 143:115, 1974.

DE-GIULI, M.; PIROTTA, F. Bromelain: interaction with some protease inhibitors and rabbit specific antiserum. *Drugs Exp Clin Res.*, 4, p. 21-23, 1978.

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. Bioquímica - Aulas Práticas, 6ª edição, editora: UFPR, Curitiba, 2005.

DIAMOND, A.D.; HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation, in: advances in biochemical engineering biotechnology, Managing Springer- Verlag Berling Heidelberg, v.47, p. 90-134, 1992.

DIAMOND, A .D.; HSU, J.T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. *Advances in biochemistry engineering*, v. 47, p. 89-135, 1992.

EITEMAN, M.A. Temperature-dependent phase inversion and its effect on partitioning in the poly(ethylene glycol) ammonium sulphate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography, A*, v. 668, p. 13-19, 1994.

ENFORS, S.-O.; KÖHLER, K.; VEIDE, A. Combined use of extraction and genetic engineering for protein purification: recovery of galactosidase fused proteins. *Bioseparation*, 1, p. 305–310, 1990.

FERREIRA, J. F. Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2007.

FISHER, M.N.; NEWSHOLME, E.A. *Biochem J*, 221:521, 1984.

FLORY, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, Ithaca, NY, 1953.

FLYGARE, S., WIKSTRÖM, P., JOHANSSON, G., and LARSSON, P.-O., Magnetic aqueous two-phase separation in preparative applications. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, p. 95–103, 1990.

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.

FORCINITI, D.; HALL, C. K.; KULA, M. R. Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in ATPS. *Fluid Phase Equilibria*, v. 61, p.243-262, 1991.

FRANCO, T. T. Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity and charge. Tese de Doutorado. Faculty of Agriculture and Food, University of Reading, 1992.

FREDERICK J. D. Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications Mill Road, Park Ridge, New Jersey, 1989.

FREIMAN, L. O. Os avanços do uso da bromelina na área de alimentação e saúde. *Revista Alimento e Nutrição*, São Paulo, v.12, p.215-226, 2001.

FREJ, A. K.; GUSTAFSSON, J. G.; HEDMAN, P. Recovery of β -galactosidase by adsorption from unclarified *Escherichia coli* homogenate. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, p. 133–138, 1986.

FROLLINI, E.; LEÃO, A. L.; MATTOSO, L. H. S. Natural Polymers and Agrofibers Composites, pp. 257 – 272, Botucatu, Brasil, USP e UNESP, 2000.

FUJIHASHI, G. A.; BARBOSA, W. L. R. *Ananas erectifolius* (curauá): padronização dos extratos, frações e do material vegetal. *Revista Científica da UFPA*, v.3, p.1-6, março, 2002.

GERARD, G. Anti-cancer therapy with bromelain. *Agress*; 3, p. 261-274, 1972.

GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Separation processes in the food and biotechnology industries – Principles and applications. Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, England, 1996.

GREVE, A.; KULA, M.-R. Cost structure and estimation for the recycling of salt in a protein extraction process. *Bioproc. Eng.*, 6, p. 173–177, 1991.

GREVE, A.; KULA, M.R. Recycling of salts in partition protein extraction processes. *Journal of Chemical Tecnology and Biotechnology*, v. 50, p. 27-42, 1991.

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

GUEGUEN, J.; VU, A. T.; SCHAEFFER, F. Large scale purification and fractionation of pea globulins, *J. Sci. Food Agric.*, 35, p. 1024-1033, 1984.

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

HARRACH, T.; ECKERT, K.; SCHULZE-FORSTER, K.; NUCK, R.; GRUNOW, D.; MAURER, H.R. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *J. Protein Chem.*, 14, p.41-52, 1995.

HARRIS, J. M. *Poly(ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, ed Plenum, NY, 1992.

HEINICKE, R. M.; VAN DER WAL, L.; YOKOYAMA, M. Effect of bromelian (Ananase) on human platelet aggregation. *Experientia*, 28(7), p. 844-845, 1972.

HORTON, H. R.; MORAN, L. A.; OCHS, R. S.; RAWN, J. D.; SCRIMGEOUR, K.G. *Principles of Biochemistry (Third Edition)*. Prentice-Hall/Pearson Education, Upper Saddle River, NJ, USA, p. 862, 2002.

HUDDLESTON, J.; VEIDE, A.; KÖHLER, K.; FLANAGAN, J.; ENFORS, S. O.; LYDDIAT, A. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. *Trends Biotechnol.*, 9, p. 381–388, 1991.

HUDDLESTON, J. G.; WILLAUER, H. D.; BOAZ, K. R.; ROGERS, R. D. Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins. *J. Chromatogr.* B711, 237–244, 1998.

HUSTEDT, H.; KRONER, K. H.; MENGE, U.; KULA, M. R. Protein recovery using two-phase systems. *Trends Biotechnol.*, 3, p. 139-144, 1985.

HUSTEDT, H.; KRONER, K. H.; PAPAMICHAEL, N. Continuous crosscurrent aqueous two phase extraction from biomass-automated recovery in production scale. *Process Biochemistry*, 23, p. 129-137, 1988.

JEUNG A.; FOSTER, S. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics. New York, NY: John Wiley & Sons, p. 688, 1980.

JOHANSSON, G. Partitioning procedures and techniques: cells, organelles and membranes. *Methods in Enzymology*, v.228, p. 42-63, 1994.

JONES, D. T. A versatile continuous ion-exchange process. In: Birch, G. G.; Parker, K. J.; Worgan, J. T. (eds.), *Food From Waste, Applied Science, Barking*, p. 242- 255, 1876.

JORDAN, P.; VILTER, H. Extraction of proteins from materials rich in anionic mucilages: partition and fractionation of vanadate-dependent bromoperoxidases from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. saccharina* in aqueous polymer two-phase systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1073, p. 98–106, 1991.

KATO, Y.; KOMIYA, K.; HISHIMOTO, T. *J Chromatogr*, 246(1), 13, 1982.

KELLEY, J. J.; WANG, G. Y.; WANG, H. Y. Separation, Recovery and Purification in Biotechnology, (Asenjo, J.A., Hong, J., eds.) *American Chemical Society, Washington, D.C.*, p. 193, 1986.

KELLY, P. M. Effect of ion-exchange removal of whey protein on the heat stability of skim milk. *J. Food Sci. Technol.*, 6, p. 91-96, 1982.

KHAN, R. H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S. K.; J. BIOSCI. Effect of pH, Temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain bromelain enzymes, 28, p. 709-714, 2003.

KIELING, D. Enzimas, aspectos gerais, Departamento de engenharia química e engenharia de alimentos, UFSC, Florianópolis, 2002.

KO, Y. H.; KANG, Y. J. Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju Island, 31, p. 137-142, 1990.

KOMATSU, K.; SAIJO, A.; HANEDA, K.; U.S. Patent No. 3,730,836, 1973.

KRONER, K. H.; HUSTEDT, H.; KULA, M. R. Extractive enzyme recovery: economic considerations. *Proc. Biochem. Eng.*, Berlin, v. 24., p. 73-118, 1992.

KULA, M. R.; KRONER, K. H.; HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *In Advances in Biochemical Engineering*, Vol 24, A. Fiechter (ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 73-118, 1982.

KULA, M. R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation*, 1, p. 181–189, 1990.

LAMEIRA, O. A.; REIS, I. N. R.; CORDEIRO, I. M. C. C. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, jan/jun, p.78-81, 2003.

LAMEIRA, O. A.; MONFORT, L. E. F.; MENESES, A. A. S. Efeito do ácido giberélico sobre o desenvolvimento in vitro de gemas de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith). *In: 46 Congresso Brasileiro de Olericultura*, Goiânia. Horticultura Brasileira. Brasília : Associação Brasileira de Horticultura, v. 24.. p. 2605-2608, 2006.

LEÃO, A. L.; TAN, I. H.; CRASCHI, J.C. Curaua fiber – A tropical natural fibers from Amazon - Potential and Application in Composites. *International Conference on Advanced Composites*, p. 557–564, Hurgada, Egito, 1998.

LEDO, I. A. O cultivo do curauá no lago grande de Franca. Belém: Banco da Amazônia S/A – BASA, p. 23, 1967.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 4ª edição. São Paulo-SP, Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2007.

LEWIS, M. J. Ultrafiltration of proteins. In *Developments in Food Proteins*, Vol. 1, Hudson, B. J. F. (ed.), *Applied Science Publishers*, London, p. 91-130, 1982.

LING, T. G. I.; MATTIASSON, B. A general study of the binding and separation in partition affinity ligand assay. Immunoassay of microglobulin. *J. Immunol. Methods.*, 59, p. 327–337, 1983.

LIVIO, M. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet aggregation in the rat - A preliminary report. *Drugs Expt Clin Res.*, 4, p. 49-53, 1978.

LOPES, F. L. G. Recuperação da bromelina do *Ananas comosus* (L. Merrill), utilizando processo de separação por membrana, Tese Doutorado, Unicamp, 2005.

MARSHALL, J. J. U.S. Patent No. 4,318,927. March 9, 1982.

MARTIN, G. J.; EHRENREICH, M. A.; ASBELL, N. Bromelian. Pineapple protease with anti-edema-activity. *Exp. Med. Surg.*, 20, p. 227-247, 1962.

MATTIASSON, B.; LING, T. G. I. Extraction in aqueous systems for biotechnology. *Biochemistry and Biotechnology*, p. 270-292, 1987.

MATTIASSON, B. Applications of aqueous two-phase systems in biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 1, p. 16–20, 1983.

MATTOS, P. E. O. Validação Clínica da Suplementação de Bromelina para Atletas, Projeto de Pesquisa, Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular, UNIFESP, São Paulo, 2005.

MAZZOLA, P. G.; LOPES, A. M.; HASMANN, F. A.; JOZALA, A. F.; PENNA, T. C., MAGALHAES, P. O.; RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA, A. Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, p.143–157, 2008.

MCGREGOR, W. C. Selection and use of ultrafiltration membranes. *In Membrane Separations in Biotechnology*, McGregor, W. C. (ed.), Marcel Dekker, New York, p. 1-35, 1986.

MINAMI, N. M. Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação da Amiloglicosidase. Dissertação de Mestrado, USP - São Paulo, p. 190, 1997.

MORITA, A. H.; UCHIDA, D. A.; TAUSSIG, S. J. Chromatographic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain. *Arch Inter Phar Ther.*, 239, p.340-350, 1979.

MORITA, T. ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes. Padronização-preparação-purificação. 2.ed., São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 276, 1995.

MORRIS, J. G. Cinética de reações catalisadas por enzimas. in: físico-química para biólogos. 1ª ed., São Paulo-SP: ed. Polígono, Edu sp, p. 323 – 367, 1972.

MOSS, J. N.; FRAZIER, C. V.; MARTIN. G. J. Bromelains, the pharmacology of the enzymes. *Arch Int Pharmacodyn*; p. 145-168, 1963.

MOTHÉ, C. G. Uso de programa computacional aliado às técnicas de análise térmica para determinação de parâmetros cinéticos de compósitos de PU/fibra de curauá. *Revista analytica*. N° 04, 2003.

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

NEUBAUER, R. A. A plant protease for potentiation and possible replacement of antibiotics. *Exp. Med. Surg.* 19: p. 143-160, 1961.

NG-KWAI-HANG, K. F.; PELISSIER, J. P. Rapid separation of bovine caseins by mass ion-exchange chromatography. *J. Dairy Res.*, 56, p. 391-397, 1989.

NGUYEN, A. L.; GROTHE, S.; LUONG, J. Applications of pullulan in aqueous two-phase systems for enzyme production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2, p. 341-346, 1988.

NIEPER, H. A., A program for the treatment of cancer. *Krebs*, 6, p. 124-127, 1974.

OLIVEIRA, J.; ALMEIDA, S. S.; VILHENA-POTYGUARA, R.; LOBATO, L. C. B. Espécies vegetais produtoras de fibras utilizadas por comunidades Amazônicas. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica, v. 7, n. 2, p. 393-428, 1991.
 PALMER, D. E. High purity protein recovery. *Process Biochemistry*, 12, p. 24-28, 1977.

PAPAMICHAEL, N.; BOERNER, B. E., HUSTED, H. Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated and recycling of process chemicals, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 54, 1992.

PARKINSON, T. L. Effect of pasteurisation on the chemical composition of liquid whole egg. I. Development of a scheme for the fractionation of the proteins of whole egg, *J. Sei. Food Agric.*, 18, p. 208-213, 1967.

PATHAK, S. P.; SUDSHA.; 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.

PATRICKIOS, C.; ABBOTT, N. L.; FOSS, R.; HATTON, T. A. Synthetic polyampholytes for protein partitioning in two phase polymer systems. *AIChE Symp. Ser.*, 88, p. 80-88, 1992.

PETER, H. W.; AHLERS, J.; MOREIRA, R. A. Cinética Enzimática. 1ª ed., Fortaleza – CE: EDUFC, p. 12-21, 1987.

PORTER, J. E.; LADISH, M. R.; HERRMANN, K. M. Ion exchange and affinity chromatography in the scale up of the purification of β -galactosidase from soybean seeds, *Biotechnol, Bioeng.*, 37, p. 356-363, 1991.

PORTO, A. L. F. Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos. Tese de Doutorado, Campinas, UNICAMP, 1998.

RABELO, A. P. B. Estudo e desenvolvimento de uma micro-coluna de campânulas pulsantes para a purificação de proteína. Tese de doutorado da Faculdade Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

RACINE, L. M. Enzimas em formulações tópicas: bromelina e papaína, 2004.

RAJNI H. K. Aqueous Two-Phase Systems Methods and Protocols, *Methods in biotechnology*, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 1999.

RAMEHNEIER, R. A.; TERSTAPPEN, G. C.; KULA, M. R. The partitioning of cholesterol oxidase in Triton X-114-based aqueous two-phase systems. *Bioseparation*, 2, p. 315-324, 1991.

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

REGNIER, F. E. High Perform Liq. Chromatogr Proteins Pept. Proc. Int Svmp. 1st 1981, *Academic Publications*, New York, NY, 1983.

RICARDO, C. P.; TEIXEIRA, A. Enzimas. 4^a ed., Lisboa: Plátano editora S.A., 1993.

ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, v.266, n.3, p. 869-75, 1990.

SANCHEZ-FERRER, A.; BRU, R.; GARCIA-CARMONA, F. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol.*, 91, p. 1481–1487, 1989.

SANTANA J. C. C. Caracterização e recuperação das enzimas α e β - amilases por sistema de adsorção em leite expandido. Tese de doutorado, UNICAMP, 2006.

SANTOS, S. A. Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro *Ananas comosus* (L) Merr. CV. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração. Dissertação de Mestrado pela Ciências de Alimentos. Lavras: ESAL, p. 47, 1995.

SARMENTO, M. J.; PIRES, M. J.; CABRAL, J. M. S. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, v.668, p. 117-120, 1994.

SASAKI, I.; GOTOH, H.; YAMAMOTO, R. *J Biochem* (Tokvo), 86(5), 1537, 1979.

SASSENFELD, H. M.; BREWER, S.J. *Biotechnology*, 2 (1), 76, 1984.

SATYANARAYANA, B. L.; SULEBELE, G. A.; REGE, D. B. Use of ion exchange in the extraction of proteins from defatted groundnut and soya flours, *J. Sei. Food Agric.*, 32, 7, p. 17-722, 1981.

SCAWEN, M. D.; DARBYSHIRE, J. HARVEY, M.J., *et al.*, *Biochem J*, 203:699, 1982.

SCHMIDT, A. S.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 50, p. 617-626, 1996.

SCHUETTE, H.; HUMMEL, W.; TSAI, H.; KULA, M. R. L-leucine dehydrogenase production from *Bacillus cereus*: Production, large-scale purification and protein characterisation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, p. 306-317, 1985.

SEBASTIÃO, M. J.; CABRAL, M. S.; AIRES-BARROS, R. Partitioning of recombinant FUSARIUM SOLANI PISI cutinase in poly(ethylene) glycol aqueous salt solution two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 139-144, 1994.

SELTZER, A. P. Riduzione dell'edema post-operatorio e dell'equimosi per mezzo di un enzima orale (bromelina). *Min. Med.*, 55(98), p. 3958-3960, 1964.

SIKDAR, S. K.; COLE, K. D.; STEWART, R. M.; SZLAG, D. C.; TODD, P.; CABEZAS, H. Jr. Aqueous two-phase extractions in bioseparations: an assessment. *Bio/Technol.* 9, p. 253–256, 1991.

STRÖM, G. B.; MÄLARSTIG, B.; and BLOMQUIST, G. Purification of water-based cutting fluids. *Methods Enzymol.*, 228, p. 672–678, 1994.

TAUSSIG, S. J.; NIEPER, H. A. Bromelain: its use in prevention and treatment of cardiovascular disease, present status. *J IAPM.* 6, p. 139-151, 1979.

TAUSSIG, S. J.; BATKIN, S. Bromelian, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *J Ethnopharmacol.*, 22, p. 191-203, 1988.

THOMAS, R. L.; CORDLE, C. T. CRISWELLI, L. G.; WESTFALL, F. H.; BAREFOOT, S. F. Selective enrichment of proteins using formed-in-place membranes, *J. Food Sci.*, 57, p. 1002- 1005, 1992.

TINOZZI, S.; VENEGONI, A. Effect of bromelain on serum and tissue levels of amoxicillin. *Drugs Expt Clin Res*, 4, p. 39-44, 1978.

TJERNELD, F.; BERNER, S.; CAJARVILLE, A.; JOHANSSON, G. New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification. *Enzima Microb. Technol.*, 8, p. 417–423, 1986.

UHLIG, G.; SEIFERT, D. The effect of proteolytic enzymes (traumanase) on posttraumatic edema. *Fortschr Med.*, 99, p.554-556, 1981.

VAN BERLO, M.; LUYBEN, K. Ch. A. M.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Poly(ethylene) glycol-salt aqueous two-phase systems with easily recyclable volatile salts. *J. Chromatogr.*, B711, p. 61–68, 1998.

VEIDE, A.; LINDBACK, T.; ENFORS, S. O. Recovery of galactosidase from a poly(ethylene) glycol solution by diafiltration. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 744–751, 1989.

VELLINI, M.; DESIDERI, D.; MILANESE, A. Possible involvement of eicosanoids in the pharmacological action of bromelain. *Arzneimittelforschung*, 36, p. 110-112, 1986.

VERNAU, J.; KULA, M. R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous polyethylene glycol-citrate phase systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12, p. 397–404, 1990.

VIDEIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of poly(ethylene) glycol and potassium phosphate. *Journal of Chromatography A*, v.668, p. 237-240, 1994.

WALTER, H.; BROOKS, D. E.; FISHER, D. (eds.) Partition in Aqueous Two-Phase Systems. Theory, Methods, *Uses and Applications to Biotechnology*. Academic, Orlando, FL., 1985.

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

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

WALTER, H.; JOHANSSON, G. (eds.), Methods in Enzymology: Aqueous Two-Phase Systems. Academic, San Diego, CA, 1994.

WHITE, R. R. Bioavailability of ¹²⁵I bromelain after oral administration to rats. *Biopharm Drug Dispos.*, 9, p. 397-403, 1988.

WICKERHAUSER, M.; WILLIAMS, C.; MERCER, J.; VOX Sang. 36:281, 1979.

YANG, W. Y.; LIN; C. D.; CHU, I.; LEE, C. J. Extration 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.