



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

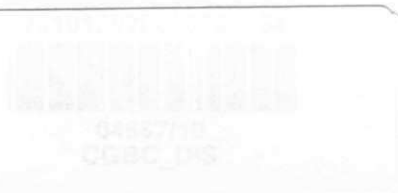
**RECUPERAÇÃO DE POLIGALACTURONASES PRODUZIDAS PELA
FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DO RESÍDUO AGRÍCOLA DO MARACUJÁ
AMARELO EMPREGANDO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO.**

CARLOS ALBERTO BISPO DE SOUSA

Campina Grande

Setembro 2010

DIV
3-190431
542510



**RECUPERAÇÃO DE POLIGALACTURONASES PRODUZIDAS PELA
FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DO RESÍDUO AGRÍCOLA DO MARACUJÁ
AMARELO EMPREGANDO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO.**

CARLOS ALBERTO BISPO DE SOUSA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química do Centro de
Ciências e Tecnologia da
Universidade Federal de Campina
Grande, em cumprimento às
exigências para obtenção do grau
de Mestre.

Área de Concentração: Operações e Processos

Orientadora: Prof.^a Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Campina Grande

Setembro 2010



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

S725r Sousa, Carlos Alberto Bispo de.
Recuperação de poligalacturonases produzidas pela fermentação
semi-sólida do resíduo agrícola do maracujá amarelo empregando
sistema aquoso bifásico / Carlos Alberto Bispo de Sousa. — Campina
Grande, 2010.
97f. : il. col.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
Referências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Líbia de Sousa Conrado Oliveira.

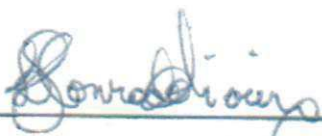
1. Produção de Enzimas. 2. Fermentação Semi-Sólida. 3.
Recuperação de Enzimas. 4. Sistema Aquoso Bifásico. 5.
Poligalacturonases. I. Título.

CDU – 663.15(043)

**RECUPERAÇÃO DE POLIGALACTURONASES PRODUZIDAS PELA
FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DO RESÍDUO AGRÍCOLA DO MARACUJÁ
AMARELO EMPREGANDO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO.**

Dissertação aprovada em 09 de setembro de 2010

BANCA EXAMINADORA



Profª Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira
Orientadora – (CCT/UFCG)



Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos
Examinador Externo– (PPGEQ/NT/UFRN)



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Examinador Externo– (PPGEP/CCT/UFCG)



Profª Dra Mércia Melo de Almeida
Examinadora Externa – (CCTA/UFCG)

Campina Grande - PB

Setembro 2010

“Aos meus pais, Genésio e Terezinha”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que fizeram parte do meu dia-a-dia em mais essa etapa da minha vida acadêmica. Inicialmente aos colegas do LEB e do grupo de pesquisa, como Bia, Sckymann, Paloma, Ezenildo, Siunara, Ângela, Israel, Liége e tantos outros que comigo colaboraram com sua experiência, apoio e companheirismo.

À minha orientadora Lúbia de Sousa Conrado, pelos seus ensinamentos, amizade, orientação e, principalmente, por ter confiado e incentivado meu crescimento profissional e pessoal durante a fase do mestrado.

Aos professores: Flávio, Mércia e Nagel, cujos ensinamentos práticos, apoio e atenção contribuíram para uma melhor condução desse trabalho de pesquisa.

Ao professor Marcus Vinícius do DEMA, que gentilmente forneceu-nos o polietilenoglicol.

Ao técnico administrativo Jardes Caiçara e demais funcionários da UAEQ.

Às pessoas que, embora não estiveram envolvidas com este trabalho, jamais deixarão de fazer parte das minhas conquistas pessoais, como os meus familiares e colegas do curso de química a exemplo de Josedite Saraiva e o professor José Raimundo Sobrinho.

À minha querida esposa, Maria do Livramento.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e, por fim, agradeço ao Deus que creio, de onde emana toda a ciência, sabedoria e vida do Universo, sem o qual nada seria possível.

"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las."

Aristóteles

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar a recuperação de poligalacturonases obtidas através da fermentação semi-sólida da casca e albedo do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*), utilizando o microrganismo *Aspergillus niger* mutante CCT 0916 como agente fermentativo. A recuperação foi estudada em duas etapas: inicialmente determinou-se as melhores condições do processo de lixiviação das enzimas a partir do meio fermentado. Determinadas tais condições, estudou-se a recuperação das enzimas presentes no extrato obtido, utilizando-se SABs formados por PEG 10000 e tampão fosfato de potássio. O estudo da lixiviação foi realizado por meio de um planejamento experimental fatorial 2^3 , no qual as variáveis independentes foram: relação solvente/massa (RE), tempo de contato entre o solvente e o meio fermentado (TC) e a intensidade da agitação (AG) no processo extrativo. Em relação aos SABs, estes foram construídos com diferentes composições de PEG 10000, tampão fosfato e extrato e caracterizados quanto à composição das fases em equilíbrio. No estudo da lixiviação, extratos com maiores valores de atividade poligalacturonásica (APG) foram obtidos com RE de 10 mL de solvente por grama de substrato úmido, TC de 45 minutos e AG de 50 rpm, que resultaram em uma atividade máxima de 53,7 U/g, determinando-se uma condição adequada para esta etapa de recuperação. O parâmetro de maior influência nesse processo foi RE. Quanto à aplicação dos SABs, as poligalacturonases concentraram-se na fase rica em sal, que apresentou recuperação de 100% em todos os sistemas. Os melhores resultados foram obtidos para o SAB com comprimento de linha de amarração de 42,94%, que apresentou fator de purificação de 4,17 e atividade específica de 10,06 U/mg, podendo chegar a 7,48 e 18,05 U/mg respectivamente, caso as enzimas sejam adequadamente ativadas. A utilização de SABs na recuperação de poligalacturonases proporcionou alto rendimento e aumento de pureza em uma única etapa, sendo tal operação adequada para um processo de recuperação e purificação de enzimas.

Palavras-chave: produção de enzimas, fermentação semi-sólida, recuperação de enzimas, sistema aquoso bifásico, poligalacturonases.

ABSTRACT

This research was developed with the objective of to study the recovery of polygalacturonase enzymes obtained through of the solid state fermentation using as substrate the residue of passion fruit (*Passiflora edulis flavicarpa*) and as fermentation agent the filamentous fungus *Aspergillus niger* CCT 0916. The recovery was studied in two stages: initially it was determined the best conditions of the leaching process of enzymes from the fermented medium. Certain such conditions, it was studied the recovery of enzymes present in the extract obtained, using ATPS formed by PEG 10000 and potassium phosphate buffer. The study of the leaching was performed by a 2^3 factorial design in which the independent variables were: the solvent/mass of medium ratio (RE), contact time between the solvent and the fermented medium (TC) and intensity of agitation (AG) in the extraction procedure. In relation to ATPS, these were built with different compositions of PEG 10000, and phosphate buffer extract and characterized as to composition of the phases in equilibrium. In the study of leaching, extracts with higher polygalacturonase activity (APG) were obtained with RE of 10 mL of solvent per gram of wet substrate, TC = 45 minutes and AG = 50 rpm, which resulted in a maximum activity of 53.7 U/g, determining an appropriate condition for this stage of recovery. The parameter of major influence in this process was RE. Regarding application of the ATPS, the polygalacturonases focused on salt-rich phase, which showed 100% recovery on all systems. The best results were obtained for the ATPS with tie-line length of 42.94%, which showed purification factor of 4.17 and specific activity of 10.06 U/mg, reaching 7.48 and 18.05 U/mg respectively, if the enzymes are activated properly. The use of ATPS in recovering polygalacturonases provided high yields and increased purity in a single step, being such an operation proper for a process of recovery and purification of enzymes.

Keywords: enzyme production, solid state fermentation, recovery of enzymes, aqueous two phase system, polygalacturonase.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XIV
1 – INTRODUÇÃO	
1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 OBJETIVO GERAL.....	3
1.2.1 Objetivos Específicos.....	3
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 MARACUJÁ.....	6
2.1.2 Importância e características.....	6
2.2 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS.....	7
2.2.1 Classificação das substâncias pécticas.....	8
2.3 PECTINASES.....	9
2.3.1 Classificação das pectinases.....	9
2.3.2 Poligalacturonase.....	10
2.3.2.1 Endopoligalacturonase.....	11
2.3.3 Obtenção e importância das enzimas pécticas.....	13
2.3.4 <i>Aspergillus niger</i> como produtor de pectinases.....	14
2.3.5 Fermentação semi-sólida	15
2.4 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.....	16
2.4.1 Recuperação das enzimas obtidas por FSS.....	16
2.4.2 Fator de recuperação e purificação de proteínas.....	18
2.4.3 Problemática da recuperação de bioprodutos.....	19
2.4.4 Critérios para operação de extração em biotecnologia.....	19
2.5 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.....	20
2.5.1 Estudos envolvendo SABs.....	21
2.5.2 Diagramas de fases.....	23
2.5.3 Fatores que influenciam no sistema de fases.....	26
2.5.4 Considerações termodinâmicas da partição.....	27
2.5.5 Fatores que afetam a partição em SABs.....	30

2.5.5.1 Efeito da composição do polímero.....	30
2.5.5.2 Efeito da massa molar dos componentes.....	30
2.5.5.3 Efeito de aditivos de baixa massa molar.....	31
2.5.5.4 Efeito do pH.....	31
2.5.5.5 Efeito das características do soluto.....	32
2.5.5.6 Tempo de separação das fases.....	32
2.6 PEG E FOSFATO DE POTÁSSIO.....	33
2.6.1 Polietilenoglicol (PEG)	33
2.6.2 fosfato de potássio.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 TRATAMENTO DO RESÍDUO.....	36
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO SECO.....	37
3.2.1 Granulometria.....	37
3.2.2 Densidade aparente.....	37
3.2.3 Densidade real.....	38
3.2.4 Porosidade.....	38
3.2.5 pH.....	38
3.2.6 Cinzas.....	39
3.2.7 Umidade.....	39
3.2.8 Sólidos solúveis.....	39
3.2.9 Açúcares redutores.....	40
3.2.10 Açúcares totais.....	40
3.2.11 Pectina.....	41
3.3 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA FSS.....	41
3.3.1 Restabelecimento da umidade do meio.....	42
3.4 MICRORGANISMO E INÓCULO.....	42
3.5 PROCESSO FERMENTATIVO.....	43
3.5.1 Esterilização do meio.....	43
3.5.2 Obtenção da suspensão de esporos e quantificação.....	44
3.5.3 Inoculação do meio.....	45
3.6 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS.....	45
3.6.1 Planejamento experimental.....	46
3.6.2 Processo extrativo	47
3.6.3 Análise da atividade poligalacturonásica.....	47
3.7 SISTEMAS BIFÁSICOS.....	48

3.7.1	Preparação dos reagentes.....	49
3.7.2	Determinação dos diagramas de equilíbrio.....	49
3.7.2.1	Obtenção das curvas binodais.....	50
3.7.2.2	Preparação dos sistemas aquosos bifásicos.....	50
3.7.2.3	Coleta das fases.....	51
3.7.2.4	Densidade das fases.....	51
3.7.2.5	Determinação do volume das fases.....	52
3.7.2.6	Massa.....	52
3.7.2.7	Determinação do teor de água em cada fase.....	53
3.7.2.8	Determinação da concentração de sais.....	53
3.7.2.9	Determinação da concentração de PEG.....	53
3.7.2.10	Determinação do comprimento e inclinação das tie-lines.....	53
3.7.2.11	Avaliação da dispersão dos valores de composição dos SABs.....	54
3.7.2.12	Determinação da atividade poligalacturonásica em cada fase.....	54
3.7.2.13	Determinação de proteínas em cada fase.....	55
3.7.2.14	Determinação dos coeficientes de partição.....	56
3.7.2.15	Avaliação do processo de purificação.....	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO.....	60
4.2	PROCESSO FERMENTATIVO.....	63
4.2.1	Obtenção do extrato.....	64
4.2.2	Atividade poligalacturonásica.....	64
4.3	ANÁLISE DO PROCESSO EXTRATIVO UTILIZANDO A METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	67
4.3.1	Construção as superfícies de resposta	70
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIFÁSICOS.....	72
4.4.1	Diagramas de equilíbrio.....	72
4.4.2	Construção e caracterização dos SABs.....	73
4.4.3	Caracterização das fases dos SABs.....	75
4.4.4	Comprimentos e inclinações das linhas de amarração.....	77
4.4.5	Avaliação dos parâmetros da partição.....	79
4.4.6	Considerações à respeito da atividade enzimática nos SABs.....	83
5.	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Endopoligalacturonases provenientes de várias fontes.....	12
Tabela 2.2. Aplicações dos SABs.....	22
Tabela 3.1. Matriz de planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central..	46
Tabela 3.2. Valores utilizados nos ensaios para cada nível do planejamento.....	47
Tabela 4.1. Valores obtidos para os parâmetros analisados no resíduo seco.....	60
Tabela 4.2. Valores de atividade obtidos em cada ensaio.....	65
Tabela 4.3. Aumento obtido na atividade dos extratos em cada ensaio.....	66
Tabela 4.4. Modelo de regressão.....	67
Tabela 4.5. Análise de variância ANOVA para APG.....	69
Tabela 4.6. Composição dos SABs construídos para os ensaios de partição.....	74
Tabela 4.7. Composição, volume e massa das fases de cada SAB.....	76
Tabela 4.8. Comprimentos e inclinações das linhas de amarração.....	77
Tabela 4.9. Atividade enzimática, atividade específica e fator de purificação.....	80
Tabela 4.10. Coeficientes de partição e recuperação nas fases.....	82
Tabela 4.11. Parâmetros da partição considerando-se a recuperação de 100% das unidades de atividade, presentes no extrato, na fase inferior dos SABs.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>	05
Figura 2.2. Estrutura da molécula de pectina	08
Figura 2.3. Forma de atuação das exo-PG e endo-PG.....	10
Figura 2.4. Estabilidade da poligalacturonase frente às variações de pH.....	11
Figura 2.5. Endopoligalacturonase II produzida por <i>aspergillus niger</i>	13
Figura 2.6. <i>Aspergillus niger</i>	15
Figura 2.7. Diagrama de fases ternário.....	23
Figura 2.8. Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.....	24
Figura 3.1. Esquema do secador de leito fixo.....	36
Figura 4.1. Resíduo seco do maracujá.....	60
Figura 4.2. Distribuição granulométrica do resíduo de maracujá seco.....	62
Figura 4.3. Aspecto do meio fermentado no interior do erlenmeyer após 66 h.....	64
Figura 4.4. APG em função dos demais parâmetros estudados.....	66
Figura 4.5. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos estimados.....	68
Figura 4.6. Valores observados X valores preditos.....	69
Figura 4.7. Influência do tempo (TC) e agitação (AG) na atividade.....	70
Figura 4.8. Influência da relação (RE) e agitação (AG) na atividade.....	71
Figura 4.9. Influência da relação (RE) e tempo (TC) na atividade.....	71
Figura 4.10. Curvas de equilíbrio de sistemas com e sem extrato.....	72
Figura 4.11. SAB após total separação das fases.....	75
Figura 4.12. Diagrama de equilíbrio com as linhas de amarração.....	78
Figura 4.13. Diagrama de equilíbrio ternário	79

SIGLAS E ABREVIATURAS

AG – Grau de agitação do meio

APG – Atividade poligalacturonásica

AS – Atividade específica

CLA – Comprimento da linha de amarração

Da – Dalton, unidade de massa molecular de proteínas

$\Delta_r G$ - Variação da energia livre de Gibbs de transferência

$\Delta_r H$ - Variação da entalpia de transferência

$\Delta_r S$ - Variação da entropia de transferência

EC – Os números EC (no inglês Enzyme Commission Numbers) são um esquema de classificação numérica para as enzimas

Endo-PG – Endopoligalacturonase

Exo-PG – Exopoligalacturonase

FC – Fator de concentração

FDA - Food and Drug Administration

FP – Fatos de purificação

FSS – Fermentação semi-sólida

Inf – Fase inferior do SAB

K – Coeficiente de partição

K_e – Coeficiente de partição de atividade enzimática

K_p – Coeficiente de partição de proteínas

kDa – 1000 Da

LEB – Laboratório de engenharia bioquímica

M – Massa molar

μ_s^α - Potencial químico do soluto s na fase α

μ_s^β - Potencial químico do soluto s na fase β

$\mu_s^{o, fase}$ - Potencial químico padrão do soluto “s” na fase

NP – Norma padronizada

Pb – Concentração de proteína na fase inferior

PCF – Polímero de cadeia flexível.

PEG 10000 – Polietilenoglicol de massa molecular 10000

PG – Poligalacturonase

pH – Potencial hidrogeniônico

pI – Ponto isoelétrico

Pt – Concentração de proteína na fase superior

PVA – Polivinilpirrolidina, um polímero de cadeia flexível

RE – Relação entre o volume de solvente empregado na recuperação das enzimas e a massa de meio fermentado

RPB – Recuperação e purificação de bioprodutos

Rpm – rotações por minuto

RB – Recuperação na fase inferior do SAB

RT – Recuperação na fase superior do SAB

SABs – Sistemas aquosos bifásicos

STL – Declive da linha de amarração

Sup – Fase superior do SAB

T – Temperatura

TC – Tempo de contato entre o solvente e o meio fermentado

Capítulo 1

Introdução Geral

1. Introdução

O desenvolvimento tecnológico atingiu nas últimas décadas grandes dimensões. Entre as tecnologias que se desenvolveram nesse período, os processos biotecnológicos industriais merecem particular atenção por apresentarem significativa relevância econômica e social.

Um dos principais exemplos de processos biotecnológicos industriais em grande desenvolvimento é a produção de enzimas (PEREIRA, 2005), com destaque para as enzimas pectinolíticas, que estão entre as que possuem maior significância comercial. Elas representam cerca de 25% das vendas globais de enzimas alimentícias (JAYANI *et al.*, 2005) e suas preparações comerciais são normalmente de origem fúngica, especialmente de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, que exibem características de alta atividade de endopoligalacturonase e de pectina liase (BRAVO *et al.*, 2000).

A aplicação de tais enzimas nas indústrias de alimentos inclui: o amadurecimento de frutas, a clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, o tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, a extração de polpa de tomate, a fermentação de chá e chocolate, o tratamento de resíduos vegetais, a degomagem de fibras na indústria têxtil e de papel e a extração de óleos vegetais (UENOJO e PASTORE, 2007).

Novas aplicações para o uso das enzimas pectinolíticas se deparam com o custo de produção, estabilidade e especificidade das mesmas. A utilização de fontes alternativas de carbono para o barateamento da produção de enzimas vem atender essa necessidade (CAMARGO *et al.*, 2005).

Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando resíduos agroindustriais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos. O uso desses resíduos como substratos em bioprocessos, além de ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ALEXANDRINO *et al.*, 2007).

Considerando-se o potencial do Brasil para a produção agrícola, há uma grande geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais que podem ser utilizados como fonte de nutrientes nos processos de FSS para a produção de enzimas (PINTO *et al.*, 2005). Além disso, há no país uma geração de grandes quantidades de resíduos da agroindústria, que podem ser transformados enzimaticamente em produtos de maior valor agregado e de interesse industrial (PALMA, 2003).

O Brasil é o maior produtor de maracujá do mundo, responsável por cerca de 90% da produção mundial (EMBRAPA, 2004). A cultura do maracujá tem desempenhado uma importante função social nas regiões onde é explorada, garantindo um nível de emprego no campo e na indústria. No entanto, a maior parte do fruto (casca e albedo, constituindo cerca de 60% do fruto) é desperdiçada.

Atualmente, no Brasil, cerca de 90% das cascas e sementes do maracujá não têm aproveitamento ou destino apropriado (EMBRAPA, 2007). Outra parte dos resíduos provenientes do processo de esmagamento da fruta para a obtenção do suco é utilizada por produtores rurais na suplementação da alimentação animal, como ração para bovinos e aves, ainda sem muita informação técnica adequada. Em 2007, a agroindústria do maracujá produziu cerca 405.214,46 toneladas de resíduos. Agregar valor a esses subprodutos é de interesse econômico, científico e tecnológico (FERRARI *et al.*, 2004).

Uma aplicação potencial para tal resíduo seria utilizá-lo como fonte de carbono para produção de enzimas. Isso representaria uma solução para os problemas causados pela inadequada disposição final destes resíduos, uma vez que, tal disposição pode acarretar a proliferação de insetos, vetores causadores de doenças, bem como odores desagradáveis no ambiente, geralmente o próprio pátio da indústria que processa a matéria prima (SOUZA, 2008). Além disso, o resíduo da fermentação semi-sólida representa uma carga orgânica pré-degradada, o que facilitaria sua aplicação em processos de compostagem para a produção de fertilizantes para atividades agrícolas ou como ração animal, uma vez que o desenvolvimento dos microrganismos eleva o teor de proteínas do resíduo da fermentação.

No LEB/UFCG foram desenvolvidos, nos últimos anos, projetos de pesquisas que tiveram por objetivo agregar valor ao resíduo agroindustrial do maracujá. Dentre esses trabalhos pode-se citar o enriquecimento nutricional do resíduo para aproveitamento do mesmo como ração animal (OLIVEIRA, 2007) e a produção de pectinases por fermentação semi-sólida (SOUZA, 2008).

De acordo com Pereira (2005), em algumas aplicações industriais, o extrato enzimático produzido pelo microorganismo pode ser utilizado de forma satisfatória. Porém, quando se deseja características específicas no processo industrial, como a produção de sucos encorpados, determinada faixa de viscosidade, evitar a formação de substâncias indesejadas no processo ou nele manter a presença de certas proteínas, é necessária uma concentração do extrato enzimático, de forma a aumentar a presença de enzimas ou grupos enzimáticos de interesse.

A purificação é, portanto, um dos mais importantes aspectos da produção e processamento de biomoléculas, sendo particularmente significativa para o processamento de algumas proteínas, que devido a sua complexidade, frequentemente necessitam de muitas etapas para alcançar níveis de pureza aceitáveis para aplicações médicas e alimentares. Assim, um dos grandes desafios da biotecnologia é desenvolver processos de purificação simples, seguros, baratos e que atinjam altos graus de purificação e seletividade (IGARASHI, 2003).

A utilização de sistemas aquosos bifásicos (SABs) é referida como um processo adequado para purificação de enzimas, uma vez que permite obter rendimentos elevados em tempos curtos e com custos baixos (IGARASHI, 2003). Contudo, não foram encontrados nas bases de pesquisa nacionais como, por exemplo, o portal da CAPES, periódicos que tratem de pesquisas sobre a aplicação deste processo na purificação da enzima poligalacturonase no período da revisão bibliográfica.

1.1 Objetivo geral

Este trabalho de pesquisa teve, como objetivo principal, estudar a recuperação de poligalacturonases produzidas a partir da fermentação semi-sólida da casca e albedo do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*), de forma a obter extratos com atividade máxima e elevar a atividade específica e pureza das poligalacturonases presentes no extrato por meio de sistemas aquosos bifásicos do tipo polímero-sal.

1.1.1 Objetivos específicos

- Caracterização do resíduo do maracujá seco e processado quanto à granulometria, densidade aparente, densidade real, porosidade, umidade, pH e teores de: cinzas, sólidos solúveis, açúcares totais, açúcares redutores, e pectina.
- Avaliar as variáveis que podem influenciar no processo de recuperação da enzima por extração sólido-líquido (lixiviação) a partir do meio fermentado, tais como: quantidade de solvente (relação volume de solvente por grama de meio fermentado - RE), tempo de contato

entre o solvente e o meio fermentado (TC) e a intensidade de agitação do meio de extração (AG), utilizando como ferramenta estatística um planejamento fatorial 2^3 .

- Construir sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (PEG 10000) e tampão fosfato de potássio (pH 7,0), determinando-se os diagramas de equilíbrio das fases e suas composições.
- Recuperar a enzima poligalacturonase a partir do extrato por meio dos SABs construídos e determinar os parâmetros de partição e purificação, a fim de verificar se a aplicação dos SABs é capaz de promover a recuperação das enzimas em uma das fases do sistema, com aumento da atividade específica e pureza das mesmas.

Capítulo 2
Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo serão exibidas informações gerais sobre o maracujá, as pectinas e pectinases, a poligalacturonase, a produção de enzimas por fermentação semi-sólida, as características e princípio de funcionamento dos SABs, além da sua utilização na recuperação de biomoléculas.

2.1 Maracujá

2.1.1 Importância e características

O maracujá é um fruto nativo da América Tropical, pertencente à família *Passifloraceae*, constituída por 12 gêneros e mais de 500 espécies distintas, largamente distribuídas pelos continentes americano, asiático e africano. O principal gênero, *Passiflora* (Figura 2.1), apresenta aproximadamente 400 espécies conhecidas, das quais cerca de 60 produzem frutos comestíveis (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

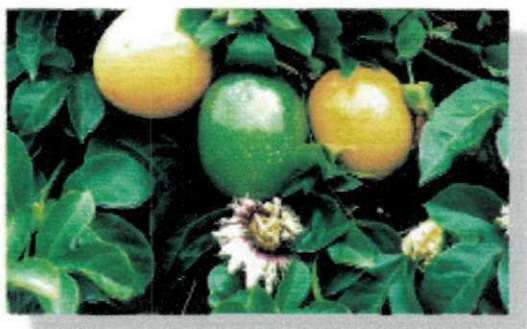


Figura 2.1. *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Fonte: EMBRAPA, 2007).

A exportação de maracujá tem ocorrido sob as formas de fruta fresca, fruta conservada e suco concentrado, sendo os principais destinos os países europeus e, mais recentemente, a Argentina e o Uruguai, no caso de frutas *in natura*. A participação da fruta fresca no total das exportações de maracujá do Brasil é em torno de 1,5%. As frutas conservadas (congelados) e

os sucos concentrados formam a maior parcela, sendo que as frutas conservadas têm sido comercializadas principalmente para os mercados italiano, norte-americano, alemão e argentino. Já os sucos, têm representado os maiores ganhos em divisas, comercializados mais intensamente com Holanda, Estados Unidos, Porto Rico, Japão e Alemanha, os quais importam 76% do suco concentrado (EMBRAPA, 2004).

No ano de 2007, o Brasil produziu cerca de 664.286 toneladas de maracujás, sendo que 64% dos frutos foram produzidos na Região Nordeste, 24% no Sudeste, 7% no Norte, 3% no Centro-Oeste e 2% na Região Sul (IBGE, 2009).

É uma cultura com longo período de safra, totalizando 8 meses no Sudeste, 10 no Nordeste e 12 meses no Norte do País. A espécie mais cultivada é o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), que por ser mais vigorosa, adapta-se melhor aos dias quentes e apresenta frutos de maior tamanho (EMBRAPA, 2004). Destina-se principalmente à produção de sucos (CÓRDOVA *et al.*, 2005).

A casca e o albedo do maracujá amarelo representam cerca de 60% do peso do fruto (SOUZA, 2008), e, junto com as sementes, constituem os resíduos da produção de suco concentrado. A casca do maracujá é rica em fibras solúveis e minerais (CORDOVA *et al.*, 2005), além de proteínas e pectina (OTAGAKI & MATSUMOTO, 1958).

2.2 Substâncias pécticas

As substâncias pécticas, carboidratos poliméricos componentes da parede celular e da lamela média de vegetais, formam um grupo bastante heterogêneo de polissacarídeos com diferentes massas moleculares e graus de esterificação (KOBBLITZ, 2008). São usadas na indústria de alimentos como agentes geleificantes e como fibras funcionais. Por outro lado, podem representar um problema nas várias etapas do processamento de frutas e vegetais, visto que seu arraste, após o rompimento da parede celular, pode causar turbidez em sucos ou incrustações em tubulações e reatores industriais (SANTOS, 2007).

2.2.1 Classificação das substâncias pécnicas

Segundo PEREIRA (2005), o comitê da “American Society” definiu o conjunto de substâncias pécnicas como:

- **Protopectina:** substâncias precursoras das substâncias pécnicas que apresentam como característica a insolubilidade na água. Quando hidrolisadas, geram pectina ou ácidos pécnicos.
- **Ácido pécnico:** polímero solúvel de ácido galacturônico. Contém uma quantidade desprezível de grupos metila. Os sais destes ácidos denominam-se pectatos.
- **Ácidos pectínicos:** termo usado para designar o ácido poligalacturônico coloidal, que contém uma quantidade significativa de grupos metila esterificados (> 0 e < 75%). Os sais destes ácidos denominam-se pectinatos.
- **Pectina:** nome dado ao material polimérico no qual, pelo menos 75 % dos grupos carboxila do ácido galacturônico são esterificados com metanol. Confere rigidez à parede celular quando está ligado à celulose (KASHYAP *et al.*, 2001). A Figura 2.2 exhibe a estrutura da pectina.

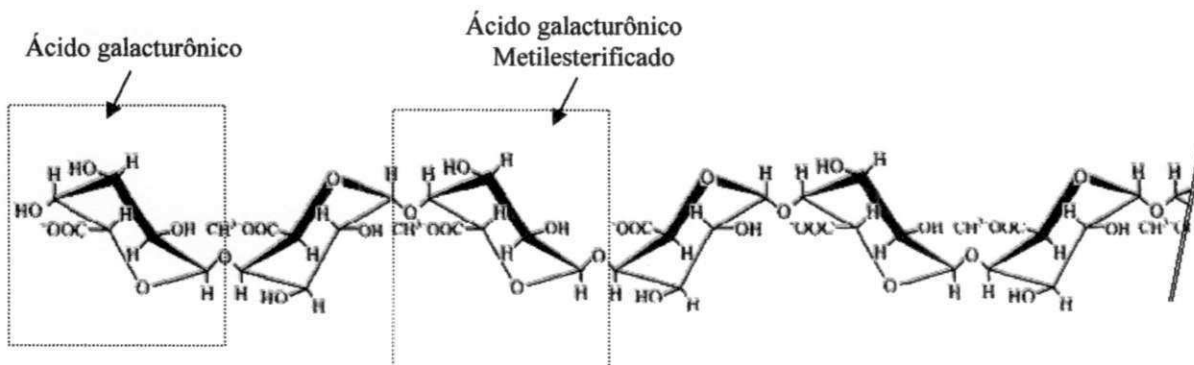


Figura 2.2. Estrutura da molécula de pectina, exibindo a estrutura do ácido galacturônico parcialmente metilesterificado. Resíduos de xilose e arabinose não foram incluídos. (Adaptado de Alkorta *et al.*, 1998).

Nas frutas não maduras, a pectina está ligada às microfibrilas de celulose na parede da célula. Tal pectina confere rigidez à parede celular, pois é insolúvel. No entanto, durante o amadurecimento, a estrutura da pectina é alterada por enzimas que ocorrem naturalmente nas frutas. Essas alterações envolvem a quebra da cadeia da pectina ou de cadeias laterais anexas às unidades que compõem a cadeia principal. Em qualquer um dos casos, o resultado é que a

pectina se torna mais solúvel, sua força nas paredes celulares circunvizinhas torna-se menor e o tecido da planta amolece (KASHYAP *et al.*, 2001).

Pectina é também um nome genérico para a mistura de diferentes compostos onde o ácido pectínico é o maior componente. Sua forma nativa está localizada na parede celular e pode estar interligada com outros polissacarídeos estruturais e proteínas para formar a protopectina insolúvel (KASHYAP *et al.*, 2001).

Dependendo da origem, as substâncias pecticas podem se diferenciar quanto ao grau de esterificação metílica, a proporção de açúcares neutros (principalmente D- galactose, L- arabinose e D-xilose) e ao grau de polimerização da molécula (SAKAI *et al.*; 1993).

2.3 Pectinases

As pectinases, também denominadas enzimas pecticas, são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre unidades de ácidos galacturônicos ou seu derivado metoxilado. São produzidas por vegetais e microrganismos e seu substrato são os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais (KOBLOITZ, 2008). Estão envolvidas nos processos fisiológicos dos vegetais e são empregadas em nível industrial, destacando-se por serem as enzimas mais utilizadas pelas indústrias de processamento de frutas (MALLER, 2008). As pectinases são constituídas por um complexo multienzimático (BUENO *et al.*, 2005).

2.3.1 Classificação das pectinases

A classificação das pectinases baseia-se: no modo de ataque às moléculas dos polímeros pecticos; na preferência pelo substrato (que pode ser pectina, ácido pectico ou protopectina); e na ação, seja ela por transeliminção ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo) ou terminal (enzima exo) (UENOJO & PASTORE, 2007; CORDEIRO & MARTINS, 2009).

Existem basicamente três tipos de pectinases: a pectinaesterase, que remove os grupos metil éster; as protopectinases, que solubilizam protopectina para formar pectina; e as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases), que catalisam a clivagem das

ligações glicosídicas das substâncias pécicas (JAYANI *et al.*, 2005). As enzimas hidrolíticas incluem as poligalacturonases e as polimetilgalacturonases (UENOJO & PASTORE, 2007).

2.3.2 Poligalacturonase

A poligalacturonase (PG) é uma hidrolase que se apresenta sob duas formas: a endo-PG e a exo-PG. A primeira atua sobre ácido pécico, é ativada em pHs 4,0-6,0 e temperaturas no intervalo de 30-40°C. A determinação de sua atividade pode ser medida pela diminuição de viscosidade ou por quantificação de grupos redutores resultantes da reação de hidrólise. A exo-PG obtida a partir de fungos produz ácido monogalacturônico como principal produto de hidrólise em reações com pHs ótimos na faixa de 4,0-6,0. A determinação de atividade é realizada pela quantificação de grupos redutores formados na hidrólise (BUENO *et al.*, 2005).

As poligalacturonases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α (1→4) da cadeia de ácido poligalacturônico (MARTIN, 2006). São as mais extensivamente estudadas entre as enzimas pectinolíticas (JAYANI *et al.*, 2005). As endopoligalacturonases hidrolisam as ligações glicosídicas α (1→4) internas de forma randômica, causando a despolimerização da molécula e liberando oligômeros de ácidos poligalacturônico, enquanto as exopoligalacturonases removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas α (1→4) a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico (MARTIN, 2006). As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e por possuir maior atividade na região levemente ácida (ZHENG & SHETTY, 2000).

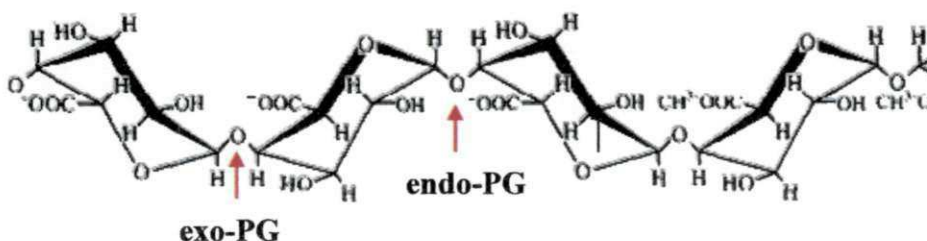


Figura 2.3. Forma de atuação da exo-PG e endo-PG.

As poligalacturonases obtidas pela fermentação do resíduo agroindustrial do maracujá amarelo por *Aspergillus niger* CCT 0961 exibem atividade e estabilidade em meios com pH entre 3,5 e 5,5; não sendo mais detectada atividade poligalacturonásica em pH superior a 6,5 (SOUZA, 2008), como pode ser observado na Figura 2.4.

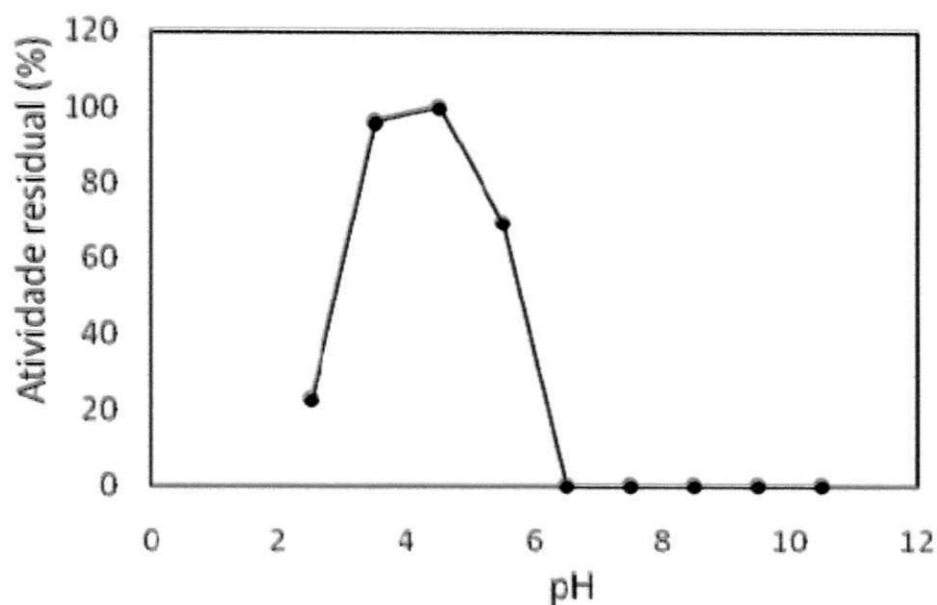


Figura 2.4. Estabilidade da poligalacturonase ante as variações de pH. Fonte: Souza *et al.*, (2010).

2.3.2.1 Endopoligalacturonase

A enzima endopoligalacturonase (EC. 3.2.1.15) é a enzima péctica que catalisa a hidrólise da cadeia do ácido poligalacturônico, com a introdução de uma molécula de água. São produzidas por fungos filamentosos, bactérias e algumas leveduras. Uma das aplicações das enzimas pécticas, como referido anteriormente, é na indústria de processamento de frutos, para a extração e clarificação dos sucos, assim como para a redução da viscosidade sem perda do caráter encorpado dos mesmos. Na primeira situação, uma preparação de enzimas que contenha pectinesterase é a mais eficiente. Contudo, quando o caráter encorpado nos sucos é necessário, uma preparação que contenha somente endopoligalacturonase permite obter melhores resultados (PEREIRA, 2005).

Algumas poligalacturonases de origem fúngica têm sido purificadas e caracterizadas mostrando variações nas suas propriedades químicas e físicas (BUENO 2005). A Tabela 2.1

mostra resultados de trabalhos nos quais foram caracterizadas endopoligalacturonases provenientes de várias fontes.

Tabela 2.1. Endopoligalacturonases provenientes de várias fontes.

Fonte	M (kDa)	pI	km	T _{ótima} (°C)	pH _{ótimo}	T _{Estabilidade}	pH _{Estabilidade}	Referência
<i>A. japonicus</i>	PG I – 38 PG II – 65	5,6 5,3	-	30 30	4,0 – 5,5 4,0 – 5,5	-	-	HASUNUMA <i>et al.</i> , 2003
<i>A. niger</i>	PG I – 61 PG II – 62	-	0,12 0,72	43 45	3,8 – 4,3 3,0 – 4,6	50 51	-	SINGH & RAO, 2002
<i>A. niger</i>	PG I – 35 PG II – 85	-	-	-	4,1 3,8	-	-	COOKE <i>et al.</i> , 1976
<i>A. niger</i>	PG I-38 PG II - 59	3,3 5,9	-	-	-	-	4,0 – 5,0 4,0 – 5,0	KESTER E VISSER, 1990
<i>A. niger</i>	PG I – 29,5 PG II – 94,5	5,3 5,3	-	-	-	-	2,8 – 5,1 2,8 – 5,1	HARSA, 1991
<i>A. awamori</i>	41	61	-	40	5,0	50	4,0 – 6,0	NAGAI <i>et al.</i> , 2000
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	41,7	4,3 a 4,6	-	66	4,7	-	-	SHANLEY <i>et al.</i> , 1993
<i>Sporotrichum thermofile</i>	-	-	-	55	7,0	-	-	KAUR <i>et al.</i> , 2004
<i>S. cerevisiae</i>	43	-	-	45	4,5	-	-	BLANCO <i>et al.</i> , 1999
<i>S. cerevisiae</i>	42	-	-	25	-	-	3,0 – 5,5	GAINVORS <i>et al.</i> , 2000
<i>S. cerevisiae</i>	39	-	4,7	45	5,5	50	4,5 – 6,0	CORREDIG <i>et al.</i> , 2000
<i>S. cerevisiae</i> Var. <i>chevallieri</i>	-	-	-	30	4,5	-	-	SCHWAN <i>et al.</i> , 1997
<i>K. wickerhamii</i>	-	-	-	35	4,5	-	-	SILVA <i>et al.</i> , 2005b
<i>K. marxianus</i>	PG I - 49,6 PG II – 49,6 PGIII – 46,7 PG IV – 49,6	6,3 6,0 6,3 5,7	-	-	-	-	-	BARNBY <i>et al.</i> , 1990
<i>K. marxianus</i>	PG I - 47 PG II – 41 PGIII – 35 PG IV – 33	-	-	40	5,0	-	4 – 6 4 – 6 4 – 6 4 – 6	SCHWAN <i>et al.</i> , 1997
<i>K. marxianus</i>	-	-	-	35	5,5	-	4 – 6	SILVA <i>et al.</i> , 2005b

Fonte: Pereira (2005)

A Figura 2.5 ilustra uma molécula de endopoligalacturonase produzida por *Aspergillus niger*.

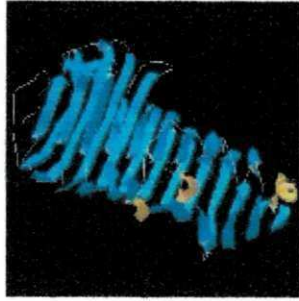


Figura 2.5. Endopoligalacturonase II produzida por *aspergillus niger* (Fonte: University of Groningen)

2.3.3 Obtenção e importância das enzimas pécticas

As enzimas, de um modo geral, são amplamente utilizadas nos mais diversos processos industriais, em razão da sua especificidade e potencial catalítico. Entretanto, uma enzima torna-se de valor comercial somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial (BRAVO *et al.*, 2000). Enzimas que são obtidas por processos fermentativos oferecem uma série de vantagens, que fazem da sua aplicação na indústria de alimentos uma alternativa consistente por se tratar de um processo que consome pouca energia, melhora a qualidade de vários produtos e causa um mínimo de impacto ambiental (VALADÃO, 2005).

As pectinases foram as primeiras enzimas a serem utilizadas industrialmente, com suas aplicações descritas inicialmente em 1930. Entretanto, apenas na década de 1960 a natureza química de tecidos vegetais tornou-se evidente, de modo a permitir grande expansão no mercado de enzimas (KASHYAP *et al.*, 2001).

Na indústria de sucos, o esmagamento mecânico de frutas ricas em pectina produz um suco com grande viscosidade, pois a pectina permanece ligada à polpa na forma de uma massa gelatinosa. É difícil extrair este suco por pressão ou usando outros métodos mecânicos. Com a adição de pectinases, a viscosidade do suco da fruta diminui, a possibilidade de pressionar a polpa aumenta, a estrutura gelatinosa se desintegra e o suco é facilmente obtido, apresentando inclusive maiores rendimentos (ALKORTA *et al.*, 1998).

Outras áreas de aplicação incluem a indústria de papel, polpa, extração de óleo, fabricação de alimentos para bebês, elaboração de ração animal e indústria têxtil. Na indústria têxtil, pectinases são empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas,

como a juta e o rami. As pectinases também são utilizadas na indústria de fermentados, como na fermentação do café, do cacau e do fumo (CARVALHO, 2007a).

Com base em suas aplicações, as pectinases podem ser classificadas em dois tipos: pectinases ácidas e pectinases alcalinas.

Pectinases ácidas são usadas nas indústrias de suco de frutas e na fabricação de vinho, normalmente vêm de fontes fúngicas. Os sucos produzidos por estas indústrias comercialmente incluem: sucos claros brilhantes (maçã, pêra e uva), sucos turvos (cítricos, suco de ameixa, tomate e néctares), e produtos unicelulares nos quais a intenção é preservar a integridade das células da planta através de hidrólise seletiva dos polissacarídeos da lamela central. Os objetivos de se acrescentar enzimas diferem nestes três tipos de sucos de frutas e vegetais. Pectinases alcalinas são utilizadas, principalmente, no descolamento e maceramento de safras de fibras e no pré-tratamento de água efluente da indústria de sucos de frutas. Estas enzimas vêm, majoritariamente, de fontes bacterianas (KASHYAP *et al.*, 2001).

Pectinases podem ser sintetizadas por bactérias, fungos e leveduras. Atualmente a utilização de enzimas de origem fúngica tem aumentado progressivamente, apresentando grande destaque no setor industrial. A produção de pectinases por microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular, do meio de cultura, tempo de cultivo e escolha de linhagens apropriadas. Quando esses critérios são alcançados, tem-se uma melhor produção enzimática (CARVALHO, 2007a).

A utilização de bactérias, leveduras ou fungos filamentosos para a produção de biomoléculas desperta grande interesse de estudo em virtude de inúmeras vantagens apresentadas, tais como: não necessitam de amplos espaços para seu crescimento; conseguem degradar e crescer em diversos substratos, inclusive em resíduos industriais, os quais podem ser aproveitados desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada; possuem um crescimento rápido quando as condições são favoráveis para o seu crescimento e podem ser manipulados geneticamente para a obtenção de mutantes (BRAVO *et al.*, 2000).

2.3.4 *Aspergillus niger* como produtor de pectinases

As pectinases produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* são de grande importância por sua aceitabilidade na indústria de processamento de alimentos (BRAVO *et al.*, 2000).

Segundo Castilho (1997), os fungos filamentosos, em especial do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus wentii*) possuem corpos de frutificação com conidióforos contendo vesículas terminais arredondadas, recobertos de esporos nas extremidades das hifas e, no caso do *Aspergillus niger*, a cor dos esporos é negra.

A Figura 2.6 mostra detalhes do corpo de frutificação do *Aspergillus niger*.

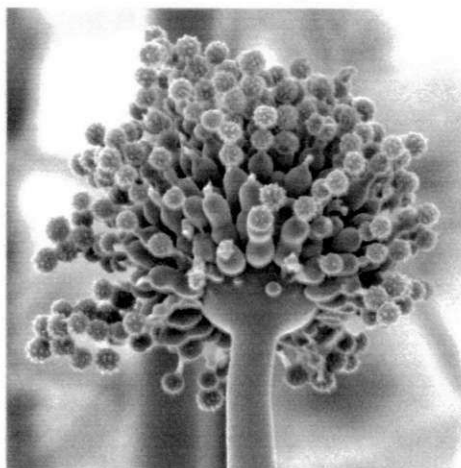


Figura 2.6. *Aspergillus niger* (READ, 1991)

O gênero *Aspergillus* é o mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais estudados. As espécies que compõe este gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais quanto em animais, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e sub-tropical. Muitas das espécies de *Aspergillus* são utilizadas para a obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem e para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem substâncias tóxicas. A taxonomia atual reconhece 150 espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto somente 30 destas são bem definidas e facilmente distinguíveis (ROSA *et al.*, 2002).

2.3.5 Fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida pode ser definida como uma técnica de crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida) na

qual o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz (MENESES, 2006).

Pinto *et al.*, (2005) destacam nesse processo de fermentação as seguintes características:

- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas.
- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais.
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos *habitats* naturais.
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

As matérias-primas são de 60% a 80% do custo total da etapa de fermentação do processo de produção de enzimas. A composição do meio deve ser definida com cuidado, substituindo-se compostos caros por outros disponíveis em maior quantidade e de menor custo, sem esquecer as etapas de extração e purificação da enzima (VALADÃO, 2005).

Pandey *et al.*, (2000) ressaltam em seus estudos que pesquisas para a seleção de substratos adequados para processos de fermentação semi-sólida dão destaque, principalmente, a produtos pós-colheita e resíduos agroindustriais. Dentre os resíduos mais estudados, estão os das seguintes culturas: mandioca, soja, beterraba, batata, sorgo, trigo, arroz, feijão, milho e cana-de-açúcar, além de resíduos industriais do processamento de frutas, de óleo, serragem, sabugo de milho, entre outros. Portanto, a utilização da fermentação em meio semi-sólido primeiramente leva em conta a importância da sustentabilidade ambiental que vem sendo prioridade das políticas de pesquisa agropecuária em quase todo o mundo e baseia-se na utilização racional dos recursos naturais e de resíduos agrícolas e industriais (VALADÃO, 2005).

2.4 Recuperação e purificação de enzimas

2.4.1 Recuperação das enzimas obtidas por fermentação semi-sólida

Uma etapa inicial da recuperação de enzimas obtidas por fermentação semi-sólida é a lixiviação do material fermentado. A lixiviação consiste na dissolução preferencial de um ou

vários solutos de interesse por meio do contato entre um sólido e um solvente líquido (FERNÁNDEZ, 2009). Tal solvente pode ser: água, tampões, soluções salinas diluídas ou soluções aquosas de glicerol, de modo a obter-se, após a operação de separação do tipo sólido-líquido, um extrato enzimático bastante límpido. Alternativamente, a massa semi-sólida pode ser seca a baixas temperaturas, antes da extração. O material seco pode ser armazenado para posterior manipulação ou pode ser usado como uma preparação comercial bruta. O extrato bruto líquido pode ser concentrado a vácuo ou por ultrafiltração. O concentrado assim obtido pode ser vendido na forma líquida, após a adição de estabilizantes, como, por exemplo, glicerol ou tampões (CASTILHO, 1997).

Para desenvolver um processo de lixiviação com sucesso, além da seleção do equipamento adequado, existe a influência de diferentes variáveis, entre as quais se destacam a preparação dos sólidos, a relação sólido/solvente, a temperatura do processo, o pH do solvente, a tensão superficial do líquido, o grau de agitação do sistema, e a presença ou não de reação química na extração (FERNÁNDEZ, 2009).

Segundo Fernández (2009), a relação entre a quantidade de sólido a tratar e o volume de solvente é de grande importância. A intensidade e o caráter do processo de extração sólido-líquido dependem em grande parte da difusividade do soluto na fração do solvente selecionado, assim como da concentração de saturação do soluto no solvente, pois está diretamente relacionado com a força motriz do processo. Por outro lado, é necessário levar em consideração que um grande volume de solvente na extração dos solutos aumenta consideravelmente os custos de purificação e recuperação do produto de interesse. Já a agitação, favorece a difusão dos solutos no solvente. Além disso, a extração de enzimas e proteínas deve ser realizada em valores de temperatura e pH onde a estabilidade seja ótima e, sua atividade biológica seja igualmente elevada, sem causar danos às biomoléculas ou ao solvente.

Hendges (2006) estudando a extração de poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* por FSS em reator de dupla superfície, utilizando farelo de trigo e pectina como substratos, determinou como condições adequadas para a extração das enzimas a temperatura de 30°C, uma relação sólido/solvente (RE) de 1:7,5 ; com um tempo de contato (TC) de 15 minutos e agitação do meio (AG) de 200 rpm. Os valores de atividade obtidos foram superiores a 80 U/g.

Uma vez obtido o extrato enzimático, pode-se seguir outras operações unitárias com o objetivo de recuperar, concentrar e purificar as biomoléculas de interesse.

2.4.2 Fator de recuperação e purificação de proteínas

Em geral, as soluções contendo as biomoléculas a serem purificadas encontram-se misturadas às células, sais e a produtos gerados durante a fermentação. Portanto, necessitam de um tratamento que possibilite a separação destes materiais (muitas vezes indesejáveis), o que acaba elevando os custos da sua purificação, podendo representar 80% do custo total de produção (CAVALCANTI, 2010).

Segundo Cavalcanti (2010), a avaliação do desempenho de qualquer método de purificação de proteínas se baseia na recuperação e no fator de purificação da proteína. Tais valores são obtidos em relação à solução inicial. A avaliação também pode ser feita relacionando-se a concentração do material purificado (C) com a concentração do material inicial (C₀), ou quaisquer etapas dentro do bioprocessamento, tendo sempre uma etapa anterior como referência. Dessa forma, define-se:

A recuperação da proteína (RP) é a relação da concentração do material purificado (C) com a concentração do material não purificado (C₀), dada em porcentagem, conforme a Equação 2.1:

$$\text{Recuperação da proteína (\%)} = \frac{C}{C_0} \times 100 \% \quad (2.1)$$

O fator de purificação (FP) é definido como a relação entre a atividade específica no material purificado (AP) com a atividade específica no material não purificado (ANP), no caso de enzimas, ou massa da biomolécula alvo em relação à massa prévia, ou seja, para enzimas têm-se, conforme a Equação 2.2:

$$\text{Fator de Purificação} = \frac{AP}{ANP} \quad (2.2)$$

Sendo AP a atividade enzimática específica após uma determinada etapa de referência e ANP a atividade específica inicial da enzima antes dessa etapa.

2.4.3 Problemática da extração e purificação de bioprodutos

Uma situação comum em diversos processos industriais é a separação dos constituintes de uma mistura líquida homogênea composta de dois ou mais componentes. Para realizar esta separação existem vários métodos cuja aplicação é limitada pelas características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada, pelos custos do processo de separação e pelas condições disponíveis para a implantação do processo escolhido (CESAR, 2005).

A extração e o isolamento de proteínas após fermentação em larga escala ou provenientes de uma suspensão de células já eram problemas críticos da biotecnologia em meados do século XX (SILVA *et al.*, 1999). Geralmente, a separação e purificação de enzimas do meio de cultivo constituem a maior parte do custo total de sua produção. Por esta razão, existe a necessidade de se desenvolver técnicas em grande escala que sejam eficientes, eficazes, econômicas e alcancem altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da enzima (ANTOV *et al.*, 2004).

Além disso, grande parte dos esquemas utilizados para a purificação de proteínas envolve diversas operações unitárias no processo de Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB). Tal fato pode ocasionar baixo rendimento da proteína desejada e aumento de custos. A busca de solução para este problema tem incentivado o desenvolvimento de técnicas que simplifiquem e diminuam o número de operações utilizadas na purificação de biomoléculas, já que nesses processos, operações convencionais como a extração líquido-líquido utilizando solventes não é adequada pelo fato da maioria dos solventes utilizados serem tóxicos e provocarem a desnaturação de proteínas (CESAR, 2005).

2.4.4 Critérios para operação de extração em bioprocessos

Para aplicações em bioprocessos, um meio de extração necessita atender certos critérios, já que parâmetros como a solubilidade e a estabilidade dos compostos são importantes e não devem ser desprezados (CESAR, 2005). Porto (2004) cita alguns critérios:

- 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;
- Deve ser esterilizável;

- Ser imiscível ou parcialmente miscível com soluções aquosas;
- Não deve apresentar tendências de formação de emulsões estáveis com materiais biológicos;
- Não ser inflamável.

Além disso, para processos de extração do tipo líquido-líquido, o sistema deve formar duas fases imiscíveis ou parcialmente miscíveis com densidades diferentes, para possibilitar a recuperação do bioproduto desejado, concentrado em uma das fases.

2.5 Sistemas aquosos bifásicos

Nos últimos anos, têm adquirido importância e crescente êxito em bioprocessos de isolamento e separação de proteínas, os sistemas aquosos bifásicos (SABs), que se formam ao misturar-se dois polímeros de cadeia flexível (PCF) ou um polímero de cadeia flexível e um sal como o fosfato de potássio ou sulfato de amônio. Nesses sistemas, as proteínas se distribuem entre as duas fases aquosas de acordo com um coeficiente de distribuição que se define como (Equação 2.3):

$$K = \frac{[Pt]}{[Pb]} \quad (2.3)$$

Onde $[Pt]$ e $[Pb]$ são suas concentrações do soluto na fase superior e inferior respectivamente. O coeficiente de distribuição depende de uma série de variáveis experimentais: pH, temperatura, presença de sais, peso molecular e concentração do polímero, hidrofobicidade e tamanho da proteína, entre outras. Mediante o controle dessas variáveis, é possível fazer com que uma proteína contida em um mistura complexa seja transferida para uma das fases, mantendo as proteínas não desejadas na fase oposta (GÓMEZ *et al.*, 2006).

A separação espontânea, em fases distintas, devido à adição de soluções aquosas de dois polímeros foi inicialmente observada pelo microbiologista holandês Beijerinck, em 1956, ao misturar ágar com gelatina ou amido solúvel. A fase inferior era rica em ágar e a superior em gelatina (ou amido). Em 1956, Albertsson constatou que sistemas formados por polímeros solúveis e solventes orgânicos também possibilitam a partição de materiais biológicos, ou

seja, permitiam que uma terceira substância introduzida no sistema fosse coletada, preferencialmente, numa das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos (CESAR, 2005).

A extração de biomateriais usando sistemas aquosos bifásicos é, portanto, uma ferramenta poderosa na separação e análise de partículas biológicas (CARDOSO, 2007), pois fornece uma técnica de separação simples, facilmente dimensionável, energeticamente eficiente e suave para a recuperação de produtos em biotecnologia (HATTI-KAUL, 2001).

Algumas características desses sistemas fazem com que sejam particularmente adequados para a separação de misturas de moléculas de origem biológica: ambas as fases são ricas em água, constituindo um ambiente não agressivo a tais moléculas; a tensão interfacial é pequena, facilitando a transferência de solutos entre as fases, e a diferença de hidrofobicidade entre as fases é pequena e dependente da concentração, o que permite a manipulação dos sistemas de maneira a possibilitar a separação de moléculas semelhantes (ALBERTSSON, 1986).

2.5.1 Estudos envolvendo SABs

Trabalhos realizados com sistemas bifásicos aquosos têm obtido resultados satisfatórios na purificação de biomoléculas e estão se tornando cada vez mais importantes (FERREIRA *et al.*, 2009). A Tabela 2.2 mostra alguns trabalhos desenvolvidos nos últimos anos utilizando SABs.

Segundo Da Silva e Loh (2006), apesar da intensa aplicação em escala laboratorial para purificação de enzimas e proteínas, os SABs ainda não alcançaram ampla aplicação comercial, tendo talvez como possíveis causas o custo dos polímeros formadores das fases e/ou o comportamento complexo (inúmeras variáveis interferindo de forma cinética ou antagônica) de partição apresentados nestes sistemas bifásicos. Além disso, para sua aplicação sistemática, é necessária maior compreensão dos fatores que determinam sua formação e a partição de solutos específicos. Contudo, a urgente demanda por parte da indústria de bioprocessos em trazer para o mercado consumidor produtos que possuam alto valor agregado, certamente motivará a aplicação em escala industrial dos SABs. Conseqüentemente, processos utilizando SABs em etapas de recuperação primária de produtos de interesse biotecnológico serão uma importante opção para novos bioprocessos industriais.

Tabela 2.2. Aplicações dos SABs.

BIOMOLÉCULA	SAB	AUTORES	RECUPERAÇÃO
Lisozima	PEG-IDA-Cu ²⁺ /fosfato	SILVA <i>et al.</i> (1999)	51%
Xilanase	PEG/fosfato de potássio	BIM (1999)	97%
Bromelina	PEG/fosfato de potássio	BERTEVELLO (2001)	58%
Xilanase	PEG/fosfato de potássio	IGARASHI (2003)	94%
Pectinases	PEG 4000/dextrana	ANTOV <i>et al.</i>	72,41%
	PEG 4000/(NH ₄) ₂ SO ₄	(2004)	69,46%
Bromelina	PEG/POLICAJU	SARTORELLO (2004)	K entre 0,119 e 0,2
Pró-toxina épsilon	PEG/Citrato	PORTO (2004)	131%
Endopoligalacturonase	PEG/(NH ₄) ₂ SO ₄	PEREIRA (2005)	91%
	PEG/PVA		95%
Albumina, lisozima e tripsina	PEG/Carbamato de amônio	DALLORA <i>et al.</i> (2006)	promissora
Toxinas ofídicas	PEG/fosfato de potássio	GOMEZ <i>et al.</i> (2006)	eficiente
b-ficoeritrina	PEG/Sulfato	MÍRELES <i>et al.</i> (2006)	72%
	PEG/Fosfato de potássio		
	PEG/dextrana		
Amilases	PEG/ CaCl ₂	FERREIRA <i>et al.</i> (2007)	K= 4,2; adequado.
Glucose (G ₆ PDH)	PEG/fosfato de potássio	RIBEIRO (2007)	97,70%
glicomacropéptido	PEG/ Sal (Sulfato, Fosfato e Citrato)	SILVA (2007)	94,66
Bromelina	PEG/fosfato de potássio	FERREIRA (2007)	eficiente
HBSAG	PEG/fosfato de potássio	HINOJOSA <i>et al.</i> (2007)	65%
α-galactosidase	PEG/fosfato de potássio	NAGANAGOUDA <i>et al.</i> (2008)	89,60%
Ovomucoide	PEG/Na ₂ CO ₃	OLIVEIRA (2009)	90%

Além de biomoléculas, há também estudos da utilização de SABs para recuperação de íons complexos, como o nitroprussiato e pentacianonitrosilmetalatos (CARDOSO, 2007), o que ilustra a versatilidade desta técnica.

2.5.2 Diagramas de fases

Os componentes de um SAB podem ser dois polímeros diferentes (por exemplo: PEG e dextrana) ou um polímero e um soluto de baixa massa molecular (um sal). Na mistura destas substâncias com a água, um sistema bifásico só será formado quando a composição dos constituintes se encontrar acima de determinados valores (PEREIRA, 2005), sendo estes valores os pontos da curva binodal. A determinação do diagrama de equilíbrio de fases é a primeira etapa para caracterizar os sistemas bifásicos aquosos, pois ele contém informações das concentrações de PEG e sal necessário à formação das fases, composição das fases em equilíbrio e previsão qualitativa da partição de moléculas (FERREIRA *et al.*, 2009).

Os dados de equilíbrio apresentados nos diagramas de fases, estão relacionados com a variação da energia livre de Gibbs do sistema, ΔG_{Sist} . Este parâmetro físico-químico é importante para a compreensão dos mecanismos que governam o processo de transferência de um determinado soluto no SAB. O estado de equilíbrio termodinâmico dos SAB é alcançado quando a Energia Livre de Gibbs do sistema é minimizada ao máximo, ou seja, $dG = 0$ e o potencial químico de cada componente formador das fases for igual nas fases superior e inferior e também na interface (BRITO, 2007).

Os diagramas de equilíbrio podem ser construídos empregando o sistema de coordenadas retangulares, mas também podem ser expressos em coordenadas triangulares, a diferença é que na forma retangular, a concentração do solvente, no caso a água, está implícita no diagrama (CUNHA, 2008).

As Figuras 2.7 e 2.8 mostram os dois tipos de diagramas.

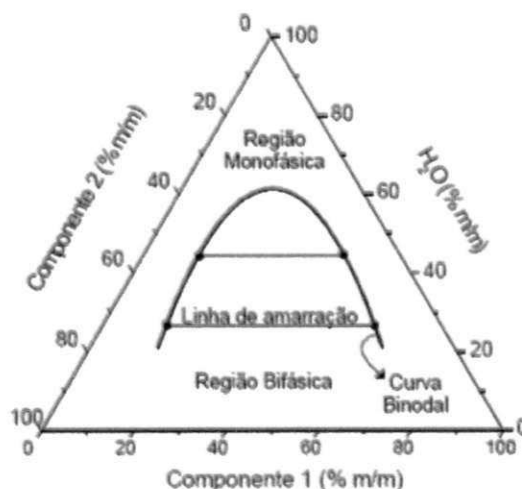


Figura 2.7. Diagrama de fases ternário (CARVALHO, 2007b).

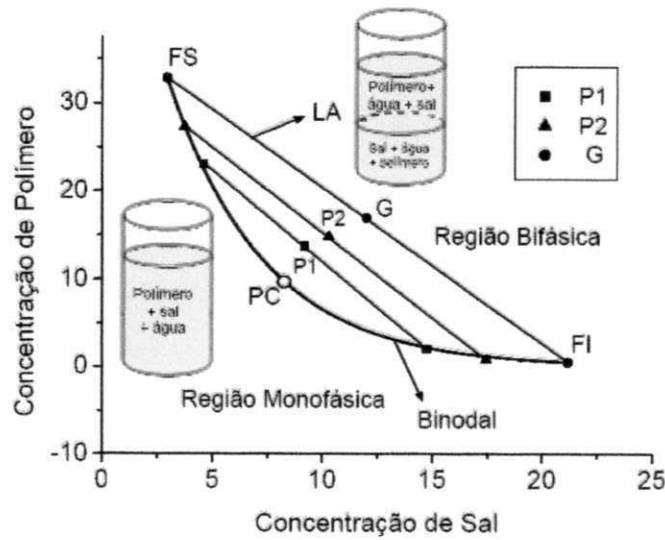


Figura 2.8. Diagrama de fases em coordenadas retangulares (CARDOSO, 2007).

Convencionalmente, os componentes presentes nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A curva que divide a região em duas fases (FS – PC – FI) é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio e informa em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo (CUNHA, 2008).

Uma mistura com a composição global representada pelo ponto G, como mostrado na Figura 2.8, separa-se espontaneamente em duas fases, com composições representadas pelos pontos FS e FI, que expressam as composições das fases superior e inferior, respectivamente. A linha que une os pontos (FS – G – FI) é conhecida como linha de amarração, LA. Na figura são mostrados três sistemas com composições globais diferentes P1, P2 e G, localizados em linhas de amarração diferentes (CARDOSO 2007). A obtenção das linhas de amarração ou ligação é importante, pois todas as misturas com composições globais pertencentes a uma mesma linha de amarração fornecerão fases superiores com propriedades termodinâmicas intensivas idênticas (composição, por exemplo), porém com propriedades termodinâmicas extensivas (volume, por exemplo) diferentes. O mesmo princípio aplica-se às fases inferiores (BRITO, 2007).

Quando um SAB é gerado de maneira que sua composição global situe no ponto médio da LA, a propriedade termodinâmica extensiva volume, das fases superior e inferior, serão os mesmos. No entanto, se um SAB for montado de maneira que sua composição global se encontre mais próxima à composição de uma das fases, haverá a formação de fases em

equilíbrio, que terão volumes distintos. Para um sistema que tenha uma composição global mais próxima da concentração da fase superior, ocorrerá a formação de um SAB com uma fase superior tendo maior volume do que a fase inferior (CARDOSO 2007).

Um parâmetro termodinâmico utilizado em estudos com SAB para medir a diferença das propriedades termodinâmicas intensivas entre as fases em equilíbrio é o comprimento da linha de amarração (CLA ou TLL, sigla inglesa de “tie-line length”). O CLA é um valor numérico calculado que mede a distância entre os pontos FS e FI no diagrama de fases conforme Figura 2.7.

O CLA é calculado em função das diferenças de concentração dos componentes em cada fase do SAB, de acordo com a Equação 2.4.

$$CLA(\%) = \sqrt{(w_{s,1} - w_{i,1})^2 + (w_{s,2} - w_{i,2})^2} \quad (2.4)$$

onde $w_{s,j}$, $w_{i,j}$ representam a percentagem do componente j na fase superior e inferior, respectivamente.

Cabe ressaltar que, quanto maior o valor do CLA, maior será a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases, elevando, conseqüentemente, a eficiência na extração e/ou partição do soluto de interesse no SAB (BRITO, 2007).

No diagrama de fases existe um ponto que representa o limite no qual o CLA, teoricamente, tende a zero. Trata-se do Ponto Crítico (PC), ou seja, é o ponto em que existiriam, hipoteticamente, duas regiões distintas, porém dotadas de propriedades termodinâmicas intensivas exatamente iguais (BRITO, 2007).

Outro importante parâmetro é o declive da linha de amarração (STL, sigla inglesa de “tie-line slope”), que é definido de acordo com a Equação 2.5 (PEREIRA, 2005).

$$STL = \frac{w_{s,1} - w_{i,1}}{w_{s,2} - w_{i,2}} \quad (2.5)$$

Este parâmetro apresenta-se atualmente como uma característica importante dos diagramas de fases uma vez que o seu valor é geralmente constante quando está presente um SABs de polímeros e a sua avaliação, comparação com uma média para um dado sistema e

nova medição para valores afastados dessa média é provavelmente o melhor método para obter diagramas de fases confiáveis (ZASLAVSKY, 1995).

Deve-se destacar que os polímeros sintéticos são geralmente polidispersos, podendo a distribuição das suas massas moleculares variar de lote para lote, mesmo quando obtidos do mesmo fabricante. Assim, a posição da binodal para um dado sistema não pode ser vista como uma constante físico-química do sistema (PEREIRA, 2005).

2.5.3 Fatores que influenciam no sistema de fases

Os principais fatores que influenciam no sistema de fases e conseqüentemente alteram o diagrama de fases são: a massa molar do polímero, a concentração dos componentes do sistema, o pH e temperatura (FERREIRA, 2007), embora o fator mais importante para a separação das fases seja mesmo a natureza química dos polímeros (PEREIRA, 2005).

Na medida em que se aumenta o peso molecular do PEG, as curvas tornam-se mais assimétricas e próximas da origem do eixo de coordenadas, requerendo-se menores concentrações para a separação das fases. Este comportamento é devido ao aumento do caráter hidrofóbico do PEG ao aumentar-se o peso molecular do polímero (BERTOLUZZO *et al.*, 2005).

A variação de temperatura também provoca alterações na binodal do sistema, pois altera a solubilidade dos sais e polímeros em água. O deslocamento da binodal pode ocorrer tanto para concentrações menores quanto maiores, dependendo do tipo de sistema. No caso SAB compostos por um polímero e um sal, o aumento da temperatura conduz a uma diminuição das concentrações de polímeros e sal necessárias ao aparecimento de duas fases (PEREIRA, 2005).

O pH e o tipo de cátion também são variáveis que podem influenciar no diagrama de fases. Diminuindo o valor do pH, as concentrações necessárias de polímero e sal de um sistema PEG/sal aumentam, deslocando a curva binodal para a direita. Porém, tal efeito não é muito expressivo, já que Ferreira *et al.*, (2009) estudando o efeito da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos, concluíram não haver deslocamento significativo da binodal em relação aos diferentes pHs estudados nem influência do pH nas composições das linhas de amarração.

O efeito da adição de sais nos sistemas varia com o sal e com o próprio sistema (PEREIRA, 2005). Bertoluzzo *et al.*, (2005) observaram que ao adicionar-se sal ao SAB

aumenta-se a área bifásica como resultado de um fenômeno de “salting out” do polímero originado pelo sal e um efeito de “exclusão” do polímero ao sal. Portanto, a adição de sais resulta no deslocamento da binodal no sentido das menores concentrações de PEG e Sal. Esse efeito aumenta com o aumento do peso molecular do polímero.

(Dado ao grande número de variáveis que influenciam o comportamento do sistema, alguns autores como Porto (2004) preferem construir o diagrama de equilíbrio já com o meio fermentado presente, como forma de se trabalhar com valores de equilíbrio mais coerentes com a situação na qual o SAB será aplicado.)

2.5.4 Considerações termodinâmicas da partição

Nos processos de transferência de solutos de uma fase para outra, é necessário ter controle sobre todos os parâmetros termodinâmicos que afetem o comportamento da partição. Como exemplo, durante os experimentos, o pH, a temperatura e a pressão devem permanecer constantes. Isso garante que o valor de K é devido somente à redistribuição do soluto entre as fases dos SABs (FRANCISCO, 2006).

A partição de um determinado soluto “s” de uma fase “β” para uma fase “α” se dá com a diminuição da energia livre de Gibbs do sistema. Assim, considerando que o soluto não muda a composição das fases (regime de diluição infinita), a única maneira para que tal fenômeno ocorra é com a diminuição do potencial químico “μ” do soluto nas fases.

O potencial químico pode ser definido como a variação de uma propriedade termodinâmica intensiva “Y” em função da variação do número de moléculas de um determinado componente, mantendo-se constantes outras propriedades termodinâmicas e o número de moléculas dos outros componentes presentes no sistema (FRANCISCO, 2006).

Um sistema bifásico estará em equilíbrio termodinâmico se o potencial químico do soluto “s” na fase “α” for igual ao potencial químico do soluto na fase “β”, conforme mostra a Equação 2.6:

$$\mu_s^\alpha = \mu_s^\beta \quad (2.6)$$

Dessa forma, o potencial químico do soluto “s” nas fases “α” e “β” é dado pelas Equações 2.7 e 2.8 respectivamente.

$$\mu_s^\alpha = \mu_s^{o,\alpha} + RT \ln a_s^\alpha \quad (2.7)$$

$$\mu_s^\beta = \mu_s^{o,\beta} + RT \ln a_s^\beta \quad (2.8)$$

Onde $\mu_s^{o, fase}$ é o potencial químico padrão do soluto “s” tendo como solvente cada uma das fases e a_s^{fase} é a atividade do soluto numa fase específica.

Considerando que o soluto esteja em regime de diluição infinita, a atividade torna-se igual a sua concentração numa determinada fase, conforme mostra a Equação 2.9:

$$a_s^{fase} = [\text{soluto}]^{fase} \quad (2.9)$$

Igualando as Equações 2.7 e 2.8 e rearranjando os termos, obtém-se a Equação 2.10:

$$\mu_s^{o,\alpha} - \mu_s^{o,\beta} = -RT \ln K_s \quad (2.10)$$

K_s é definido como a razão da densidade numérica do soluto na fase α em relação à fase β , conforme mostra a Equação 2.11:

$$K_s = \frac{[\text{soluto}]^{fase \alpha}}{[\text{soluto}]^{fase \beta}} \quad (2.11)$$

A diferença de potencial químico do soluto “s” entre as fases “ α ” e “ β ” é a variação de energia livre de Gibbs de transferência de 1 mol da espécie química “s” da fase “ β ” para a fase “ α ”, estando o soluto em regime de diluição infinita (Equação 2.12).

$$\Delta_r G = -RT \ln K_s \quad (2.12)$$

Por definição, a variação de energia livre de Gibbs de transferência é dada pela Equação 2.13:

$$\Delta_r G = \Delta_r H - T \Delta_r S \quad (2.13)$$

Pela Equação 12, a partir da medida do coeficiente de partição do soluto “s” em um determinado SAB, é possível calcular o correspondente valor da energia livre de Gibbs (FRANCISCO, 2006).

Se o valor de K for maior que a unidade, o soluto está sendo concentrado na fase superior.

Já a propriedade termodinâmica $\Delta_r H$ pode ser determinada se K for medido a diversas temperaturas e for aplicada a aproximação de Van't Hoff (Equações 2.14 e 2.15).

$$\ln K_i = a + b \left(\frac{1}{T} \right) + c \left(\frac{1}{T} \right)^2 + \left(\frac{1}{T} \right)^3 + \dots + \ln \Phi \quad (2.14)$$

$$\Delta_r H^o = -R \left[b + 2c \left(\frac{1}{T} \right) + 3d \left(\frac{1}{T} \right)^2 + \dots \right] \quad (2.15)$$

Como consequência, $\Delta_r S$ é conhecido pela diferença entre a variação de energia entálpica de transferência (Equação 2.15) e a variação da energia livre de Gibbs associada ao processo (Equação 2.12) na respectiva temperatura em que foi determinado o valor de K (Equação 2.11), assim, a variação de entropia é descrita pela Equação 2.16:

$$\Delta_r S^o = \frac{(\Delta_r H^o - \Delta_r G^o)}{T} \quad (2.16)$$

2.5.5 Fatores que afetam a partição em SABs

São muitas as variáveis que afetam a partição de um soluto em SABs. Dentre elas, podem ser citadas o tipo, a massa molecular e concentração dos polímeros que formam as fases; tipo e concentração de aditivos, pH e temperatura (ZASLAVSKY, 1995).

Apesar destas variáveis serem todas mutuamente dependentes e ainda não completamente compreendidas, torna-se necessário fazer a análise dos efeitos de cada uma delas separadamente (PEREIRA, 2005).

2.5.5.1 Efeito da composição do polímero

Num sistema polímero-polímero, o termo composição do polímero diz respeito a três variáveis diferentes (ZASLAVSKY, 1995). Assim, para cada um dos polímeros predominantes em cada uma das fases devem considerar-se o tipo ou estrutura química do polímero; a massa molecular e a concentração do polímero. A massa molecular não é considerada em SABs do tipo PEG-Sal (PEREIRA, 2005), pois há apenas um polímero no processo.

2.5.5.2 Efeito da massa molar dos componentes

Em um sistema PEG/sal, se a massa molar do PEG for elevada, a partição da proteína será mais favorável à fase salina. Caso a massa molar do PEG seja baixa, ocorrerá o oposto, sendo a partição favorável à fase polimérica. Isso ocorre provavelmente devido ao aumento do efeito do volume excluído que ocorre na fase PEG. Esse efeito é menor para substâncias de baixa massa molar. A massa molar da substância a ser separada também influencia em K , pois quanto maior for a molécula, maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema e, de acordo com as características da molécula e com o tipo de interação, ela será mais favorável a uma das fases (FERREIRA, 2007).

Lima *et al.* (2002), estudando a partição de pectinases em SABs formados por PEG-fosfato de potássio, utilizando PEGs com diferentes massas moleculares (entre 400 e 10000), verificaram que a maioria das pectinases concentravam-se na fase polimérica para sistemas

compostos por PEG 400, mas passaram a concentra-se mais na fase salina à medida que se aumentava o peso molecular do PEG. Em sistemas formados por PEG 10000, por exemplo, as poligalacturonases concentraram-se na fase salina.

O tipo de proteína também influi no valor de K, pois as proteínas são macromoléculas polieletrólitas que carregam cargas quando estão em soluções aquosas. As cargas dependem da composição, da seqüência de aminoácidos, e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos (FERREIRA, 2007).

2.5.5.3 Efeito de aditivos de baixa massa molar

Segundo Zaslavsky (1995), a adição de solutos de baixa massa molecular, quer iônicos (sais inorgânicos) quer não iônicos (uréia), afeta a partição de solutos nos SABs. Portanto, é possível que a partição de enzimas presentes em um extrato enzimático seja afetada pela presença de sais provenientes do tampão usado no processo de extração e por outras substâncias originadas durante o processo fermentativo e o metabolismo dos microrganismos.

2.5.5.4 Efeito do pH

O efeito da variação do pH de um meio tamponado não pode ser facilmente diferenciado da adição de sais. Esta situação prende-se com o fato de que, ao se variar o pH da solução, variar-se a razão entre a concentração dos sais com poder tamponante (ZASLAVSKY, 1995). Assim, podem ocorrer alterações nas propriedades do meio aquoso induzidas por uma dada variação de pH e/ou variação na composição do sal tampão correspondente. Por outro lado, moléculas como proteínas, peptídeos, entre outras, contêm uma grande variedade de grupos ácidos e básicos dependendo do pH do meio. O pH do meio altera, não só a carga superficial do soluto, como também induz alterações conformacionais do soluto, podendo ocorrer assim a associação e a dissociação de subunidades (PEREIRA 2005).

Trabalhando-se em um valor de pH próximo ao ponto isoelétrico (pI), onde a somatória de cargas da proteína é praticamente nula, existirá apenas o efeito do tamanho e concentração do polímero e do tamanho e composição da superfície da proteína, considerando-se apenas os efeitos eletrostáticos. (FORCINITI *et al*, 1991).

2.5.5.5 Efeito das características do soluto

Os efeitos do tamanho do soluto (massa molecular) e da sua estrutura química são bastante difíceis de distinguir (ZASLAVSKY, 1995). Zaslavsky *et al.*, (1986) constataram que a partição do PEG e do PVA era independente da massa molar do polímero para as gamas de massa molar estudadas (de 1500 Da até 40000 Da para o PEG e de 20000 Da até 100000 Da para PVA); por outro lado, verificaram que, para as poliacrilamidas o coeficiente de partição aumentava com a massa molecular. Para a polivinilpirrolidina o efeito observado foi contrário, ou seja, o coeficiente de partição diminuía com o aumento da massa molecular. Deste modo concluíram que a característica que influencia a partição do soluto é a sua estrutura química e não o seu tamanho (PEREIRA, 2005).

A influência da estrutura química da biomolécula parece ser explicada pela modificação (bio)química que a molécula pode sofrer (ZASLAVSKY, 1995), uma vez a partição é bastante específica, dependendo do tipo de biomolécula.

2.5.5.6 Tempo de separação das fases

O tempo de separação das fases após a mistura dos componentes depende do tipo de sistema. 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).

Outro fator que também influencia o tempo de separação é a 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. A posição em relação ao ponto crítico também exerce influência no tempo de separação das fases. Nos sistemas próximos ao ponto crítico, o tempo de separação é maior devido a uma 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 (FERREIRA, 2007).

2.6 PEG e fosfato de potássio

2.6.1 Polietilenoglicol (PEG)

O polietilenoglicol, $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, é um poliéster sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, disponível numa grande variedade de pesos moleculares, de poucas centenas a milhares de Daltons. Solubiliza-se em água e em diferentes solventes orgânicos (FERREIRA, 2007). A designação PEG é usada para compostos de baixa massa molar (menos de 20.000g/mol) e a designação PEO (polióxido de etileno) é restrito para compostos de altas massas molares (maiores que 20.000g/mol). Os PEGs com massas molares menores que 10.000g/mol são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 10.000g/mol, são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. Podem ser estocados à temperatura ambiente, embora a 4°C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada (PORTO, 2004).

A utilização do PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não é problemática para o meio ambiente. O PEG possui uma variedade de propriedades pertinentes para aplicações biomédicas, são elas: insolubilidade em água a elevadas temperaturas, forma complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucleicos (PORTO, 2004). Sendo não antigênico nem imunogênico foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para várias aplicações farmacêuticas, biológicas e bioquímicas (FERREIRA, 2007).

2.6.2 Fosfato de potássio

De acordo com Ferreira (2007), os fosfatos são sais inorgânicos, amplamente conhecidos. São utilizados em sistemas bifásicos aquoso do tipo polímero/sal e, portanto, formam duas

fases na presença do polímero. Além disso, apresentam menor custo em relação à dextrana e maior facilidade de utilização industrial.

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

O fosfato de potássio dibásico anidro tem massa molar 171,18 g/mol e sua fórmula molecular é K_2HPO_4 . Em solução a 5% e temperatura de 25 °C seu pH fica entre 8,5 a 9,6 e apresenta cinética de dissolução em água mais rápida que o monobásico. Os sais de fosfato apresentam um baixo custo, por isso o seu grande uso em sistemas de duas fases aquosas (FERREIRA, 2007).

Capítulo 3

Material e Métodos

3. Material e métodos

Neste capítulo são descritas as metodologias de fermentação e caracterização físico-química do resíduo utilizado na fermentação semi-sólida, a matriz do planejamento experimental empregado no estudo da extração, bem como a metodologia de construção e caracterização dos SABs empregados nos ensaios de concentração e a forma de avaliação de seu desempenho no processo de recuperação de biomoléculas.

3.1 Tratamento do resíduo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

O resíduo agroindustrial do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) utilizado neste trabalho foi obtido a partir de frutos semi-maduros adquiridos na EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas) em Campina Grande – PB. Inicialmente, os frutos foram mergulhados por trinta minutos em água clorada. Em seguida, os frutos foram lavados em água corrente para total remoção de impurezas.

Após a lavagem, os frutos foram cortados e tiveram a polpa e as sementes removidas. A casca e o albedo foram recolhidos e triturados em um liquidificador industrial. O bagaço resultante desse processo foi posto para secar em secador de leito fixo (Figura 3.1), na temperatura de $(55 \pm 1) ^\circ\text{C}$ com vazão de ar de $1,1 \text{ m}^3/\text{s}$, até peso constante. Após a secagem, o resíduo seco foi moído em moinho de facas (modelo Marconi MA 048) e armazenado em recipiente plástico devidamente tampado, à temperatura ambiente.

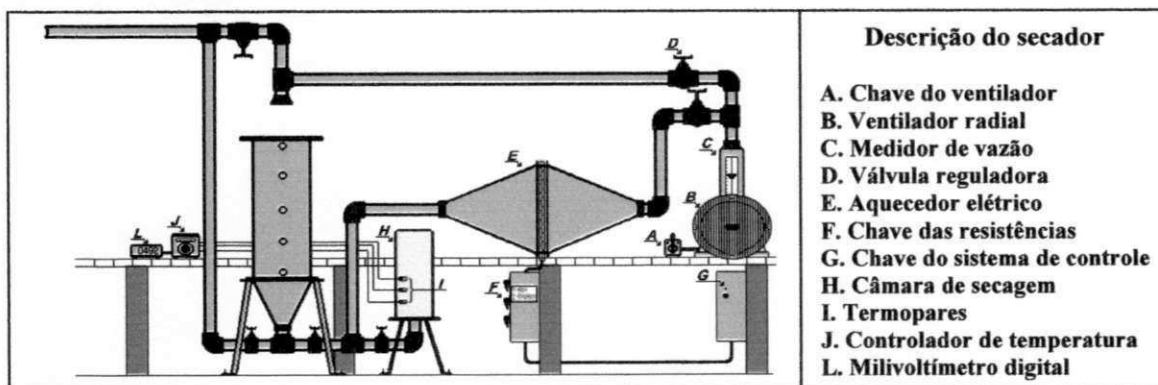


Figura 3.1. Esquema do secador de leito fixo (Fonte: Gouveia *et al.*, 2002).

3.2 Caracterização do resíduo seco

Para amostragem do resíduo seco, foi realizada a operação de quarteamento segundo a NP-1379 (NP, 1976) com o objetivo de se obter amostras representativas para a caracterização do resíduo. O resíduo seco e moído foi cuidadosamente misturado para evitar que partículas menores ficassem agregadas umas às outras. Após a mistura, o resíduo foi amontoado em forma de cone, o qual foi achatado e dividido em quatro partes iguais. As duas partes diagonalmente opostas foram recolhidas, constituindo a amostra reduzida. Um novo cone foi construído com as partes recolhidas, o qual foi novamente achatado, recolhendo-se novamente duas partes diagonalmente opostas. Este processo foi repetido até a obtenção da quantidade de material requerida para as análises.

Foram realizadas análises de granulometria, densidade aparente, densidade real, porosidade, pH, cinzas, umidade, sólidos solúveis (SS), açúcares totais (AT), açúcares redutores (AR), e pectina. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.1 Granulometria

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada com um conjunto de peneiras Produteste, com malhas de 14, 20, 24, 35, 42, 65 e 115 mesh. Após pesagem das peneiras vazias e empilhamento das mesmas no agitador, foram colocados 110 g do resíduo na peneira superior. O conjunto de peneiras foi agitado por 20 minutos na frequência 80 do agitador. O material retido em cada peneira teve sua massa determinada. Os resultados foram expressos como frações percentuais da massa de resíduo inicialmente utilizada para a análise.

3.2.2 Densidade aparente

A densidade aparente do material foi determinada através da adição de 30 gramas do resíduo em uma proveta de 100mL, na qual foi lido o volume ocupado pela amostra. O resíduo foi adicionado suavemente, para evitar compactação. Através da Equação 3.1 foi calculada a densidade aparente:

$$\text{densidade aparente} = \frac{\text{massa, g}}{\text{volume ocupado, cm}^3} \quad (3.1)$$

3.2.3 Densidade real

A densidade real do resíduo seco foi determinada a partir da relação entre a massa e o volume da amostra, determinado pelo deslocamento de óleo de soja em uma proveta graduada. Utilizou-se o óleo de soja porque ele é um líquido viscoso, capaz de cobrir a superfície das partículas sem penetrar em seus poros. Além disso, o óleo não dissolve o resíduo, sendo, portanto, adequado à medição do volume total das partículas. Inicialmente, o óleo foi colocado na proveta e seu volume foi lido e anotado (V1). A seguir, foram colocados na proveta com óleo 30 gramas do resíduo. Pela ação da gravidade, as partículas do resíduo foram se depositando no fundo da proveta, deslocando o óleo. Após total deposição, fez-se a leitura do novo volume indicado pelo nível do óleo (V2). A diferença (V2 – V1) foi denominada de volume do resíduo.

Através da Equação 3.2 foi determinada a densidade real do resíduo:

$$\text{densidade real} = \frac{\text{massa, g}}{(V_2 - V_1), \text{cm}^3} \quad (3.2)$$

3.2.4 Porosidade

A porosidade do resíduo foi calculada da seguinte forma (Equação 3.3):

$$\text{porosidade} = 1 - \frac{\text{densidade aparente}}{\text{densidade real}} \quad (3.3)$$

3.2.5 pH

A determinação do pH foi baseada na metodologia descrita em BRASIL (2005). Em 20 mL de água destilada, foi adicionado 1 g de resíduo. Após completa homogeneização (em

agitador mecânico por 30 minutos), seguida de filtração em algodão, realizou-se a medida do pH com um pHmetro (modelo Tecnal TEC-2) previamente calibrado com tampões de pH 4,0 e pH 7,0.

3.2.6 Cinzas

Para a determinação de cinzas, utilizou-se a metodologia descrita em BRASIL (2005). Cadinhos de porcelana vazios foram previamente colocados na mufla e deixados a 550 °C por duas horas. Depois, foram transferidos para um dessecador para que resfriassem até a temperatura ambiente, e em seguida foram pesados. Em cada um dos cadinhos, foram colocados 2 g da amostra do resíduo. Após incineração do resíduo com um bico de Bunsen, os cadinhos foram levados à mufla a 550 °C, durante cinco horas. Após este tempo, os cadinhos foram novamente deixados em dessecador para esfriarem à temperatura ambiente e, em seguida, pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem (m/m).

3.2.7 Umidade

Para análise da umidade, seguiu-se o procedimento de Brasil (2005) a partir da diferença de massa entre a amostra úmida e a seca em estufa. Pesou-se 5 g da amostra em recipientes previamente tarados, os quais permaneceram na estufa à temperatura de 105 °C, até peso constante. Após a secagem, as amostras foram transferidas para um dessecador, onde esfriaram até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, a massa dos recipientes contendo o resíduo seco foi pesada em balança analítica, e o resultado expresso em porcentagem (m/m).

3.2.8 Sólidos solúveis

A determinação da quantidade de sólidos solúveis foi realizada segundo a leitura do °Brix, medida diretamente em refratômetro de Abbé (modelo Analytik Jena), segundo o procedimento descrito em BRASIL (2005). Misturou-se 1 g da amostra a 20 mL de água destilada. Após homogeneização, a suspensão ficou em repouso por 30 minutos, sendo em

seguida filtrada com algodão e levada ao refratômetro para a leitura do ^oBrix. O valor obtido foi multiplicado pelo fator de diluição.

3.2.9 Açúcares redutores

Os grupos redutores foram quantificados com base na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS), simultaneamente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Esse procedimento foi descrito por Miller (1959).

Para a quantificação dos açúcares redutores (AR), uma quantidade definida da amostra foi adicionada a um volume definido de água. A mistura ficou sob agitação mecânica por 30 minutos. Passado esse período, a mistura foi filtrada com algodão e o filtrado foi recolhido para a análise. Transferiu-se 1 mL do filtrado para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução DNS. Em seguida, os tubos ficaram em banho de água fervente por exatos 5 minutos. Passado esse tempo, os tubos foram retirados do banho e resfriados em banho de água à temperatura ambiente. Após resfriarem, foram adicionados 8 mL de água destilada a cada tubo. Após agitação dos tubos em um vórtex, realizou-se a leitura da absorbância das amostras em um espectrofotômetro (modelo Bel Photonics SP 2000 UV) a 540 nm.

Os resultados foram expressos em gramas de açúcares redutores por 100 gramas de amostra inicial ($g_{AR}/100 g_{amostra}$), equivalente à porcentagem.

3.2.10 Açúcares totais

A determinação de AT foi realizada conforme o método utilizado por Correia (2004). Após a diluição, fez-se a hidrólise ácida da amostra com a adição de ácido clorídrico (HCl) 2N, seguida de aquecimento por 5 minutos em banho de água fervente. Após resfriamento, a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) a 1 N. Depois, seguiu-se a mesma metodologia utilizada para a determinação de açúcares redutores, com a transferência de 1 mL da solução para tubos contendo 1 mL de DNS, aquecimento, adição de água e leitura.

Os resultados foram expressos em gramas de açúcares totais por 100 gramas de amostra inicial ($g_{AT}/100 g_{amostra}$), equivalente à porcentagem.

3.2.11 Pectina

Para a determinação de pectina no resíduo, foi utilizado um procedimento baseado na metodologia descrita por Rangana (1979). Em 20 gramas do resíduo, foram adicionados 400 mL de HCl 0,05 N em bécker de vidro. O bécker ficou sob aquecimento por duas horas, substituindo-se a água perdida por evaporação para que o volume inicial permanecesse constante. Após esse período, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente, diluída para 500mL e filtrada com filtro de algodão. O filtrado foi recolhido e dividido em duas partes (duplicata), às quais foram adicionadas 200 mL de água. O ácido presente em cada amostra foi neutralizado com NaOH 1N. A neutralização foi verificada com potenciômetro digital. Após a elevação do pH pouco acima de 7,0; as amostras receberam um excesso de 10mL de NaOH, e foram deixadas em repouso por doze horas. Passado esse tempo, sob agitação constante, adicionou-se ácido acético (CH₃COOH) 1 N e após 5 minutos, cloreto de cálcio (CaCl₂). A amostra foi então levada à ebulição por dois minutos e, após ficar em repouso por duas horas, foi filtrada a vácuo em papel Whatman 40 previamente lavado com água destilada, seco em estufa a 105 °C por duas horas e pesado. O papel de filtro com o precipitado recolhido foi deixado em estufa a 40°C por 12 horas, quando foram resfriadas em dessecador e pesadas. O teor de pectina foi calculado pela porcentagem de pectato de cálcio (Equação 3.4):

$$\% \text{Pectato de cálcio} = \frac{\text{Peso do pectato de cálcio} \times 500 \times 100}{\text{Volume do filtrado} \times \text{peso da amostra}} \quad (3.4)$$

3.3 Condições operacionais da fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida foi conduzida segundo os parâmetros otimizados por Souza (2008), que determinou como melhores condições para produção de poligalacturonases utilizando resíduo de maracujá um meio com 40% de umidade, 1% de fonte de nitrogênio, 10⁷ de esporos de *Aspergillus niger* por grama de meio e um tempo de fermentação de 66 horas à temperatura de 30°C.

3.3.1 Restabelecimento da umidade do meio

De posse da umidade do resíduo estocado, foi calculada a quantidade de água que deveria ser adicionada para que o resíduo apresentasse umidade de 40% através de um balanço de massa segundo a Equação (3.5):

$$m_{H_2O} = m_{RES} \frac{(u_2 - u_1)}{(1 - u_2)} \quad (3.5)$$

Onde:

m_{H_2O} = Massa de água requerida para hidratação do meio (g)

m_{RES} = Massa de resíduo seco tomado para fermentação (g)

u_1 = Umidade presente no resíduo seco (%)

u_2 = Umidade requerida pelo processo fermentativo (%)

Obs.: u_1 e u_2 expressos em valores decimais

Considerando a densidade da água como sendo igual a 1g/cm^3 , mediu-se em uma proveta o volume de água equivalente à massa de água requerida.

Na ocasião da hidratação do resíduo, a massa de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) requerida, na quantidade de 1% em relação à massa total do meio a ser preparado para fermentação foi dissolvida no volume de água que seria adicionado. A água foi então despejada na massa de resíduo, o qual foi homogeneizado com o auxílio de uma espátula de metal, em bécker plástico de 1L de capacidade. Após homogeneização, o bécker contendo o meio hidratado foi coberto com filme de PVC e guardado em geladeira por 24 h.

3.4 Microrganismo e inóculo

O microrganismo utilizado na fermentação semi-sólida do resíduo do maracujá foi o fungo filamentosso *Aspergillus niger* mutante CCT 0916, pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza-CE, e conservado no Laboratório de

Engenharia Bioquímica (LEB/UAEQ/UFCG), em tubos de ensaio com tampas rosqueadas contendo solo estéril, mantidos a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ em freezer.

Os conídios foram ativados em duas etapas, utilizando o meio básico conforme Couri (1993), com a seguinte composição: pectina cítrica (10 g/l), NaNO_3 (3 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), MgSO_4 (0,5 g/l), KCl (0,5 g/l), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/l) e ágar-ágar (20 g/l). O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 0,5 atm e depois posto para resfriar a temperatura ambiente, com os tubos inclinados. Após esfriamento e solidificação do meio de cultura, os tubos foram envolvidos em filme de PVC e acondicionados em geladeira (5°C).

Os esporos foram transferidos do solo estéril para o meio básico por meio de uma alça de platina. Os tubos contendo o meio básico com os esporos foram incubados por cinco dias em estufa a $(30 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ e foram denominados de primeiro repique. Os microrganismos produzidos no primeiro repique foram utilizados para a obtenção de um segundo repique, transferindo-se os esporos gerados no primeiro repique para tubos contendo o meio básico estéril. A incubação foi realizada nas mesmas condições do primeiro repique. Os esporos produzidos no segundo repique foram utilizados para obtenção de grande quantidade de esporos por meio da inoculação em sabugo de milho. O meio de sabugo de milho foi preparado a partir de sabugos previamente cozidos e triturados. O meio recebeu uma solução umidificante contendo peptona e foi autoclavado por 30 minutos a 1 atm antes da inoculação. Qualquer um dos repiques pôde ser utilizado por até quatro meses, desde que armazenado em geladeira.

3.5 Processo fermentativo

O processo fermentativo foi realizado em erlenmeyers plásticos de 250 mL contendo 10 g do substrato previamente hidratado e suplementado com sulfato de amônio.

3.5.1 Esterilização do meio

Os erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão envolvido com gaze e autoclavados por 5 minutos a 0,5 atm. Na ocasião, também foram esterilizadas a solução de

Tween 0,3%, as pipetas, funis, provetas, gaze, bastões e béckers que seriam utilizados posteriormente.

Após esterilização, os erlenmeyers foram resfriados à temperatura ambiente, assim como a solução de Tween 80 (polisorbato).

3.5.2 Obtenção da suspensão de esporos e quantificação

A suspensão de esporos para inoculação foi obtida adicionando-se 40 mL de solução de Tween 80 (0,3% v/v) nos frascos de sabugo de milho com esporos. Após agitação para liberação dos esporos, a mistura foi filtrada com o auxílio de gaze estéril e funil para separação das partículas de sabugo. O filtrado rico em esporos foi recolhido em um bécker de 100mL.

Para a quantificação do número de esporos obtidos na suspensão, foi realizada uma contagem utilizando uma câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico.

Inicialmente foi feita uma diluição para facilitar a visualização e contagem dos esporos presentes na câmara de Neubauer. Procedeu-se a diluição da seguinte forma: 1 mL da suspensão de esporos foi adicionado a 39 mL de Tween 80 0,3% (v/v) estéril. Após homogeneização, uma alíquota da mistura foi recolhida e transferida para a câmara de Neubauer, procedendo-se a contagem no microscópio com aumento de 400 vezes. Foram contados 5 dos 25 quadrículos do quadrante central da câmara e o número de esporos foi calculado pela Equação 3.6 (ALMEIDA, 2007).

$$\text{Contagem de esporos} = \frac{\sum nq \times 25 \times fd \times 10^4}{n} \quad (3.6)$$

Onde:

$\sum nq$ – Soma algébrica do número de esporos contados nos n quadrículos

25 – Número total de quadrículos na câmara

fd – Fator de diluição utilizado

10^4 – Constante padrão da câmara

N – Número de quadrículos contados, dentro dos 25 disponíveis.

De posse da concentração de esporos, foi possível calcular o volume a ser tomado da suspensão para inoculação de 10^7 esporos por grama do meio de fermentação (Equação 3.7).

$$V = \frac{\text{Conc. de esporos desejada} \times \text{massa de substrato}}{\text{contagem de esporos}} \quad (3.7)$$

No caso deste trabalho:

Conc. de esporos desejada: 10^7 esporos/mL

Massa de substrato: 10g

3.5.3 Inoculação do meio

Os esporos foram inoculados a cada erlenmeyer contendo o meio de fermentação. Os erlenmeyers foram agitados e incubados em estufa. No interior da estufa, foi colocado um recipiente com água, para manter a umidade relativa, a qual permaneceu em torno de 65%. A temperatura da estufa foi fixada em 30 °C, sendo esta a temperatura média anual da região e também favorável ao desenvolvimento do microrganismo (SOUZA, 2008). A umidade relativa dentro dos erlenmeyers permaneceu em torno de 95%.

O processo fermentativo teve duração de 66 horas, tempo estabelecido por Souza (2008) como suficiente para a obtenção de poligalacturonases nas condições de fermentação aqui utilizadas.

3.6 Extração das enzimas

Com o objetivo de avaliar a extração das poligalacturonases produzidas na fermentação semi-sólida a partir do meio fermentado, foram testados diferentes valores de tempo de contato (TC), relação (RE) e agitação (AG) para a operação de lixiviação segundo um planejamento experimental. A temperatura foi mantida constante em $(35 \pm 0,5)$ °C, temperatura essa determinada por Souza (2008) como sendo a temperatura na qual a atividade

enzimática é elevada e estável. Da mesma forma, o pH do solvente foi mantido constante em 4,5; pois a enzima apresenta boa atividade e estabilidade nesse valor de pH (Souza, 2008).

3.6.1 Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, realizados em três blocos, segundo a agitação empregada.

As variáveis independentes foram: a agitação do meio (rpm), o tempo de contato entre o solvente e o meio fermentado e a relação volume de solvente/massa de substrato.

A matriz de planejamento experimental está apresentada na Tabela 3.1. Na Tabela 3.2 são exibidos os valores das variáveis independentes, correspondentes aos níveis do planejamento experimental. O planejamento fatorial foi analisado com o auxílio do software Statistica 5.0.

Tabela 3.1. Matriz de planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central.

Ensaio	Agitação (AG) (rpm)	Tempo (TC) (minutos)	Relação (RE) (mL/g)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela 3.2. Valores utilizados nos ensaios para cada nível.

Variável	Nível		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
AG (rpm)	50	100	150
TC (min)	15	30	45
RE (mL/g)	5	7,5	10

3.6.2 Processo extrativo

Após as 66 horas de fermentação, os erlenmeyers foram retirados da estufa, receberam o volume de tampão acetato de sódio 200 mM de pH 4,5 (solvente), segundo planejamento, e foram colocados em uma incubadora (shaker) modelo Marconi MA 420, com temperatura estabilizada em $35 \pm 0,5$ °C.

Foram programados no equipamento a agitação (AG) e tempo pelo qual o erlenmayer permaneceria em seu interior (TC). Tendo terminado o tempo programado, os erlenmeyers foram retirados do shaker. Com o auxílio de filtros de algodão, o caldo fermentado (extrato) em cada erlenmeyer foi recolhido, resfriado a ± 4 °C e, em seguida, centrifugado a 700 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido. Uma alíquota foi reservada para análise de atividade poligalacturonásica e o restante foi estocado em freezer (-18 °C).

3.6.3 Análise da atividade poligalacturonásica

A atividade poligalacturonásica dos extratos foi determinada conforme Couri (1993), seguindo a adaptação da Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza/CE.

Em tubos de ensaio contendo 4 mL de solução de ácido poligalacturônico 0,25% m/v, preparado em tampão acetato 200 mM pH 4,5 previamente aclimatado em banho termostático (modelo Biotech Thermomix BB) a 35°C, adicionou-se 0,25 mL do extrato enzimático, seguindo a reação por 30 minutos a 35°C. Após os 30 minutos, transferiu-se a 0,25 mL da mistura reacional para tubos contendo 1 mL do reagente DNS, aos quais foram adicionados 0,75 mL de água. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100 °C por 5 minutos. Depois de resfriados a temperatura ambiente, foram adicionados 8 mL de água destilada a cada um dos tubos, e após homogeneização em vórtex, leu-se a absorbância de cada amostra em

espectrofotômetro a 540 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata, assim como os ensaios em branco, preparados segundo o mesmo procedimento, no entanto, o extrato enzimático foi adicionado à solução de ácido poligalacturônico e imediatamente transferido para os tubos contendo o DNS. Uma unidade de atividade poligalacturonásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturônico por minuto de reação, nas condições do ensaio, conforme Equação (3.8).

$$\text{atividade de PG} \left(\frac{U}{\text{g de meio fermentado}} \right) = \frac{(ABS_{amostra} - ABS_{Branco}) \times 17 \times 4 \times f}{192 \times t} \times RE \quad (3.8)$$

Onde:

ABS amostra – Absorbância da amostra

ABS branco – Absorbância do branco

f – Fator de conversão da curva padrão de ácido galacturônico

17 – Diluição da enzima no meio reacional

4 – Diluição dos grupos redutores no reagente DNS

t – Tempo de reação (no caso deste trabalho, *t* = 30 minutos)

192 – Massa molar do ácido galacturônico (g/mol)

RE – Relação solvente/massa utilizada na lixiviação (mL/g)

3.7 Sistemas bifásicos

O estudo da concentração da enzima poligalacturonase foi realizado utilizando-se sistemas bifásicos do tipo PEG-sal, formados por PEG 10000 e tampão fosfato de potássio.

O PEG 10000 foi doado por uma indústria de adesivos da região. Já os sais fosfato monobásico de potássio e fosfato bibásico de potássio foram adquiridos em grau analítico, da marca Cromoline.

Também foi adquirida pectinase pura produzida por *Aspergillus niger* da marca SIGMA, com atividade de 1U/mg.

3.7.1 Preparação dos reagentes

Inicialmente foram preparadas soluções estoque dos reagentes formadores dos SABs. As soluções foram preparadas com o auxílio de um agitador magnético, até completa dissolução dos solutos, e tiveram seus valores de pH medidos com pHmetro previamente calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0.

O PEG 10000, de qualidade comercial, em escamas, foi previamente seco em estufa a 50°C até peso constante. Após secagem e resfriamento em dessecador, foi preparada uma solução de PEG 10000 a 50% em massa, utilizando-se água deionizada. A solução resultante apresentou pH igual a 7,0.

Os sais foram previamente secos em estufa a 105 °C por 24 horas. O tampão fosfato de potássio foi preparado utilizando-se uma mistura de fosfato de potássio bibásico e monobásico, ambos anidros. A relação entre as massas dos sais, $w_1(K_2HPO_4) / w_2(KH_2PO_4)$, foi obtida pela equação de Henderson-Hasselbach (Equação 3.9), de forma a se obter o pH desejado. Por exemplo, para preparar uma solução a 40% w/w com pH 7,0; a razão entre as massas dos sais deve ser de 1,807 (Da SILVA, 1994). Eventuais ajustes de pH foram feitos adicionando-se soluções de fosfato de potássio monobásico ou bibásico a 40%, conforme o pH estivesse maior ou menor que o desejado respectivamente, ao tampão sob agitação com monitoração do pH.

$$pH = pKa + \log \frac{w_1}{w_2} \quad (3.9)$$

3.7.2 Determinação dos diagramas de equilíbrio

Para utilização de SABs se faz necessária a determinação dos diagramas de equilíbrio, que mostrarão as condições em que o SAB pode ser empregado. Os ensaios de partição e caracterização das fases foram feitos em triplicata.

3.7.2.1 Obtenção das curvas binodais

As curvas binodais foram obtidas através de técnica turbidimétrica (CARVALHO, 2007; BERTOLUZZO, 2005), na temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. Em um tubo de ensaio de 35 mL, adicionou-se cerca de 1,5 g da solução mãe de PEG 10000. A esta solução, foram adicionadas alíquotas de 10 µl da solução mãe do sal, com o auxílio de uma micropipeta, até o surgimento de uma turvação persistente. Após cada adição de sal, o sistema era agitado em um vórtex (modelo Phoenix AP56) e tinha sua massa medida e anotada. As concentrações dos dois componentes imediatamente antes da aparição de turbidez foram tomadas como um ponto da curva binodal e foram calculadas a partir das concentrações iniciais das soluções, da massa inicial e final do sistema após cada adição. Ao mesmo sistema, foi adicionado cerca de 0,5 mL de água deionizada para torná-lo novamente homogêneo. A nova massa do sistema foi medida, e a massa da água adicionada calculada por diferença. Foram adicionados novos incrementos da solução salina até nova turvação, seguida pela adição de água. Esse procedimento foi realizado até obter-se pelo menos 15 pontos. O procedimento foi realizado também adicionando-se alíquotas de PEG 10000 a uma massa conhecida de solução salina, para determinar a região inferior da binodal.

Para verificar se a utilização do extrato da fermentação nos SABs altera as condições de equilíbrio do sistema ternário água + PEG 10000 + tampão fosfato, uma outra curva binodal foi obtida segundo o mesmo procedimento, porém, ao invés da adição de 0,5 mL de água deionizada, adicionou-se 0,5 mL de extrato.

3.7.2.2 Preparação dos sistemas aquosos bifásicos

Após a determinação das curvas binodais, foram preparados sistemas aquosos bifásicos para a determinação dos dados de equilíbrio em tubos de centrifuga graduados de 15mL. O procedimento de preparação dos SABs foi baseado no método adotado por Carvalho (2007).

Em ensaios preliminares, foram construídos vários SABs a partir de diferentes massas das soluções concentradas de PEG 10000, tampão fosfato e água destilada. Dentre os sistemas construídos, foram selecionados três SABs com composições diferentes, mas que tinham em comum a razão de fases igual a 1.

Os sistemas selecionados foram reproduzidos em triplicata, substituindo-se a água destilada por extrato da fermentação. Outros três sistemas foram construídos, utilizando-se uma solução de pectinase 0,1% m/v ao invés do extrato, a fim de se verificar a influência dos solutos presentes no extrato no diagrama de fases.

Após a adição das massas das soluções de PEG, tampão fosfato e extrato ou pectinase nos tubos de centrifuga, estes foram agitados em vórtex e colocados em banho termostático, mantendo sua temperatura controlada em $25 \pm 0,1$ °C durante 24 horas.

Os SABs tinham cerca de 16 gramas de massa total, cada um representando uma linha de amarração (tie-line), totalizando três linhas, para o estudo de partição das poligalacturonases.

3.7.2.3 Coleta das fases

Em cada um dos tubos utilizados como células de equilíbrio, foram marcadas as alturas referentes à interface e a superfície do sistema para posterior determinação do volume das fases.

O procedimento de coleta das fases foi realizado conforme o método descrito por Oliveira (2006). A fase superior de cada sistema foi coletada com o auxílio de uma seringa com agulha comprida, tomando-se o cuidado de deixar uma pequena camada desta fase, de pelo menos 5 mm acima da interface, para garantir que a interface não fosse perturbada.

A coleta da fase inferior foi realizada de forma semelhante, após 1 hora, tendo-se o cuidado de causar a menor perturbação possível à interface do sistema. Uma pequena bolha de ar foi mantida na agulha e expelida na fase inferior antes da coleta. A sucção foi feita vagarosamente, tomando-se o cuidado de que restasse ainda na célula de equilíbrio uma camada desta fase, evitando-se a sucção da fase superior. As amostras foram congeladas em freezer (-18°C) para posteriores análises.

3.7.2.4 Densidade das fases

A densidade das fases foi determinada através da pesagem de um volume conhecido de cada fase em balança analítica (modelo Shimadzu A4220) e calculada segundo a equação 3.10.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (3.10)$$

Em que:

ρ = densidade da fase (g/mL)

m = massa da alíquota tomada da fase (g).

V = Volume da alíquota tomada da fase (mL).

3.7.2.5 Determinação do volume das fases

Os tubos utilizados como células de equilíbrio foram lavados e secos, sem a remoção das marcas feitas anteriormente. Os tubos foram tarados em balança analítica e preenchidos com água até a altura correspondente à interface. Anotou-se a massa (equivalente ao volume da fase inferior). Mais água foi adicionada, até atingir a marca referente à superfície do sistema. A massa foi novamente anotada (massa total do sistema).

De posse do valor da massa total do sistema e da massa de água equivalente a fase inferior, por subtração, foi obtida a massa de água equivalente ao volume da fase superior.

Utilizando-se o valor da densidade da água tabelado na temperatura da análise, foi determinado o volume por ela ocupado em cada região do tubo, correspondente ao volume das fases.

Segundo Carvalho (2007), esse método é muito mais preciso que seguir marcações em mL presentes no tubo.

De posse dos volumes das fases, foi determinada a razão entre os volumes das fases superior e inferior (Equação 3.11):

$$\text{Razão entre as fases} = \frac{\text{Volume}_{\text{fase superior}}}{\text{Volume}_{\text{fase inferior}}} \quad (3.11)$$

3.7.2.6 Massa

A massa de cada fase foi calculada utilizando-se a equação 3.10 descrita anteriormente, substituindo-se os valores de densidade e volume previamente calculados.

3.7.2.7 Determinação do teor de água em cada fase

A quantidade de água presente na amostra foi determinada por meio de evaporação em estufa a 60°C, similar à determinação de umidade. Uma alíquota de cada fase foi transferida para cadinhos cerâmicos previamente tarados, que foram postos na estufa por 3 dias. Passado esse tempo, os cadinhos resfriaram em dessecador, foram pesados e retornaram à estufa para verificar se tinham atingido peso constante. Em seguida, a massa dos recipientes contendo o resíduo seco foi pesada em balança analítica, e o resultado expresso em porcentagem (m/m).

3.7.2.8 Determinação da concentração de sais

O método utilizado foi similar à determinação de cinzas. Os cadinhos utilizados para a determinação do teor de água presente em cada fase, foram levados à mufla para calcinação à 550 °C por 24 horas. A massa remanescente representava a massa de sais presentes na amostra.

3.7.2.9 Determinação da concentração de PEG

Uma vez determinado o teor de água e sais presentes na amostra, a concentração de PEG foi determinada por diferença.

No caso dos sistemas produzidos com extrato, os solutos orgânicos foram indistintamente determinados como polímeros e os inorgânicos como sais.

3.7.2.10 Determinação do comprimento e inclinação das tie-lines

O comprimento das linhas de amarração (CLA) foi definido pela Equação 3.12 (ANTOV *et al.*, 2004):

$$CLA = \left[(m_1^{\text{sup}} - m_1^{\text{inf}})^2 + (m_2^{\text{sup}} - m_2^{\text{inf}})^2 \right]^{1/2} \quad (3.12)$$

A inclinação das linhas de amarração (ILA) foi calculada segundo a Equação 3.13 (PEREIRA, 2005):

$$ILA = \frac{m_1^{sup} - m_1^{inf}}{m_2^{sup} - m_2^{inf}} \quad (3.13)$$

Onde m_i^{sup} e m_i^{inf} representam as porcentagens mássicas de cada componente i nas fases superior e inferior respectivamente.

3.7.2.11 Avaliação da dispersão dos valores de composição dos SABs

A dispersão nos valores de composição dos SABs foi medida utilizando-se o coeficiente de variação (CV). O coeficiente de variação é uma medida de dispersão empregada para estimar a precisão de experimentos e representa o desvio-padrão expresso como porcentagem da média (Equação 4.1):

$$CV = \frac{\text{desvio-padrão}}{\text{média}} \times 100\% \quad (3.14)$$

Caso CV seja superior a 10%, a dispersão é considerada alta (GOMES, 2000).

3.7.2.12 Determinação da atividade poligalacturonássica em cada fase

A determinação da atividade poligalacturonássica em cada fase foi idêntica à utilizada para a determinação da atividade no caldo fermentado, descrita no item 3.6.3, porém a variável RE adquiriu o valor 1mL, para representar a atividade por volume de amostra.

3.7.2.13 Determinação de proteínas em cada fase

A determinação do teor de proteínas em cada fase foi feita através do método do biureto. O reagente de biureto foi preparado através da dissolução de 150mg de CuSO₄, 600mg de tartarato duplo de sódio-potássio e 3g de NaOH em água destilada. A solução foi transferida para um balão de 100mL, completando-se o volume com água destilada (MARQUARDT, 2003).

Após a preparação do reagente, foi feita uma curva de calibração utilizando-se albumina bovina (BSA, da MERCK), como padrão, na concentração de 2mg/mL. Os padrões foram preparados diluindo-se a solução de albumina a 10%, 20%, 30% e assim por diante, até 90%; totalizando 10 amostras, com concentração variando entre 0,2 e 2 mg/mL.

Para a leitura dos padrões, 1mL de cada amostra foi adicionada a 1mL de água e 2 mL do biureto. Após 20 minutos de repouso à temperatura ambiente e protegidas da luz, mediu-se a absorbância das amostras em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. O branco foi preparado da mesma forma, porém a solução de albumina foi substituída por água destilada. Após as leituras, foi construída a curva de calibração, plotando-se a absorbância X concentração, originando uma reta cuja inclinação seria usada no cálculo da concentração de proteínas das amostras das fases.

As amostras das fases foram lidas da mesma forma que os padrões. Porém, como eram amostras com diferentes concentrações de sal e polímeros entre si, foi feito um branco para cada fase dos SABs, tomando-se ao invés de água destilada, 1mL de cada fase de SABs de mesma composição, porém sem extrato, apenas com PEG 10000, fosfato de potássio e água.

Um vez lida a absorbância das amostras, a concentração de proteínas foi determinada pela Equação 3.15:

$$C = Abs \times F \times d \quad (3.15)$$

Onde:

C = Concentração de proteínas solúveis na fase, em mg/mL

Abs = Absorbância das amostras em 540 nm.

F = Coeficiente angular da curva de calibração

d = Diluição sofrida pela amostra. Neste trabalho, *d* = 4

3.7.2.14 Determinação dos coeficientes de partição

Os coeficientes de partição foram determinados segundo Lima *et al.*, (2002). O coeficiente de partição (K) é definido como a concentração de proteína ou atividade enzimática na fase superior dividida pelo valor correspondente na fase inferior, como exibido nas Equações 3.16 e 3.17.

$$K_p = \frac{C_T}{C_B} \quad (3.16)$$

$$K_E = \frac{A_T}{A_B} \quad (3.17)$$

Onde C_T e C_B são as concentrações de proteína total em mg/mL nas fases superior e inferior, respectivamente, e A_T e A_B são as atividades enzimáticas nas fases superior e inferior, respectivamente.

3.7.2.15 Avaliação do processo de purificação

Para melhor avaliação do processo de purificação (ou concentração) das poligalacturonases nos SABs foi necessário o cálculo de outros parâmetros além dos coeficientes de partição. Foram eles: atividade enzimática específica (AS), expressa em U/mg); o fator de purificação (FP) e a recuperação de enzimas na fase superior (RT) e na fase inferior (RB) e o fator de concentração (FC) (LIMA *et al.*, 2002).

- A atividade enzimática específica da enzima em cada uma das fases foi determinada como (Equação 3.18):

$$AS_{fase} = \frac{A_{fase}}{C_{fase}} \quad (U / mg) \quad (3.18)$$

Onde A_{fase} e C_{fase} são a atividade enzimática em uma das fases e a concentração de proteínas naquela fase respectivamente.

- O fator de purificação da atividade enzimática em cada uma das fases foi calculada como (Equação 3.19):

$$FP_{fase} = \frac{AS_{fase}}{AS_{extrato}} \quad (3.19)$$

Onde $AS_{extrato}$ corresponde a atividade enzimática específica do extrato após a operação de lixiviação (recuperação das enzimas a partir do meio semi-sólido fermentado).

- O fator de concentração da atividade enzimática em cada fase foi determinada segundo a Equação 3.20.

$$FC_{fase} = \frac{atividade_{fase}}{atividade_{extrato}} \quad (3.20)$$

- A recuperação de atividade enzimática nas fases superior e inferior foram dadas através das Equações (3.21) e (3.22).

$$RT(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{V_b}{V_t} \cdot \frac{1}{K_e} \right)} \quad (3.21)$$

$$RB(\%) = \frac{100}{1 + K_e \cdot \frac{V_t}{V_b}} \quad (3.22)$$

Nas quais V_t e V_b são os volumes das fases superior e inferior, respectivamente.

- O balanço de atividade enzimática foi realizado de acordo com Porto (2004) (Equação 3.23):

$$\eta_a = \left[\frac{(A_{Sup}) + (A_{Inf})}{(A_{Inicial})} \right] \times 100\% \quad (3.23)$$

Onde:

A_{Sup} = atividade enzimática na fase superior multiplicada pelo volume dessa fase (U).

A_{Inf} = atividade enzimática na fase inferior multiplicada pelo volume dessa fase (U).

$A_{inicial}$ = atividade do extrato multiplicada pelo volume adicionado ao sistema (U).

η_a = balanço de atividade (%).

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

Neste capítulo serão exibidos e discutidos os resultados dos ensaios realizados. Primeiro serão apresentados os resultados da caracterização físico-química do resíduo agrícola do maracujá, seguidos dos referentes ao estudo de extração da enzima. Depois, serão exibidos os resultados da caracterização do sistema bifásico PEG 10000 – fosfato de potássio e dos ensaios de partição.

4.1 Caracterização do resíduo

Os resultados da caracterização do resíduo seco da casca e albedo do maracujá amarelo são exibidos na Tabela 4.1. A Figura 4.1 mostra a aparência do resíduo após processamento e secagem.

Tabela 4.1. Valores obtidos para os parâmetros analisados no resíduo (base seca).

Parâmetros analisados	Valor
Umidade (%)	6,045 ± 0,210
Cinzas (%)	6,865 ± 0,304
Pectina (% Pectato de Cálcio)	16,655 ± 0,247
AT (g _{AT} /100g amostra)	23,555 ± 1,244
AR (g _{AR} /100g amostra)	17,734 ± 0,600
Sólidos solúveis (°Brix)	30,000 ± 0,000
Densidade Aparente (g/cm ³)	0,345 ± 0,003
Densidade Real (g/cm ³)	1,133 ± 0,030
Porosidade	0,696
pH	3,770 ± 0,010



Figura 4.1. Resíduo seco do maracujá.

A umidade presente no resíduo após a secagem (6,05 %) é semelhante aos valores encontrados por Abud & Narain (2009), que foi de 8,85% e Córdova *et al.*, (2005), de 6,65%. Tal resultado indica que o resíduo pode ser armazenado por algum tempo (suficiente para realização das caracterizações e ensaios de fermentação) sem o perigo de sofrer deterioração por ataque microbiano, uma vez que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

estipula o máximo de 15 % (massa/massa) de umidade para conservação de farinhas (BRASIL, 2005). Além disso, o valor de umidade de 6,05 % representa baixa atividade de água no resíduo, o que impede o desenvolvimento de fungos e bactérias (SOUZA, 2008).

O resíduo apresentou teor de cinzas igual a 6,86%, semelhante ao encontrado por Souza (2008), de 6,33%, e superiores aos de Abud et al., (2009), que foi de 4,41%. Porém, esses valores são inferiores aos determinados por Córdova (2005), de 8,68%; e por Matsuura (2005), que encontrou um valor de 7,70% para o teor de cinzas. Contudo, o teor de cinzas obtido neste trabalho comprova que a casca do maracujá é uma boa fonte de minerais (KLIEMANN, 2006).

Com relação ao teor de pectina, o valor encontrado foi de 16,65 %, em pectato de cálcio. Tal valor é superior ao obtido por Souza (2008), que foi 13,10%. Segundo os estudos de Dartora et al., (1999), que estudaram a produção de pectinases utilizando fungos filamentosos, inclusive *Aspergillus niger*, utilizando farelo de trigo como principal fonte de carbono, um valor de 10% (massa/massa) de pectina no meio é ideal para induzir a produção de enzimas. De acordo com Fontana et al., (2005), até 16% de concentração de pectina no meio não gera efeito de repressão por parte deste componente na excreção das pectinases pelo fungo produtor. Portanto, é possível que o alto teor de pectina encontrado não tenha influência inibitória considerável sobre a produção de pectinases a partir do resíduo agroindustrial do maracujá.

O teor de açúcares totais (AT) encontrado no resíduo foi de 23,55 gramas para cada 100 gramas de resíduo em base seca (23,55%), semelhante ao obtido por Souza (2008), que foi de 20,8% e ao encontrado por Abud & Narain (2009) que foi de 20,31%.

O teor de açúcares redutores (AR) apresentado pelo resíduo seco foi de 17,73 gramas para cada 100 gramas de resíduo em base seca (17,73%). Segundo a literatura, altas concentrações de açúcar no meio não são desejáveis, pois o açúcar presente supre a necessidade dos microrganismos para seu crescimento, havendo pouca utilização da pectina no meio, o que resulta em baixa produção enzimática. Porém, quando a concentração de açúcar é baixa, o microrganismo necessita produzir enzimas para quebrar a molécula de pectina, de modo que possa ser consumida, o que resulta em alta atividade pectinolítica no meio (FAWOLE & ODUNFA, 2003). Fontana et al., (2005), produzindo PG por *Aspergillus niger*, em um meio a base de farelo de trigo, afirmaram que altas concentrações de glicose (acima de 10%) exercem efeito inibitório sobre a atividade enzimática. Portanto, o valor encontrado para o teor de AR pode ter efeito inibitório na produção de enzimas.

Na determinação de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), o valor encontrado foi de 30. Este valor é superior ao obtido por Souza (2008), que foi de 22,5.

O pH apresentado pelo resíduo seco foi 3,77; portanto, ácido. Esta condição é adequada para a adaptação do microrganismo ao meio, embora a maioria dos fungos desenvolva-se melhor em meios com o pH entre 4,0 e 5,0 (SANTOS, 2007).

A distribuição granulométrica do resíduo encontra-se representada no gráfico abaixo (Figura 4.2):

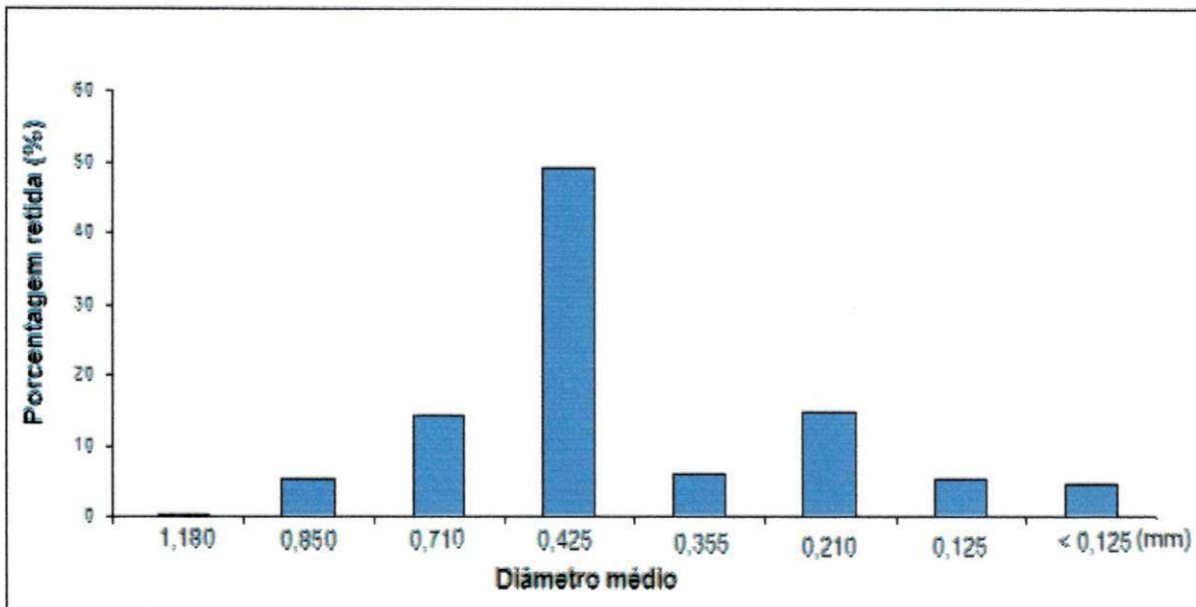


Figura 4.2. Distribuição granulométrica do resíduo de maracujá seco.

O gráfico mostra que 49% das partículas possuem tamanho entre 24 e 35 mesh, o que corresponde a valores de diâmetro entre 0,42 e 0,71mm, e os finos (< 0,125 mm) representam 4,66% da amostra.

Estudos realizados por Botella *et al.*, (2007), utilizando diferentes granulometrias de partículas para a produção de pectinases e xilanases (0,06 a 1,00 mm; 0,74 a 1,00mm e 1,00 a 1,60 mm) concluíram que o tamanho das partículas não tem influência significativa na produção de ambas as enzimas.

Porém, o tamanho das partículas influencia no processo de fermentação semi-sólida, pois partículas de reduzido tamanho, embora ofereçam maior área superficial ao ataque microbiano, tendem a compactar-se facilmente, dificultando a respiração e aeração do sistema. Já partículas maiores quando distribuídas nos reatores para a realização da FSS

promovem mais espaço interpartículas, porém prejudicam a absorção dos nutrientes por parte do microrganismo (SOUZA, 2008).

Nas operações de lixiviação, o tamanho das partículas influencia na recuperação do produto desejado, pois a redução do tamanho das partículas facilita o contato entre o soluto, que se encontra na fase sólida, e o solvente (fase líquida) o que incrementa a velocidade da transferência dos solutos para o solvente. Em fermentação semi-sólida, o alto teor de umidade do meio fermentado prejudica sua trituração ou moagem. Porém, quando os metabólitos são extracelulares não é necessária a alteração no tamanho de partícula do meio sólido fermentado. Além disso, o efeito mecânico produzido pela redução do tamanho de partícula poderia em alguns casos afetar a estrutura das enzimas e a sua atividade catalítica (FERNÁNDEZ, 2009). Portanto, a distribuição granulométrica do resíduo não interferirá na recuperação das enzimas.

De acordo com Pinto *et al.*, (2005), o substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais, para que o ar necessário ao desenvolvimento microbiano atravessasse os espaços vazios do meio.

Cerca de 10% das partículas apresentou tamanho inferior a 0,21 mm, o que justifica a porosidade encontrada (0,696). Tal porosidade é suficiente para favorecer a aeração do sistema, tornando disponível oxigênio suficiente para o desenvolvimento dos microrganismos.

A porosidade também está relacionada com a densidade real, cujo valor encontrado para este resíduo foi de 1,133 g/cm³. A densidade aparente (0,345 g/cm³) revela uma importante característica do resíduo, que é a tendência de não compactar-se completamente, gerando os espaços vazios entre suas partículas, suficientes para a respiração e o metabolismo do microrganismo.

Análises de atividade poligalacturonásica realizadas no resíduo seco não revelaram a presença de tais enzimas ativas no resíduo. Tal fato pode ser devido ao grau de maturação dos frutos utilizados no ensaio ou à possível desativação das enzimas durante o processamento do resíduo.

4.2 Processo fermentativo

Ao final das 66 horas, o meio apresentava em sua superfície uma camada uniforme de *Aspergillus niger* com corpos de frutificação e esporos negros visíveis, como exhibe a Figura 4.3:

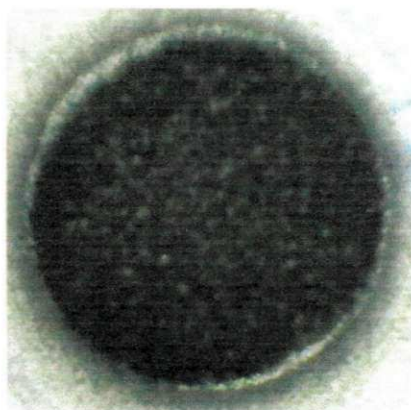


Figura 4.3. Aspecto do meio fermentado no interior do erlenmeyer após 66 horas

De acordo com Souza (2008), o tempo de 66 horas corresponde ao momento da fermentação em que se encontra o máximo de atividade poligalacturonásica no extrato com as condições aqui utilizadas. Após esse período, a atividade poligalacturonásica começa a decair.

4.2.1 Obtenção do extrato

A recuperação das poligalacturonases a partir do meio semi-sólido fermentado realizada por Souza (2008) consistia em adicionar 5 mL de tampão acetato de sódio pH 4,5 (solvente) para cada grama de meio fermentado nos erlenmeyers, deixando-os em repouso por 1 hora a 35 °C e recolhendo-se, em seguida os extratos através de filtração com algodão. Com o objetivo de aperfeiçoar tal processo e verificar a influência das variáveis: tempo de contato (TC), relação solvente/massa (RE) e agitação (AG) na recuperação das enzimas, neste trabalho, foi realizado um planejamento experimental para a operação de lixiviação, com o objetivo de determinar as condições operacionais que resultassem em extratos com máxima atividade enzimática.

4.2.2 Atividade poligalacturonásica

As leituras de atividade poligalacturonásica foram realizadas no momento em que o extrato foi obtido (após a filtração com algodão), para garantir um valor mais confiável de atividade, evitando assim que o processo de conservação do extrato via congelamento para

leituras posteriores levasse à obtenção de valores duvidosos, devido a possíveis desnaturações causadas pelo congelamento do extrato.

A Tabela 4.2 exibe os valores de atividade (APG) encontrados em cada um dos ensaios.

Tabela 4.2. Valores de atividade obtidos em cada ensaio.

ENSAIO	AG (rpm)	TC (min)	RE (mL/g)	APG (U/g)
1	-1 (50)	-1 (15)	-1 (5:1)	25,92
2	+1 (150)	-1 (15)	-1 (5:1)	24,59
3	-1 (50)	+1 (45)	-1 (5:1)	26,97
4	+1 (150)	+1 (45)	-1 (5:1)	26,68
5	-1 (50)	-1 (15)	+1 (10:1)	44,42
6	+1 (150)	-1 (15)	+1 (10:1)	48,60
7	-1 (50)	+1 (45)	+1 (10:1)	53,70
8	+1 (150)	+1 (45)	+1 (10:1)	38,39
9	0 (100)	0 (30)	0 (7,5:1)	36,10
10	0 (100)	0 (30)	0 (7,5:1)	34,62
11	0 (100)	0 (30)	0 (7,5:1)	39,58

Os resultados de atividade exibidos na Tabela 4.2 mostram variações entre 24,59 e 53,70 U/g, sendo que o valor médio dos pontos centrais (ensaios 9, 10,11) foi de 36,76 U/g. Os resultados exibidos na Tabela 4.2 mostram ainda que os maiores valores de atividade foram obtidos com RE = 10:1. Tanto os ensaios com RE = 7,5:1 como os ensaios com RE= 5:1, apresentaram atividades semelhantes, mesmo com valores de AG e TC diferentes. Os valores médios de atividade obtidos para ensaios com RE= 7,5:1 foi de 25,83 U/g e os valores médios para RE= 10:1 foram de 48,9 U/g. Os valores de atividade encontrados foram superiores aos de Souza (2008), que obteve extratos enzimáticos com atividade poligalacturonásica de 20,9U/g conduzindo a fermentação com os mesmos parâmetros da realizada neste trabalho, porém utilizando outro método de extração, como já citado, com RE=5:1. Valores semelhantes aos de Souza (2008) foram obtidos usando menores valores de RE (5:1), o que comprova a boa reprodutibilidade do processo fermentativo. Santos (2007) trabalhando nas mesmas condições, mas com pedúnculo de caju como substrato, conseguiu obter aproximadamente 16 U/g de atividade de PG. Pinto *et al.*, (2005), estudando a produção de

poligalacturonase a partir da fermentação semi-sólida de cascas de maracujá, obteve atividade de 21,85 U/g em condições de fermentação e extração diferentes das utilizadas neste trabalho.

Na Tabela 4.3 são exibidos o aumento de atividade enzimática em relação ao valor obtido por Souza (2008) em cada ensaio.

Tabela 4.3. Aumento obtido na atividade dos extratos em cada ensaio

Ensaio	Aumento (U/g)	Aumento (%)
1	5,02	24,02
2	3,69	17,66
3	6,07	29,04
4	5,78	27,66
5	23,52	112,54
6	27,7	132,54
7	32,8	156,94
8	17,49	83,68
9	15,2	72,73
10	13,72	65,65
11	18,68	89,38

Como exibido na Tabela 4.3, foram obtidos valores até 156,94% superiores aos de Souza (2008), com RE=10:1 mL/g, TC=45 minutos e AG=50 rpm.

A Figura 4.4 mostra o comportamento da variável resposta APG no extrato diante da variação dos demais parâmetros. Percebe-se um aumento na atividade a partir do quinto ensaio e uma queda na atividade a partir do oitavo ensaio. Os ensaios que resultaram em maiores atividades tiveram em comum a mesma RE.

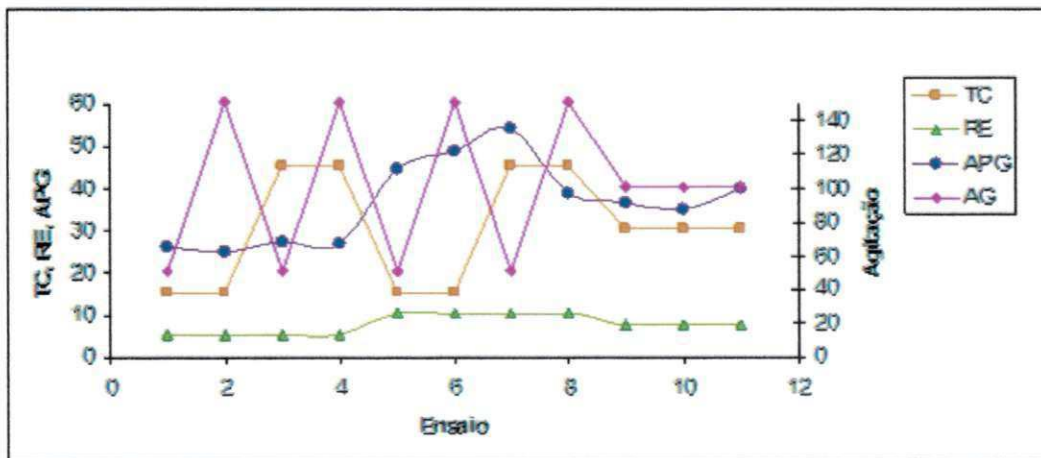


Figura 4.4. APG em função dos demais parâmetros estudados.

Como a simples observação da Figura 4.4 não permite verificar como a interação entre os demais parâmetros influencia na APG, foi realizada uma análise mais detalhada, por meio da metodologia da superfície de resposta, utilizando para isso o software Statistica® versão 5.0.

4.3 Análise do processo extrativo utilizando a metodologia da superfície de resposta

Utilizando a ferramenta de planejamento experimental e análise de superfície de resposta é possível investigar a influência de determinadas variáveis em um processo e a forma de interação entre estas variáveis, bem como obter o valor das variáveis que maximizem os resultados esperados.

Por meio do planejamento fatorial e análise de superfície de resposta, verificou-se a influência das três variáveis de entrada: AG, TC e RE sobre os valores da resposta APG, nos extratos obtidos.

A Tabela 4.4 apresenta o modelo de regressão, e os respectivos coeficientes de determinação para os dados de atividade poligalacturonásica fornecidos pelo software.

Tabela 4.4. Modelo de regressão.

Modelo	R ²
APG = 36,33 + 10,12 ×RE + 0,275×TC – 1,59×AG	0,87

Obs.: Os coeficientes em negrito são os estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

O coeficiente de determinação R² quantifica a qualidade do ajustamento, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas.

Como apenas os valores da média e do coeficiente de RE são estatisticamente significativos e o coeficiente de RE é muito maior que os outros, é possível que se possa desprezar os termos associados a TC e AG para melhorar o ajuste. Tal decisão foi tomada com base no diagrama de Pareto que apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes, considerando os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória. O diagrama de Pareto (Figura 4.5) mostra que, para o modelo de atividade da

poligalacturonase, o único efeito realmente significativo é RE. Neste caso a retirada de outros efeitos de menor valor contribui para um melhor ajuste do modelo.

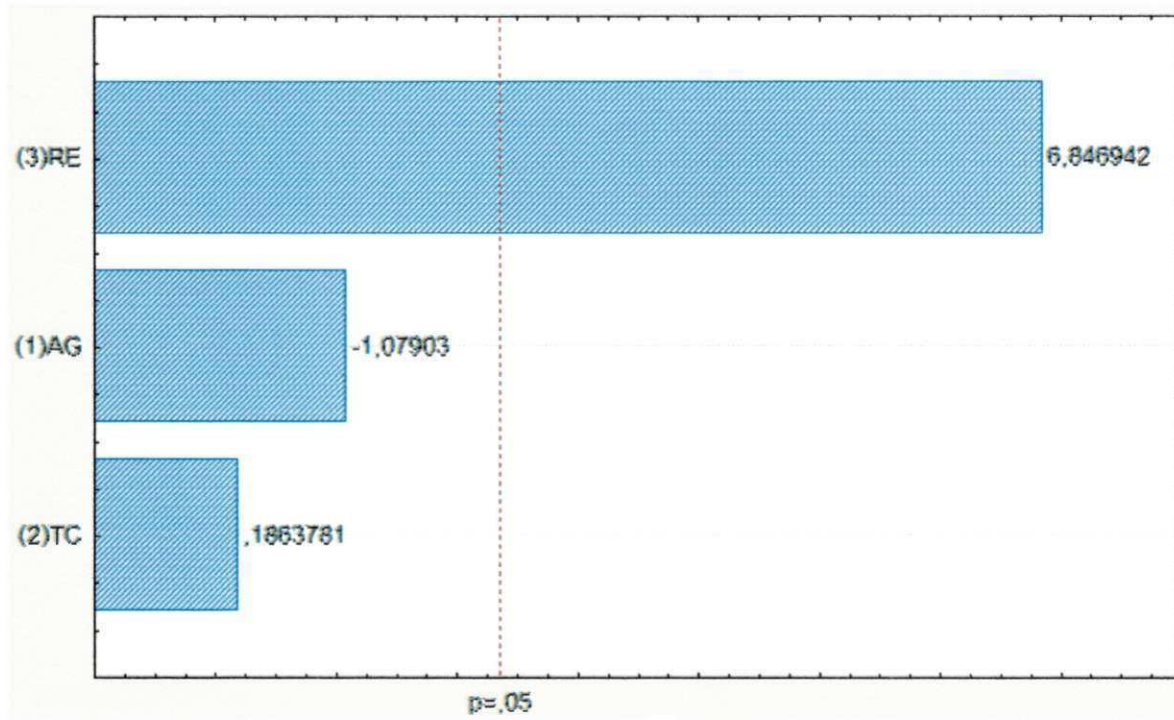


Figura 4.5. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos estimados

O modelo de regressão linear foi novamente testado, dessa vez ignorando as contribuições das variáveis TC e AG.

O modelo com melhor ajuste é portanto: $APG = 36,33 + 10,12 \times RE$, com $R^2 = 0,85$

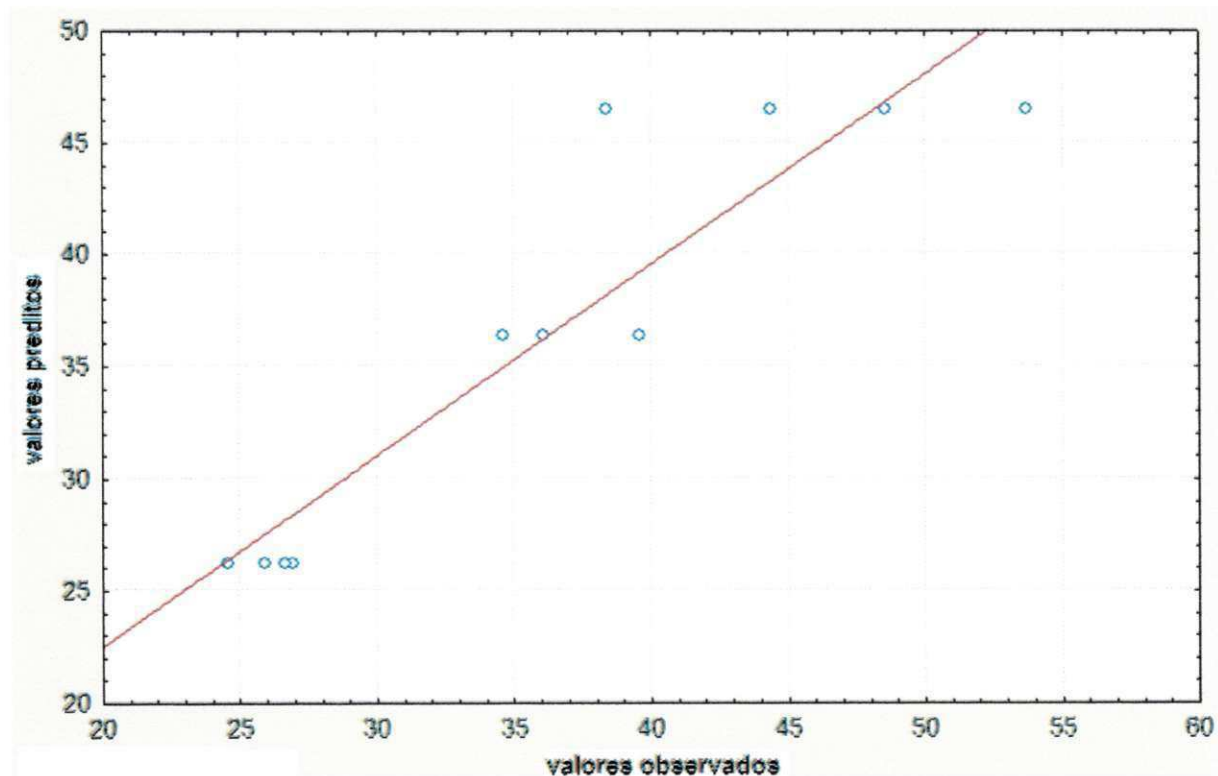
A Tabela 4.5 apresenta a análise de variância ANOVA para APG. Também exibe o resultado do Teste F. O teste F representa a razão entre o F calculado e o F tabelado. Sempre que esta relação for maior que 1 a regressão é estatisticamente significativa havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que 4,0 (BARROS NETO et al. 1995).

Tabela 4.5. Análise de variância ANOVA.

Fonte de variação	SQ	GL
Regressão	819,33	1
Resíduo	143,274	9
Total	962,6242	10
R ²	0,85114	
F _{tabelado (5%)}	5,117	
F _{calculado}	51,46032	
teste F	10,5	

Como o valor do teste F ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$) exibido na tabela acima é superior a 4,0; conclui-se que o modelo, além de estatisticamente significativo também é preditivo. Portanto o modelo pode ser usado para prever ou controlar o valor de APG mediante variação da RE, pelo menos na faixa dos valores testados.

A Figura 4.6 mostra a distribuição dos valores de APG observados em relação aos preditos pelo modelo. Apesar da dispersão, os valores observados estão distribuídos ao longo de uma reta, o que reforça o comportamento linear do modelo.

**Figura 4.6.** Valores observados X valores preditos

4.3.2 Construção das superfícies de resposta

As superfícies de resposta foram construídas de forma a representarem a influência das três variáveis estudadas no processo de extração (TC, AG, RE) na atividade poligalacturonásica do extrato (APG). A superfície de resposta é a descrição gráfica do modelo, o que simplifica a interpretação dos resultados.

A Figura 4.7 mostra a influência de TC e AG na atividade poligalacturonásica dos extratos obtidos. Percebe-se claramente que ambas as variáveis não têm influência significativa na atividade, principalmente o tempo de contato. Quanto à agitação, valores menores com maiores tempos de contato podem resultar em maior APG.

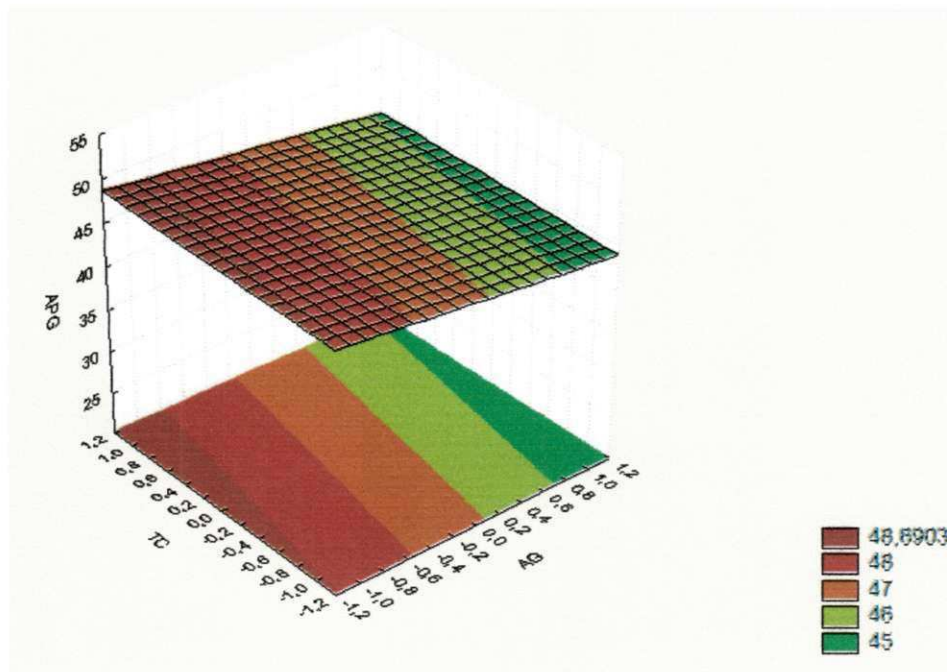


Figura 4.7. Influência do tempo (TC) e agitação (AG) na atividade (APG) dos extratos. RE fixado em 1

A Figura 4.8 exibe a influência de RE e AG na APG. Este gráfico confirma as discussões anteriores, de que a variável que mais influencia no valor da atividade poligalacturonásica é mesmo a relação (RE). Percebe-se também que valores menores de agitação contribuem para uma atividade levemente maior. É possível que altos valores de AG causem a desnaturação das enzimas, diminuindo assim a presença de enzimas ativas e, conseqüentemente, a atividade nos extratos.

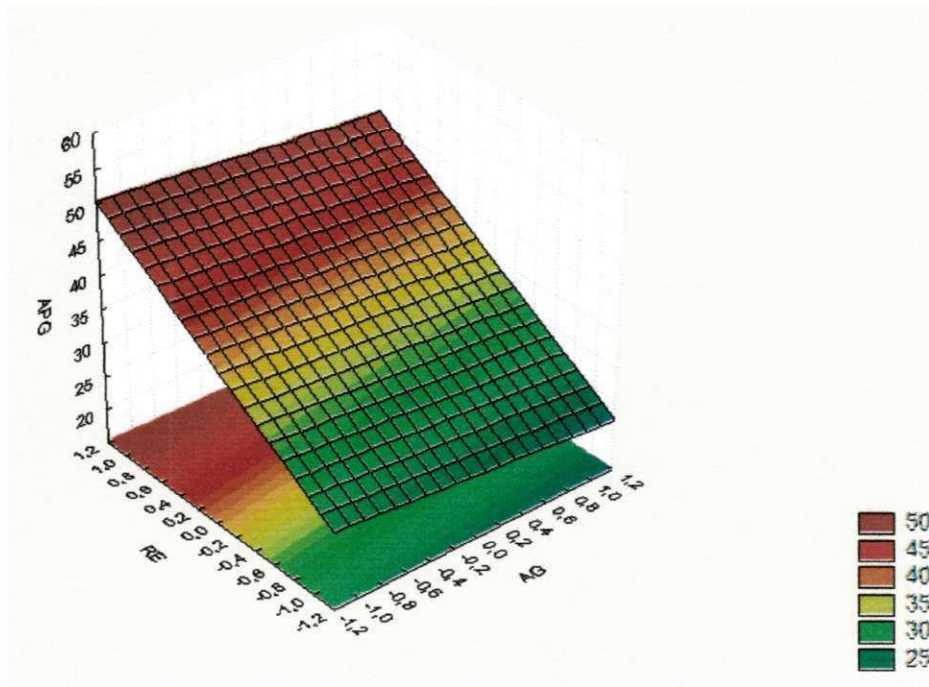


Figura 4.8. Influência da relação (RE) e agitação (AG) na atividade (APG) dos extratos. TC fixado em 1

A Figura 4.9 exibe a influência de RE e TC na APG. Novamente percebe-se a forte influência de RE na atividade dos extratos. (APG). Verifica-se também que o tempo de contato (TC) não influi na atividade dos extratos obtidos.

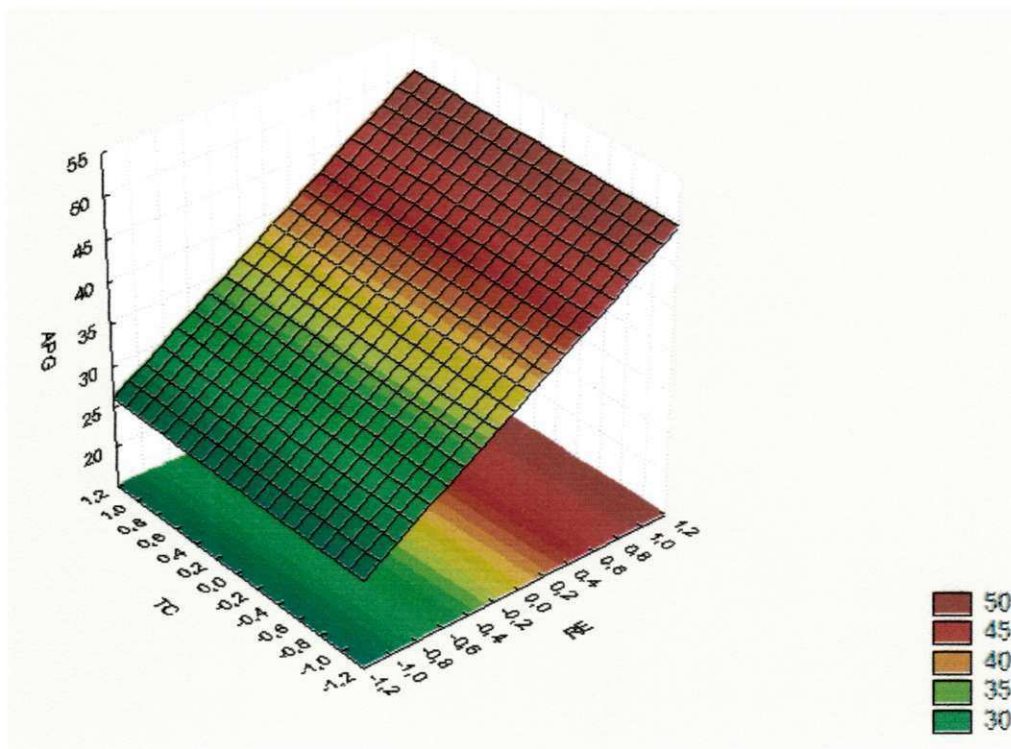


Figura 4.9. Influência da relação (RE) e tempo de contato (TC) na atividade dos extratos. AG fixado em (-1)

4.4 – Caracterização dos Sistemas Bifásicos

4.4.1 – Diagramas de equilíbrio

A Figura 4.10 mostra os pontos da curva binodal obtida para os sistemas ternários água+fósforo de potássio+PEG 10000 e extrato de fermentação+PEG 10000+ fósforo de potássio a 25 °C. O formato das curvas obtidas é muito semelhante ao do sistema PEG 10000 – sulfato de amônio encontrada por Graber *et al.*, (2007) para a mesma temperatura.

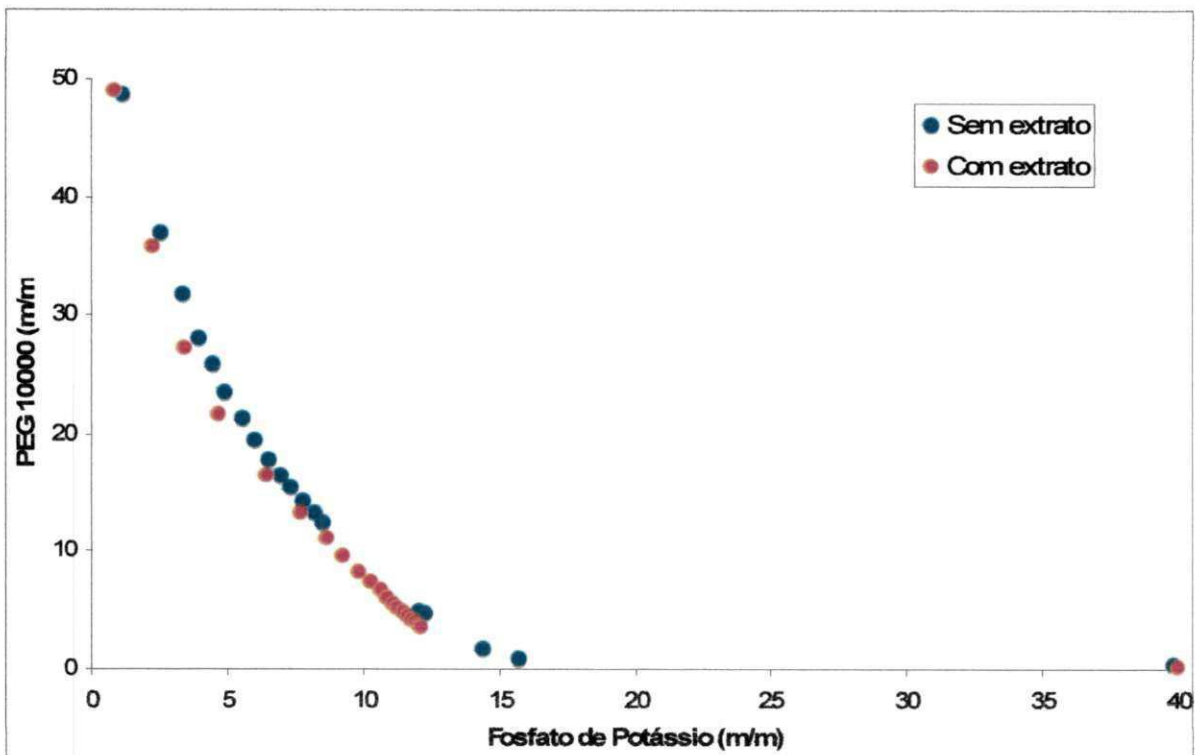


Figura 4.10. Curvas de equilíbrio de sistemas com e sem extrato

A curva binodal com o extrato fermentado contendo enzimas foi realizada da mesma maneira que a feita apenas com água deionizada, mas houve a substituição da água pelo extrato fermentado. O propósito da realização das curvas foi verificar se havia alguma influência do extrato fermentado na composição do sistema e, conseqüentemente no perfil da curva binodal, já que os ensaios de partição não seriam feitos com água e sim com meio fermentado.

Comparando-se os pontos obtidos, verifica-se um bom alinhamento dos pontos em ambas as curvas. As curvas binodais construídas com extrato fermentado seguem o mesmo perfil da curva construída com água, em toda a faixa da binodal. Apesar das curvas praticamente não apresentarem diferenças, verifica-se uma tendência de deslocamento da curva realizada com o extrato fermentado para a esquerda, ou seja, para menores valores de concentração dos componentes formadores das fases.

Segundo Porto (2004), tal deslocamento sugere que os sais ou outros componentes presentes no caldo fermentado interferem no sistema, ampliando assim a região de trabalho em relação à curva construída com água. O extrato fermentado contém proteínas e sais, entre outros sólidos solúveis, os quais são adicionados ao sistema bifásico e somam-se ao sal e ao PEG presentes de tal forma que o total de sólidos solúveis é maior nesse sistema do que outro construído apenas com água.

De acordo com Rito-Palomares & Cueto (2000), tal comportamento pode ser explicado pelo aumento da sensibilidade do SAB em concentrações próximas à curva binodal, o qual exibe nessa região uma evidente sensibilidade para as mudanças de composição do sistema. Pequenas mudanças na composição de PEG e sais causados por diferentes fatores (neste caso pela adição de suspensão biológica) resultam em mudanças na composição e nas características finais do SAB. Os autores citados observaram um deslocamento da curva binodal no ponto crítico do diagrama de fases construído na presença de caldo fermentado de *Trichoderma harzianum*. Esse comportamento da curva pode ser explicado pela alta viscosidade causada pela presença de biopolímeros produzidos durante a fermentação, que influencia na composição do sistema e reduz a quantidade de reagentes necessários para a formação das duas fases.

4.4.2 Construção e caracterização dos SABs

Foram construídos dois tipos de SABs: um formado por PEG 10000, tampão fosfato e extrato proveniente da fermentação e outro sistema que, ao invés do extrato, continha uma solução de pectinase a 1% m/v. Para cada sistema, foram obtidos três SABs em triplicata, cada um representando uma tie-line (ou linha de amarração) diferente. O critério da escolha da composição dos sistemas é que tivessem pelo menos cerca de 70% de água, para propiciar um ambiente ameno para as enzimas e obter SABs com menores concentrações de sal e PEG 10000. Os sistemas foram construídos a partir de quantidades adequadas das soluções mãe de

PEG, sal e extrato. As composições foram determinadas em ensaios preliminares, uma vez que dados de equilíbrio de SABs formados por PEG 10000 são raros na literatura, se comparados com dados de SABs com menor massa molar de PEG. Procurou-se obter sistemas com relação de fases próximas à unidade, para que em cada fase houvesse volume suficiente para sua caracterização físico-química. Além disso, uma razão de fases próxima à unidade favorece uma melhor concentração para poligalacturonases (ANTOV *et al.*, 2004).

A Tabela 4.6 exhibe a composição (*massa/massa*) dos SABs construídos e seus respectivos desvios-padrão. “S. Enzima (%)” e “extrato (%)” correspondem à porcentagem mássica de solvente dos sistemas. A letra “p” designa sistemas construídos com solução de pectinase pura e a letra “e”, sistemas com extrato proveniente da fermentação. A Tabela 4.6 exhibe ainda a razão entre o volume das fases superior (V_t) e inferior (V_b) de cada SAB após 24 horas de repouso.

Tabela 4.6. Composição dos SABs construídos para os ensaios de partição

SAB	S. Enzima (%)	Extrato (%)	sal (%)	Peg (%)	V_t/V_b
1p	67,67 ± 0,03	0,00	11,47 ± 0,00	20,85 ± 0,03	1,65 ± 0,02
2p	71,29 ± 0,03	0,00	10,60 ± 0,01	18,10 ± 0,04	1,57 ± 0,02
3p	73,75 ± 0,04	0,00	10,01 ± 0,01	16,24 ± 0,04	1,57 ± 0,01
1e	0,00	67,61 ± 0,00	11,48 ± 0,01	20,91 ± 0,01	1,59 ± 0,05
2e	0,00	71,29 ± 0,00	10,61 ± 0,01	18,10 ± 0,00	1,50 ± 0,03
3e	0,00	73,76 ± 0,00	9,98 ± 0,01	16,26 ± 0,01	1,48 ± 0,01

Os dados da Tabela 4.6 mostram que, apesar dos sistemas com enzima e com extrato terem praticamente a mesma composição de formação, apresentaram razões de volumes diferentes, quando comparados os análogos de cada SAB entre si. Os sistemas formados por extrato apresentaram razão de fases inferior à dos sistemas com enzima. Além disso, nenhum dos sistemas apresentou razão de fases igual a um, possivelmente porque os testes para obtenção da composição que geraria sistemas com razão de fases igual à unidade foram feitos com água, e os sistemas para estudo foram feitos com solução de pectinase e extrato. Tal fenômeno é um indício de que as condições de equilíbrio de fases nos sistemas com extrato são diferentes das condições de equilíbrio dos sistemas compostos com enzima pura e sistemas contendo apenas água, reafirmando mais uma vez que a presença de outros solutos no extrato (sais minerais, corantes, açúcares, proteínas, entre outros) contribuiu para alterações nas características físico-químicas dos SABs (PORTO, 2004). Além disso, os sistemas produzidos com enzima pura tinham aspecto límpido e transparente, já os produzidos

com extrato, embora tivessem fases transparentes, apresentavam a coloração típica dos extratos da fermentação.

A Figura 4.11 mostra um dos SABs obtidos (SAB 3e). A fase superior ficou com uma coloração mais forte e mais turva que a fase sal, um indicio de que os componentes do extrato foram particionados entre as duas fases dos sistemas, sendo que parte das proteínas e corantes teve preferência pela fase superior. O mesmo fenômeno foi observado por Ferreira (2007), ao estudar a partição de bromelina em SABs compostos por PEG 4000 e fosfato de potássio.



Figura 4.11. SAB após total separação das fases

A estreita faixa escura no tubo de centrifuga da Figura 4.3 é a interface do SAB. Tal coloração é devido ao acúmulo de esporos ainda presentes no extrato, o que vem confirmar novamente que houve distribuição dos componentes do extrato de forma desigual entre as duas fases do sistema. Os esporos não tiveram preferência por nenhuma das duas fases, acumulando-se na interface. Caso o objetivo deste trabalho fosse a recuperação de células presentes no extrato (esporos), estas poderiam ser recolhidas por meio de um funil de filtração.

4.4.3 Caracterização das fases dos SABs

Após recolhimento das fases, estas foram caracterizadas quanto aos aspectos físico-químicos, como composição, volume e massa, para que fossem calculados os comprimentos

das linhas de amarração e suas inclinações. A Tabela 4.7 exibe os valores encontrados. A fase superior de cada SAB, rica em PEG 10000, foi denominada de **Sup** e a fase inferior, rica em fosfato de potássio, foi denominada de **Inf**.

Tabela 4.7. Composição, volume e massa das fases de cada SAB.

Fase	água (%)	CV (%)	Sal (%)	CV (%)	Peg (%)	CV (%)	Vol (mL)	CV (%)	m (g)	CV (%)
1p Sup	61,67	0,85	2,69	8,47	35,64	1,63	8,86	0,93	9,29	0,59
1p Inf	75,44	0,63	24,56	1,92	0,00	0,00	5,35	0,89	6,47	1,14
2p Sup	64,96	0,28	3,57	5,15	31,47	0,13	8,74	1,21	9,32	1,23
2p Inf	77,78	0,28	22,22	1,00	0,00	0,00	5,55	0,39	6,60	0,54
3p Sup	67,96	0,17	4,19	1,68	27,85	0,67	8,77	1,45	9,36	1,57
3p Inf	79,88	0,34	20,12	1,37	0,00	0,00	5,60	0,58	6,54	0,58
1e Sup	60,55	0,15	2,58	4,17	36,86	0,24	8,67	1,40	9,21	0,86
1e Inf	75,41	0,73	24,59	2,25	0,00	0,00	5,45	1,45	6,50	2,88
2e Sup	64,19	0,19	3,40	3,81	32,41	0,71	8,56	0,70	9,02	0,62
2e Inf	79,44	0,12	20,56	0,47	0,00	0,00	5,69	1,32	6,76	1,12
3e Sup	67,39	0,30	3,87	3,94	28,73	0,20	8,51	0,42	9,07	0,48
3e Inf	81,33	0,18	18,67	0,79	0,00	0,00	5,77	0,29	6,67	0,96

A dispersão nos valores de composição dos SABs foi medida utilizando-se o coeficiente de variação (CV). Caso CV seja superior a 10%, a dispersão é considerada alta (GOMES, 2000).

Praticamente todos os resultados da composição de água e PEG 10000 nas fases apresentaram CV inferior a 1%, indicando uma dispersão muito pequena entre os valores encontrados nos ensaios. As maiores variações de CV foram observadas na determinação do teor de sal (fosfato de potássio) das fases. Porém, os valores médios da concentração de sal são confiáveis, uma vez que os CV foram inferiores a 10%. Tal dispersão é um indício de que a metodologia utilizada na determinação do teor de sal por gravimetria pode não ser a opção mais adequada, uma vez que está sujeita a erros cumulativos. Um outra opção seria a determinação do fosfato de potássio via titulação potenciométrica, como feito por Da Silva (1994).

Além disso, os valores de composição foram baseados na massa experimental das fases, que não é uma medida muito precisa, uma vez que foi determinada a partir de medidas experimentais de volume e densidades das fases, também sujeitas a erros.

4.4.4 Comprimentos e inclinações das linhas de amarração (tie-lines)

Cada um dos SABs construídos representou uma linha de amarração (CLA) do sistema PEG 10000 – Tampão fosfato de potássio, cujo comprimento e inclinação estão exibidos na Tabela 4.8:

Tabela 4.8. Comprimentos e inclinações das linhas de amarração

tie-line	CLA (%)	CV (%)	ILA	CV (%)
1p	41,81	1,89	-1,63	2,23
2p	36,59	0,58	-1,69	1,91
3p	32,08	1,02	-1,75	1,49
1e	42,94	0,39	-1,68	2,44
2e	36,67	0,66	-1,89	0,85
3e	32,32	0,24	-1,94	2,03

Os maiores valores de CLA foram encontrados nos SABs com maiores concentrações de PEG e fosfato, decrescendo à medida em que as concentrações de PEG e fosfato diminuam. Segundo Da Silva e Loh, (2006), com o aumento do valor de CLA, aumenta a diferença entre a fase superior e a inferior em termos de propriedades termodinâmicas intensivas.

Os comprimentos das linhas de amarração não foram muito diferentes entre os sistemas compostos por pectina pura (sistemas p) e os sistemas compostos por extrato (sistemas e). Por outro lado, as inclinações das linhas de amarração dos sistemas p foram inferiores aos valores de inclinação das linhas de amarração dos sistemas tipo e. Uma explicação para tal fenômeno é que nos sistemas tipo e, compostos por extrato, há um número maior de solutos dissolvidos, o que afeta as condições de equilíbrio do sistema. O diagrama de equilíbrio pode ser observado na Figura 4.12.

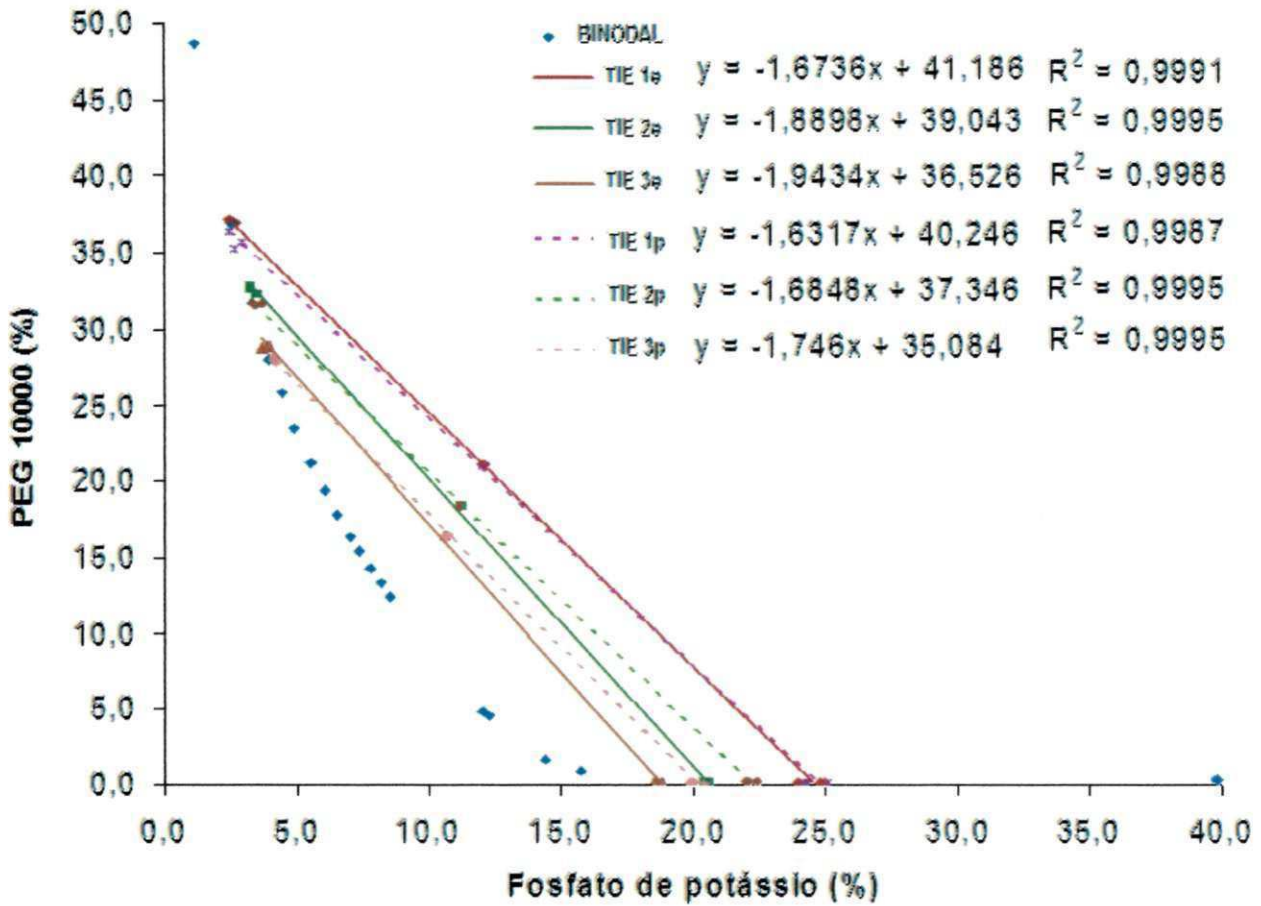


Figura 4.12. Diagrama de equilíbrio com as linhas de amarração.

Maiores diferenças de inclinação entre os dois tipos de sistemas ocorreu entre os SABs com menores concentrações de PEG e fosfato. Além disso, é possível constatar nas Figuras 4.12 e 4.13 que à medida que a linha de amarração (tie-line) afasta-se da região do ponto crítico, as composições de PEG e sal vão se elevando, isto ocorre para todas as tie-lines, sem exceção (FERREIRA, 2007).

A Figura 4.13 exibe o diagrama de equilíbrio ternário:

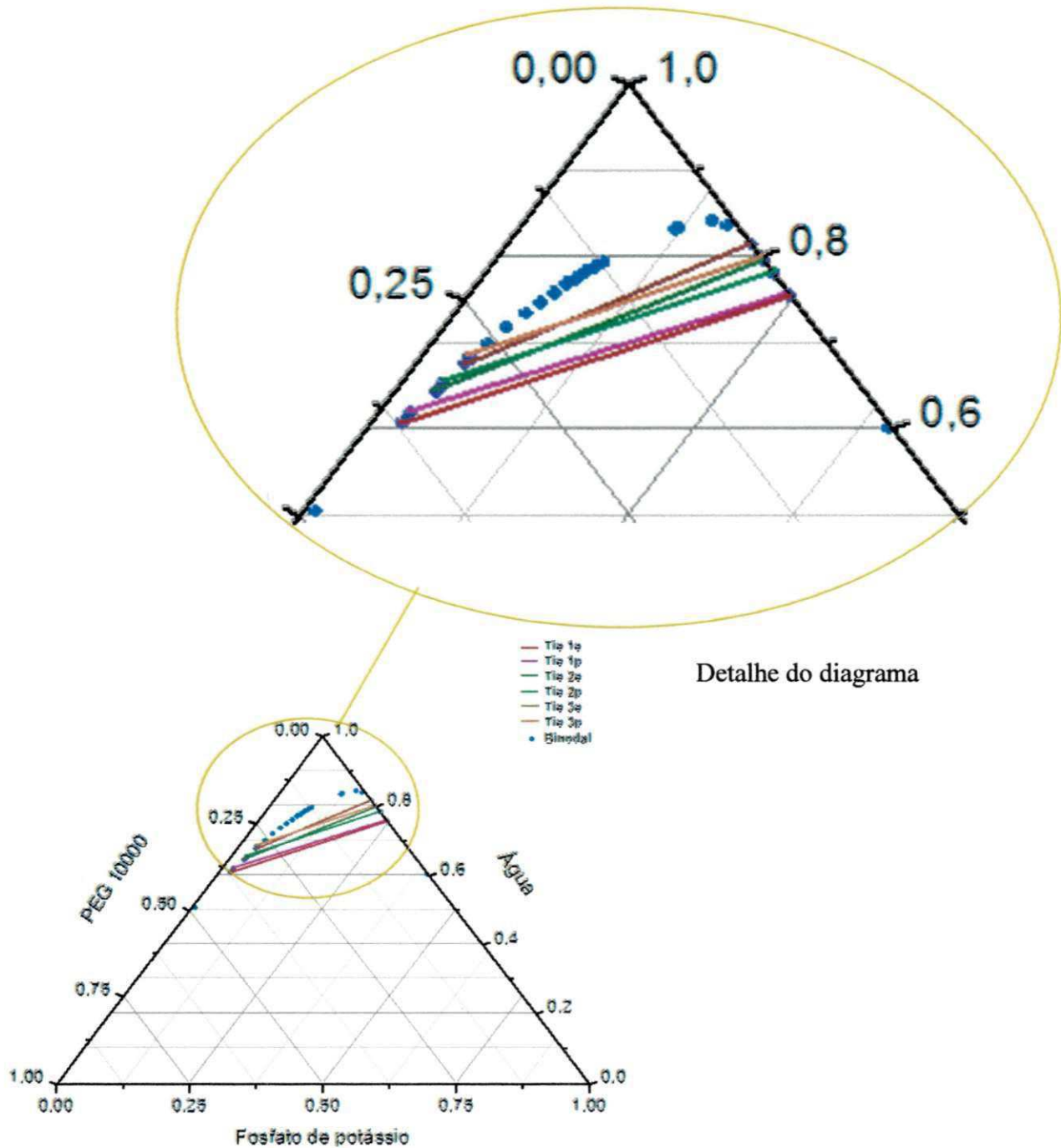


Figura 4.13. Diagrama de equilíbrio ternário

4.4.5 Avaliação dos parâmetros da partição

Os resultados das análises de atividade enzimática das fases, atividade específica (AS) e fator de purificação (FP) dos sistemas compostos por extrato estão na Tabela 4.9. O teor de proteínas nos sistemas com enzima pura não pôde ser determinado com precisão, por se

tratarem de sistemas muito diluídos. Por isso não foi possível o cálculo da atividade específica e do fator de purificação nesses sistemas.

Tabela 4.9. Atividade enzimática, atividade específica e fator de purificação.

Fase	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	AS (U/mg)	FP
extrato	1,800 ± 0,00	4,37 ± 0,26	2,42	1
1e Sup	0,823 ± 0,08	0	0	0
1e Inf	0,246 ± 0,01	2,38 ± 0,40	10,06 ± 2,37	4,17 ± 0,98
2e Sup	1,120 ± 0,06	0	0	0
2e Inf	0,508 ± 0,15	3,08 ± 0,30	6,42 ± 2,69	2,66 ± 1,11
3e Sup	1,258 ± 0,04	0	0	0
3e Inf	0,668 ± 0,06	3,68 ± 0,16	5,41 ± 0,58	2,24 ± 0,24

Não foi detectada atividade nas fases superiores, o que significa que toda a enzima poligalacturonase presente no extrato está contida na fase inferior dos sistemas. Antov *et al.*, (2008), estudando a partição de pectinases de *Penicillium cyclopium* em SABs compostos por PEGs de diferentes pesos moleculares e sulfato de amônio, constataram que em sistemas com PEGs de baixa massa molar (1000), as pectinases concentram-se preferencialmente na fase superior do sistema, rica em PEG. Na medida em que a massa molar do PEG aumenta, as pectinases passam a ter preferência pela fase inferior, rica em sal, sendo que em sistemas compostos por PEG 10000, a recuperação das poligalacturonases na fase inferior chega a 100%.

Muitos autores têm estudado a partição de enzimas pectinolíticas mensurando as atividades endo-PG e exo-PG separadamente. A endo-PG costuma ser determinada pela redução da viscosidade específica inicial que provoca em uma mistura reacional contendo pectina (ANTOV *et al.*, 2008). Já a exo-PG é determinada com um ensaio semelhante ao utilizado neste trabalho para determinação da atividade poligalacturonásica (item 3.6.3), baseado na formação de ácido galacturônico, o qual é determinado por espectrofotometria. Neste trabalho, apesar da técnica para determinação da atividade ser mais parecida com a técnica utilizada para quantificação de exo-PG por alguns autores, a atividade foi chamada de atividade poligalacturonásica (APG), sem diferenciação, uma vez que o fungo produz um complexo multienzimático, com outras pectinases presentes, havendo a possibilidade de que mais de um tipo de enzima poligalacturonase esteja atuando no sistema em que a determinação da atividade está sendo conduzida.

A atividade específica (AS) foi utilizada para avaliar a seletividade dos SABs, pois é um parâmetro que relaciona a atividade enzimática com a quantidade de proteínas presentes nas fases (LIMA et al, 2002). Portanto, quanto maior o valor de AS, maior será o número de enzimas ativas em relação às demais proteínas. Em todos os SABs, houve um aumento de AS em relação ao extrato, o que significa que os SABs promoveram a distribuição das proteínas contidas no extrato entre as duas fases, concentrando as poligalacturonases na fase inferior dos sistemas e demais proteínas na fase superior.

O maior aumento de AS foi observado no SAB 1e, que continha uma concentração maior de sais e PEG 10000 e o maior comprimento de linha de amarração entre os sistemas estudados: CLA= 42,94%. À medida que as linhas de amarração foram se tornando mais curtas (sistemas com menor composição de PEG 10000 e fosfato), a atividade específica das fases diminuiu, de 10,06 U/mg no SAB 1e para 5,42 U/mg no SAB 3e, com CLA de 32,32%.

Apesar de a atividade enzimática ter aumentado do SAB 1e para o SAB 3e, o SAB 1e foi mais eficiente na obtenção de uma fase com maior grau de pureza em relação ao extrato inicial. O que confirma essa afirmação é o valor do fator de purificação FP, que evidencia o aumento de pureza das poligalacturonases.

Os valores de FP confirmam que, apesar da fase 1einf ter apresentado a menor atividade enzimática, possuía uma concentração de enzimas ativas maior que a de outras proteínas.

Portanto, entre as linhas de amarração estudadas, a tie 1e proporcionou um aumento de pureza de quatro vezes em relação ao extrato inicial. A tie 3e, por outro lado, apresentou o menor valor de FP, o que significa que apesar de ter exibido a maior atividade na fase inferior, em relação às demais, encontrava-se em sua fase inferior um número proporcionalmente maior de outras proteínas, o que significa que dentre as três tie-lines testadas, a tie 3e foi a menos seletiva.

Lima *et al.*, (2002), estudando a partição de pectinase em SABs do tipo PEG-fosfato, encontrou valores de FP de 16,28 e 4,5 para atividade endo-PG e exo-PG respectivamente, em sistemas formados por PEG 10000. O valor de FP para atividade exo-PG foi próximo ao obtido para atividade PG na fase 1einf (4,17).

Antov *et al.*, (2008) encontraram valores de FP de 1,64 e 2,11 para atividade endo-PG e exo-PG respectivamente, em SABs formados por PEG 10000 e sulfato de potássio, com concentrações de PEG e sal diferentes das usadas neste trabalho.

A Tabela 4.10 exhibe o valor encontrado para o coeficiente de partição das proteínas (K_p), da enzima (K_e) e a recuperação de enzimas ativas em cada uma das fases dos SABs.

Tabela 4.10: Coeficientes de partição e recuperação nas fases

SAB	K _p	K _e	RT (%)	RB (%)
1e	3,35	0	0	100
2e	2,20	0	0	100
3e	1,88	0	0	100

O valor de K_p mostra que boa parte das proteínas presentes no extrato teve preferência pela fase superior, rica em PEG. Tal comportamento foi mais evidente no SAB 1e, onde cerca de 77% das proteínas concentraram-se na fase superior. À medida em que os sistemas tornaram-se mais diluídos em termos da composição de PEG e sal, o K_p diminuiu, indicando que um número menor de proteínas teve preferência pela fase superior, chegando a 65% das proteínas no SAB 3e.

Por outro lado, as poligalacturonases presentes no extrato tiveram preferência pela fase inferior dos SABs, como mostra o valor nulo de K_e em todos os SABs. Como toda a enzima poligalacturonase presente nos SABs foi reunida na fase inferior dos SABs, o coeficiente de partição foi zero, assim como a recuperação das enzimas na fase superior. Dessa forma, 100% das enzimas ativas foram recuperadas na fase inferior. Esses dados concordam com os obtidos por ANTOV *et al.*, (2008) que obtiveram, para SABs formados por PEG 10000 – sulfato de amônio, uma recuperação de 100% para endo-PG e 98,85% para exo-PG, com K_e=0 e K_e=0,04; respectivamente.

Portanto, esses resultados mostram que os SABs conseguiram remover boa parte das impurezas presentes no extrato, separando-as para a fase superior, enquanto as poligalacturonases foram separadas para a fase inferior dos SABs, aumentando a pureza das enzimas. Porém, estes ensaios representaram apenas uma etapa do que seria um processo completo de concentração e purificação de enzimas, mas mostraram que os SABs formados por PEG 10000 e fosfato de potássio são adequados para a recuperação de poligalacturonases a partir do extrato, aplicação esta que pode ser melhorada com um estudo de otimização do processo.

4.4.6 Considerações a respeito da atividade enzimática nos SABs.

Os SABs foram preparados com PEG 10000 e tampão fosfato com pH 7,0. A solução mãe de PEG 10000 também possuía pH 7,0; de modo que as fases dos SABs apresentavam valores de pH entre 6,5 e 7,0 (as medições foram realizadas com pHmetro).

Porém, as poligalacturonases obtidas pela fermentação de resíduo agroindustrial do maracujá por *Aspergillus niger* exibem atividade e estabilidade em meios com pH entre 3,5 e 5,5; não sendo mais detectada atividade poligalacturonásica em pH superior a 6,5 (SOUZA, 2008). Portanto, as poligalacturonases presentes na fase inferior dos SABs podem não estar completamente ativadas, uma vez que as condições do meio não favorecem a ativação total. Por outro lado, as poligalacturonases presentes no extrato após a operação de lixiviação estão totalmente ativadas, uma vez que o pH do extrato é de 4,5.

Durante a análise de atividade (item 3.6.3), a enzima é reativada em pH 4,5; valor de pH onde sua atividade é máxima (conforme Figura 2.4, no Capítulo 2), e catalisa a formação de ácido d-galacturônico a partir do ácido poligalacturônico, na temperatura de 35⁰C, onde também apresenta atividade máxima (SOUZA, 2008).

É possível que alterações no meio reativo desativem os sítios catalíticos das enzimas e reduzam a atividade enzimática.

Os próprios componentes dos SABs podem atuar como inibidores. Pereira (2005) percebeu que altas concentrações de PEG e sal podem interferir na determinação da atividade, motivo pelo qual se fez a diluição das amostras a fim de minimizar a interferência, de forma que a fase superior apresentasse menos de 2% de polímero e a fase inferior apresentasse menos de 0,025 M de sal.

Neste trabalho, não foi realizada diluições nas amostras para não comprometer a determinação, uma vez que a metodologia empregada para a determinação da atividade enzimática parece não ser muito sensível em amostras com baixa concentração de enzimas.

No entanto, verificou-se que durante a determinação da atividade enzimática nas fases inferiores dos SABs, a presença do tampão fosfato elevou o pH do meio reacional para cerca de 4,85; o que significa que as enzimas não exibiam atividade máxima no momento da análise.

Para verificar a possibilidade de se obter maiores valores de atividade enzimática nas fases inferiores dos SABs, foi realizado um balanço de atividade através da Equação 3.21; anteriormente descrita.

A Tabela 4.11 exibe os valores de atividade, atividade específica e fator de purificação teóricos, considerando que todas as unidades de atividade presentes no extrato estão na fase inferior dos SABs e possam ser reativadas, uma vez que não foram submetidas a valores drásticos de temperatura e pH; e que os solutos presentes não danificaram as estruturas da enzima nem promoveram sua desnaturação.

Tabela 4.11: Parâmetros da partição considerando-se a recuperação de 100% das unidades de atividade, presentes no extrato, na fase inferior dos SABs.

Fase	Atividade Teórica (U/mL)	AS teórico (U/mg)	FP teórico	FC teórico
extrato	4,37	2,41	1,00	1,00
1e Sup	0,00	0,00	0,00	
1e Inf	4,51	18,05	7,48	1,03
2e Sup	0,00	0,00	0,00	
2e Inf	5,13	10,06	4,17	1,17
3e Sup	0,00	0,00	0,00	
3e Inf	5,82	8,69	3,60	1,33

A Tabela 4.11 mostra que a correta ativação das enzimas presentes na fase inferior dos SABs pode gerar meios com atividade específica de 18,05 U/mg e fator de purificação de 7,48 vezes a pureza da poligalacturonases nos extratos provenientes da fermentação, sem prejuízos na concentração de atividade, como mostra os valores do FC.

Portanto, é possível obter com a utilização de SABs na recuperação de poligalacturonases, alto rendimento e aumento de pureza em uma única etapa, sendo adequada tal operação como etapa inicial de um processo de recuperação e purificação de enzimas. Etapas seguintes poderiam reciclar o PEG, os sais, purificar e estabilizar as enzimas, deixando-as prontas para correta ativação e aplicação nos processos industriais.

Capítulo 5

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- O resíduo agrícola do maracujá amarelo mostrou-se adequado para a obtenção de poligalacturonases via fermentação semi-sólida.
- A variação dos parâmetros da lixiviação promoveu o aumento da atividade enzimática nos extratos obtidos, estabelecendo como condição adequada para a recuperação de tais enzimas: o tempo de contato de 45 minutos, agitação de 50 rpm e relação solvente/massa de 10 mL/g.
- Dentre as variáveis estudadas no processo extrativo, a relação solvente/massa de meio (RE) foi o parâmetro que mais influenciou na atividade dos extratos. O modelo obtido mostrou-se, além de significativo, preditivo.
- A curva binodal construída com extrato fermentado seguiu o mesmo perfil da curva construída com água, em toda a faixa da binodal.
- A aplicação dos SABs formados por PEG 10000 e fosfato de potássio promoveu a separação de impurezas para a fase superior dos sistemas, aumentando a atividade específica e a pureza das enzimas na fase inferior.
- Foi obtida uma recuperação de 100% das enzimas ativas na fase inferior dos SABs. O sistema mais eficiente foi o que tinha o maior comprimento de linha de amarração, CLA= 42,94%.
- A utilização de SABs na recuperação de poligalacturonases proporcionou alto rendimento e aumento de pureza em uma única etapa, com fator de purificação de 4,17; podendo chegar a 7,48 com a adequada ativação das enzimas.
- SABs formados por PEG 10000 e tampão fosfato mostraram-se adequados como etapa inicial de um processo de recuperação e purificação de enzimas.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

ABUD, A. K. S. NARAIN, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 12, n. 4, out./dez. p. 257-265, 2009.

ALBERTSSON, P.-A., *Partition of cell particles and macromolecules*, 3rd ed., New York, Wiley, 1986.

ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M.; Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27(2) p 364-368, abr.-jun. 2007.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes – a review. *Process Biochemistry*, v.33, n.1, p.21-28, 1998.

ALMEIDA, M. M. Estudo da bioconversão do mandacaru (*Cereus jamaicaru p. Dc.*) para produção de bioprodutos. 2007. 145f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - UFCG, Campina Grande – PB, 2007.

ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M.; PEJIN, S. N.; Pectinases partitioning in aqueous two-phase systems: an integration of the systems poly(ethylene glycol)/crude dextran and poly(ethylene glycol)/ammonium sulphate. *J.Serb.Chem.Soc.* v 69(4), p 299-307, 2004.

ANTOV, M.G.; PRODANOVIC, J.M. The influence of molecular weight of polyethyleneglycol on separation and purification of pectinases from *Penicillium cyclopium* in aqueous two-phase system. *APTEFF*, 39, 1-212, p 193-199, 2008.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995, 480 p.

BERTEVELLO, L. C. Estudo do processo de recuperação e separação de bromelina utilizando sistemas de duas fases aquosas em micro - coluna de extração. 2001. 105f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - UNICAMP, Campinas – SP, 2001.

BERTOLUZZO, M. G., BERTOLUZZO, S. M., RIGATUSO, R., PICÓ, G. Caracterización del equilibrio líquido- líquido en sistemas bifásicos acuosos. Anales AFA vol 17, p 321 – 324, La Plata 2005.

BIM, A. M. Extração em sistemas de duas fases aquosas de xilanase alcalina produzida por *Bacillus pumillus* e aplicação no branqueamento da polpa craft. 1999. 137f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - UNICAMP, Campinas – SP, 1999.

BRASIL. Resolução nº263, de 22 de setembro de 2005. Aprova regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 set. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2007.

BRAVO, C. E. C; CARVALHO, E. P; SCHWAN, R. F.; GOMEZ, R. J. H. C., PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. Ciências Agrotécnicas, v.24 (Edição Especial), p.137-152, 2000.

BRITO, G. M. Termodinâmica de partição do ânion $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$ em sistemas aquosos bifásicos. 2007. 70f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - UFV, Viçosa – MG, 2007.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. Process Biochemistry, v.42, n.1, p. 98-101, 2007.

BUENO, M. C.; PERES, M.F.S.; GATTÁS, E.A.L. Produção de poligalacturonase por três linhagens de *Aspergillus* isolados do solo. Alim. Nutr., Araraquara v.16, n.3, p. 253-257, jul./set. 2005.

BURGOS, M. P. C., Predicción del coeficiente de partición de proteínas en sistemas de dos fases acuosas através de la caracterización bioinformática de su superficie. Memoria para optar al título de ingeniero civil en biotecnología. Universidad de Chile, Santiago – Chile, 2008.

CAMARGO, L. A.; DENTILLO, D.B.; CARDELO, L.; GATTÁS, E. A. L. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *Aspergillus sp.* Alim. Nutr., Araraquara, v. 16, n. 2, p. 153-156, abr./jun. 2005.

CARDOSO, M.V.C.; Efeito do centro metálico nas interações intermoleculares dos complexos $[M(CN)_5MO]^{x-}$ com o poli(óxido de Etileno) em sistemas aquosos bifásicos. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - UFV, Viçosa – MG, 2007.

CARVALHO^(a), S. Pectinases produzidas pelo agente biológico G088: extração e purificação. 2007. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – UFLA, Lavras – MG, 2007.

CARVALHO^(b), M. M. Estudo do equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água, em função da temperatura. 2007. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - UFV, Viçosa - MG, 2007.

CASTILHO, L. R. Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. 1997. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Química) - UFRJ – RJ, 1997.

CASTILHO. L. R.: MEDRONHO. R. A.: ALVES. T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresour. Technol. 71: p 45-50. 2000.

CAVALCANTI, J. S. Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo “tipo coalho” usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leite na forma expandida. 2010. 114f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - UFRN, Natal – RN, 2010.

CESAR, A. C. W. Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi. 2005. 111f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – UNICAMP, Campinas - SP, 2005.

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

CORDEIRO, C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus sp.* e algumas de suas propriedades. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 29(1): 135-141, jan. -mar. 2009.

CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; NETO, G. K.; FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Flavicarpa degener*) obtida por secagem. *Boletim do CEPPA*, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

CORREIA, R. T. P. Estudo do cultivo semi-sólido de *Sacharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi. 2004. 163f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Bioquímicos) – UFRN, Natal – RN, 2004.

COURI, S. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. 1993. 198f. Tese (Doutorado em Ciências) – UFRJ, Rio de Janeiro-RJ, 1993.

CUNHA, E. V. C. Equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos água + peg 8000 + sal: determinação experimental e modelagem termodinâmica. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2008.

DALLORA, N. L. P.; FILHO, P. A. P. Determinação do equilíbrio de fases e do coeficiente de partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos. *PIC-EPUSP* N°3, pg. 1712 – 1723, 2006.

DARTORA, A. B.; BERTOLIN, T. E.; SCANDOLARA C.; COSTA, J. A. V.; SILVEIRA, M. M. Estudo comparativo da produção de pectinases por fermentação semi-sólida com diferentes fungos filamentosos. In: VI SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1999, Maringá. Anais. Maringá: 1999. CD.

Da SILVA, L.H.M., Equilíbrio de fases em sistemas aquosos peg/fosfato de potássio. 1994. 87f. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - FEA/UNICAMP, Campinas – SP, 1994.

Da SILVA, L.H.M., LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. Química Nova, Vol. 29, No. 6, 1345-1351, 2006.

EMBRAPA. Mandioca e fruticultura. A cultura do maracujá. Brasília; Coleção Plantar, 107 p, 2004.

EMBRAPA. Site. <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007/abril/foldernoticia.2007-04-02.1658202736/noticia.2007-04-02.8180379485/?searchterm=maracuj%C3%A1>, acessado em 08/05/2010.

FAWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Some factors affecting production of pectin enzymes by *Aspergillus niger*. International Biodeterioration & Biodegradation, v.52, n.4, p. 223-227, 2003.

FERNÁNDEZ, D. E. R. Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação e em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial. 2009. 125f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2009.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - aproveitamento das sementes. Revista Brasileira de Fruticultura [online]. 2004, v. 26, n. 1, pp. 101-102. ISSN 0100-2945.

FERREIRA, J. F. Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistemas de duas fases aquosas PEG/fosfato. 2007. 76f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas - SP, 2007.

FERREIRA, J. F., PADILHA, G.S., TAMBOURGI, E.B.; Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos. *Exacta*, São Paulo, v7, n1, p49-56, jan/mar. 2009.

FRANCISCO, K. R. Estudo das forças motrizes que regem a partição dos complexos $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ e $[\text{Cr}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ em SABs formados por poli(óxido de etileno) e sulfatos. 2006. 56f. Tese (Mestrado em Agroquímica) – UFV, Viçosa – MG, 2006.

FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa degener*) obtida por secagem. *Boletim do CEPPA*, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

FREITAS, L. E. Produção e caracterização parcial de poligalacturonase de *Penicillium expansum*. 1991. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – UFV, Viçosa – MG, 1991.

FONTANA, R. C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife. Anais. CD.

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.

GOMES, P. F. 2000. Curso de estatística experimental. 14 ed. Degaspari, Piracicaba. 477pp.

GÓMEZ, G. N.; NERLI, B.A.; COSTA, O. C.; PICÓ, G. A.; LEIVA, L. C. Aplicación de sistemas bifásicos acuosos (SBA) para el aislamiento de toxinas ofídicas. Universidade Nacional del Nordeste, Argentina, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006, Resumen: E-008.

GOUVEIA, J. P. G., MOURA, R. S. F., ALMEIDA, F. A. C., OLIVEIRA, A. M. V., SILVA, M. M.; Avaliação da cinética de secagem de caju mediante um planejamento experimental *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.6, n.3, p.471-474, 2002.

GRABER, T. A.; MEDINA, H., GALLEGUILLOS, H. R., TABOADA, M. E., Phase equilibrium and partition of iodide in an aqueous biphasic system formed by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{PEG} + \text{H}_2\text{O}$ at 25 °C. *Journal of Chemical & Engineering Data*. N 52 (4), pp 1262–1267, 2007.

HATTI-KAUL, R., Aqueous two-phase systems: a general overview, *Applied Biochemistry and Biotechnology – Part B Molecular Biotechnology*, 19, 269-277, 2001.

HENDGES, D. H. Produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em processo em estado sólido em biorreator com dupla superfície. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, 2006.

HENNIES, P. T. Produção de pectinases de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido. 1996. 68f. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 1996.

HINOJOSA, A.; BELDARRAÍN, A.; MADRUGA, Y. A. Caracterización de un sistema de dos fases acuosas para la purificación parcial del HBSAG. VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. Habana, 2007. Anais.

IBGE. Lavouras permanentes. Rio de Janeiro, RJ, 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 27/06/2009.

IGARASHI, L. Extração de biomoléculas em sistemas de duas fases aquosas convencionais e com polímeros termossensíveis. 2003. 125f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – UNICAMP, Campinas - SP, 2003.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v.40, n.9, p. 2931-2944, 2005.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial setor: a review. *Bioresource Technology*, v. 77, n.2, p. 215-227, 2001.

KEEY, R.B. *Drying of loose and particulate materials*. 57 p. New York: Hemisphere, 1991.

KLIEMANN, E. Extração e caracterização da pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*). 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). UFSC, Florianópolis - SC. 2006

KOBLITZ, M. G. B. Bioquímica de Alimentos, teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro. Guanabara. Koogan, 2008. 242p

LIMA, A. S., ALEGRE, R. M., MEIRELLES, A.J.A.; Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. Carbohydrate polymers 50 (2002) 63-68.

MALLER, A. Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus*. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – USP, Ribeirão Preto – SP, 2008.

MARQUARDT, M. M. Estudos da atividade proteolítica do *Bacillus cereus* em biorreator. 2003. 101f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - UFRS, Porto Alegre – RS, 2003.

MARTIN, N. Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase. 2006. 65f. Dissertação (Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro – SP, 2006.

MATSUURA, F. C. A. U. Estudo do albedo do maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais. 2005. 138f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2005.

MELETTI, L. e MOLINA, M. Maracujá: produção e comercialização. Campinas, 1999. 64p.

MENESES, G. D. G. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em bioreatores de Coluna. 2006. 55f. Tese (Mestrado em Engenharia de Química) - UFRRJ, Seropédica - RJ, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, v. 31 p. 4266-4268, 1959.

MÍRELES, T. H.; BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Proceso para la purificación del colorante proteico bficoeritrina producido por *Porphyridium cruentum*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 5*, pg. 131-143, 2006.

NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V. H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. *Process Biochemistry* 43, 1293–1299, 2008.

OLIVEIRA, R. M. Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - UNV, Viçosa – MG, 2006.

OLIVEIRA, M. M. Enriquecimento nutricional por bioconversão de resíduos agroindustriais para utilização na alimentação animal. 2007. 126f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – UFCG, Campina Grande – PB, 2007.

OLIVEIRA, F. C. Estudo da proteína ovomucóide em sistemas aquosos bifásicos e em resinas aniônica ou hidrofóbica. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - UFV, Viçosa – MG, 2009.

OTAGAKI, K. K.; MATSUMOTO, H. Nutritive values and utility of passion fruit by products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 6, n. 1, p. 54-57, 1958.

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. 2003. 189f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2003.

PANDEY, A.; NIGAN, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 31, p. 135- 152, 2000.

PEREIRA, M. S. A. Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por, *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistemas de duas fases aquosas. 2005. 192f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Portugal, 2005.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TELXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado técnico 2005.

PORTO, T. S., Extração da pró-toxina épsilon e de uma protease a partir de *clostridium perfringens* em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. 2004. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências farmacêuticas, USP, São Paulo – SP, 2004.

RANGANA, S., Manual of analysis of fruit and vegetable products. New Delhi: Tata McGraw- Hill, Publishing Company Limited, p. 94-95, 1979.

READ, N.D. Low-temperature scanning electron microscopy of fungi and fungus-plant interactions. In: Electron Microscopy of Plant Pathogens (ed. by K. Mendgen & D.-E. Lesemann), pp. 17-29. Springer-Verlag: Berlin (1991).

RITO-PALOMARES, M.; CUETO, I. Effect of biological suspensions on the position of binodal curve in aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B. v.743, p.5-12, 2000.

RITO-PALOMARES, M., Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. J Chromatogr. B Analytic Technol. Biomed Life Sci, 807(1), p. 3-11, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Assessment of the provitamin A contents of foods - the Brazilian experience. Journal of Composition and Analysis. V. 9, p.196-230, 1999.

ROSA. C. A. R.; CAMPOS. S. G.; BARONI. F. A.: Práticas de micologia veterinária. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imnologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

SANTOS, S. F. M.; Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – UFRN, Natal – RN, 2007.

SAKAI, T. et al. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied microbiology*, v. 39, n. 2, p. 213-294, 1993.

SARTORELLO, M. C. Estudo do processo de extração de bromelina em sistema descontínuo água, polietileno glicol e polissacarídeo da goma do cajueiro. 2004. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - UNICAMP, Campinas – SP, 2004.

SILVA, M.E.; KULA, M.R.; FRANCO, T.T. Partição de lisozima em sistemas de duas fases aquosas. *Revista de Ciência e Tecnologia* V7, N 14, pp. 105-112, Unimep, Piracicaba-SP, 1999.

SOUZA, R. L. A. Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato. 2008. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) UFCG, Campina Grande - PB, 2008.

SOUZA, R. L. A.; CONRADO, L.S.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.14, n.9, p.987–992, 2010.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p.388-394, 2007.

UNIVERSITY OF GRONINGEN, Holanda. Website Institucional. Disponível em <http://www.rug.nl/scheikunde/onderzoek/programmas/proteincrystallography/gallery/index>.

Acesso em 13/09/2009.

VALADÃO, R. C. Estudo da fermentação semi-sólida de uma linhagem selecionada de *Aspergillus niger* na produção de inulinase. 2005. 53f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - UFRRJ, Seropédica – RJ, 2005.

VIANNA-SILVA, T.; RESENDE, E.D.; PEREIRA, S.M.F.; VIANA, A.P. & VIANNI, R. Caracterização de uma escala de cor para avaliação dos estádios de maturação do maracujá amarelo. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19, 2004. Recife. Anais do congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, v. CD ROM, 19, 2004.

ZASLAVSKY, B.Y., BAGIROV, T.O., BOROVSKAYA, A.A., GASANOVA, G.Z., GULAEVA, N.D., LEVIN, V.Y., MASIMOV, E.A., MAHMUDOV, A.U., MESTECHKINA, N.M., MIHEEVA, L.M. OSIPOV, N.N. e ROGOZHIN, S.V. Aqueous biphasic systems formed by nonionic polymers II: concentration effects of inorganic salts on phase separation. *Colloid Polymer Science*. 264, 1066, 1986.

ZASLAVSKY, B.Y. *Aqueous two-phase partitioning*. Marcel Dekker Inc., Nova Iorque. 1995.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculants production. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 8, p. 323-329, 2000.