

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA - FEQ
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E
INFORMÁTICA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE ECONÔMICA DA PURIFICAÇÃO
DA BROMELINA DAS FOLHAS DE CURAUÁ EM SISTEMA
BIFÁSICO AQUOSO PEG/FOSFATO**

Autora: Dalva Sbruzzi

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

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

Campinas – São Paulo

Maio / 2010

UNICAMP BC
FICHA CATALOGRÁFICA
TÉCNICA CAMP Sb68a
V
TOMBO- 84682
F 16-134-10
C X
P. 11,00
DATA 01/09/10
CÓD. TIT. 772 098

ap

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

Sb68a Sbruzzi, Dalva
Análise da viabilidade econômica da purificação da
bromelina das folhas de curaua em sistema bifásico
aquoso PEG/Fosfato / Dalva Sbruzzi. --Campinas, SP:
[s.n.], 2010.

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

1. Bromelina. 2. Extração líquido-líquido. 3.
Purificação. 4. Sistemas aquosos bifásicos. I.
Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Título em Inglês: Economic viability of bromelain purification from curaua using an
aqueous two phase system PEG/phosphate
Palavras-chave em Inglês: Bromelain, Liquid-liquid extraction, Purification, Aqueous
two phase systems

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Ranulfo Montealegre, Ana Paula Brescancini Rabelo

Data da defesa: 07/06/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

201020656

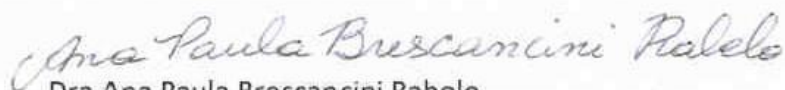
Dissertação de Mestrado , defendida por Dalva Sbruzzi, em 07 de junho de 2010 , e aprovada pela banca examinadora:



Dr. Elias Basile Tambourgi – orientador



Dr. Ranulfo Monte Alegre



Dra Ana Paula Brescancini Rabelo

Esta versão corresponde a final da Dissertação de Mestrado ,
defendida por Dalva Sbruzzi em 07 de junho de 2010.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'E' followed by a cursive 'B' and 'T'.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

*À minha mãe Olga e aos meus irmãos
Gerson e Liane, por tudo, sempre.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela lua que tem me dado para vencer.

Aos meus pais, pela vida.

Aos meus irmãos, sempre presentes em todos os momentos, pelo estímulo contínuo na justa medida, por acreditarem em mim, pelo amor, carinho, apoio e paciência.

Ao professor Dr. Elias Basile Tambourgi, pela oportunidade, orientação, confiança e incentivo nesta caminhada.

Ao professor Dr. Isaac Stringheta Machado, da Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Departamento de Ciências Ambientais da UNESP, pelo fornecimento das folhas de curauá.

Aos meus “anjos”, Juliana Ferrari Ferreira e José Carlos Curvelo Santana, por todo ensinamento, ajuda e paciência durante este trabalho.

Ao amigo Kleber Vanio Gomes Barros, que juntamente com a Juliana, compartilharam os experimentos e resultados desta pesquisa, e também pela amizade, companheirismo, momentos de descontração, carinho e incentivo durante nossa trajetória.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Processos de Separação, Giovana, Iara, Mariele, Thayse e Edgar, e da Unicamp, Ana Cláudia, Igor, Thiago, Cris, Michael, Gabriel e Ricardo, pelos bons momentos neste período de trabalho.

Aos meus amigos, de longe, de perto, de todas as horas.

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

A Capes, pelo apoio financeiro.

Obrigada, obrigada, obrigada!

RESUMO

O curauá (*Ananas Erectifolius* L.B. Smith), espécie vegetal de porte herbáceo, é uma monocotiledônea pertencente à família *Bromeliaceae*, nativa da região norte do Brasil, especialmente da Amazônia, de onde pode ser extraída a bromelina. Essa faz parte de um grupo de enzimas proteolíticas, usadas na indústria alimentícia e como medicamento, pois oferece amplo espectro de eficácias terapêuticas: antiedemas, anti-inflamatórias, antitrombóticas e atividades fibrinolíticas. O desenvolvimento de novos processos de extração e purificação de proteínas é muito importante, uma vez que essa é uma etapa limitante na produção de bioprodutos. Sistemas de duas fases aquosas são amplamente utilizados para a separação e purificação de biomoléculas. As vantagens da extração em duas fases aquosas, em comparação com outros métodos de purificação, são o elevado rendimento, a faixa de trabalho próxima do equilíbrio, a fácil ampliação de escala e o uso em processos contínuos. Esta pesquisa propõe a caracterização da bromelina do curauá e a sua purificação por extração líquido-líquido em duas fases aquosas, formadas por um polímero (polietilenoglicol) e um sal (fosfato de potássio). Apresenta também um estudo sobre os custos do processo e o preço de venda estimado, e demonstra a sua viabilidade econômica, quer seja para uso como pré-processo nos tradicionais sistemas cromatográficos, quer para a comercialização direta, como alternativa para a bromelina do abacaxi. Os resultados da caracterização mostraram que as condições ideais de trabalho são pH 8,5 e temperatura 35° C para a variedade branca, e pH 8,5 e 30° C de temperatura para a variedade roxa. A massa molar é de 24 kDa, e o melhor sistema de partição da bromelina foi o SBA PEG 4000 em pH 9. A solução enzimática dos melhores sistemas contém 7 U de bromelina e, aproximadamente, 17 mg/L de proteína total medida por Bradford (curauá branco); e 6 U de bromelina e, aproximadamente, 23 mg/L de proteína total medida por Bradford (curauá roxo). O preço de venda calculado para um litro dessa solução enzimática, quando não se obtém lucro (margem de lucro desejada é 0%), foi estimado em R\$75,06. Assim, pode-se concluir que o processo de purificação da bromelina das folhas de curauá, ao ser utilizado sistema bifásico aquoso, PEG/sal, é promissor no que diz respeito a sua possibilidade de produção em escala industrial.

Palavras chave: Bromelina, Curauá, Extração Líquido-Líquido, Viabilidade Econômica.

ABSTRACT

Curaua (*Ananas erectifolius* L.B. Smith) is a monocotyledonous herbaceous species belonging to the *Bromeliaceae* family and it is native to the north region of Brazil, especially the Amazonian Complex, that we can extract bromelain which belongs to a group of proteolytic enzymes derived from herbaceous species of *Bromeliaceae* family, which are used in food industries and as drugs as such as they offer a wide spectrum of therapeutic efficacies: antiedematous, anti-inflammatory, antithrombotic and fibrinolytic activities. The development of new extraction and purification processes of proteins is very important, as this is a limiting step in the production of bioproducts. Aqueous two-phase systems are widely used for separation and purification of biomolecules. The advantages of aqueous two-phase extraction compared to other purification methods lie in high productivity, working range close to equilibrium, easy scale up and use in continuous processes. This research proposes the curaua's bromelain characterization, and its purification by a liquid-liquid extraction in aqueous two-phase system, formed by a polymer (polyethylene glycol) and a salt (potassium phosphate). It also presents a study about the costs of this process and the estimated sale price, showing its economic viability, whether it is for use as a pre-process in traditional chromatographic systems or direct commercialization, as an alternative for the bromelain of pineapple. The curaua's bromelain characterization results showed that the ideal working conditions are pH 8.5 and 35 °C of temperature to white variety and pH 8.5 and 30°C of temperature to purple variety. The curaua's molecular weight is 24 kDa and the best bromelain partitioning system was the SBA PEG 4000 at pH 9. The enzyme solution of the best purification system contains 7 U of bromelain and about 17 mg/L of total protein measured by Bradford (white curaua) and 6 U of bromelain and about 23 mg/L of total protein measured by Bradford (purple curaua). The estimated sale price for a liter of this enzyme solution, when profit is not achieved (0% of desired markup), was estimated at R\$ 75, 06. So, the curaua's bromelain purification process using an aqueous two-phase system, PEG/salt, is promising with regard to the possibility of industrial scale production.

Key words: Bromelain, Curaua, Liquid-Liquid Extraction, Economic Viability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	4
1.1.1 Objetivos Gerais	4
1.1.2 Objetivos Específicos	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 CURAUÁ	6
2.2 PROTEÍNAS	10
2.3 ENZIMAS	12
2.4 BROMELINA	13
2.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	18
2.6 EXTRAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS	19
2.6.1 Sistema PEG/Sal	23
2.7 DIAGRAMA DE FASES	26
2.7.1 Fatores que Influenciam no Diagrama de Fases	27
2.8 PARTIÇÃO DE PROTEÍNAS EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS	29
2.8.1 Coeficiente de Partição	30
2.8.2 Influência da Massa Molar do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição	30
2.8.3 Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição	31
2.8.4 Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição	32

2.8.5 Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição	32
2.8.6 Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição	33
2.9 TEMPO DE SEPARAÇÃO DAS FASES	33
2.10 TRATAMENTOS FINAIS DOS PRODUTOS PURIFICADOS	34
2.11 APLICAÇÕES DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS EM LARGA ESCALA	35
2.12 CUSTOS	37
2.12.1 Classificações dos Custos.....	39
2.12.1.1 Custos Definidos em Relação ao Objeto de Estudo	39
2.12.1.2 Custos Definidos em Relação a Custo - Volume – Lucro.....	40
2.12.1.3 Custos Definidos em Relação ao Momento do Cálculo.....	41
2.12.1.4 Custos Definidos em Relação ao Período de Aplicação	41
2.12.1.5 Custos Definidos em Relação à Determinação da Rentabilidade e Avaliação do Patrimonial	42
2.12.1.6 Custos Definidos em Relação à Tomada de Decisões	42
2.12.2 Mão de Obra.....	43
2.12.3 Custos Indiretos de Fabricação	43
2.12.4 Estabelecimento do Preço de Venda	44
2.12.5 Ponto de Equilíbrio.....	45
2.13 AVALIAÇÃO ECONÔMICA	45
2.13.1 Métodos de Avaliação de Investimento	46

2.13.1.1 <i>Payback</i>	47
2.13.1.2 Valor Presente Líquido	47
2.13.1.3 Taxa Interna de Retorno	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 MATERIAIS	50
3.1.1 Reagentes	50
3.1.2 Equipamentos	51
3.2 MÉTODOS	52
3.2.1 Preparo das Amostras	52
3.2.1.1 Preparação da amostra a partir da folha de curauá	52
3.2.1.2 Preparo do reativo de biureto	52
3.2.1.3 Preparo da solução padrão de proteína	52
3.2.1.4 Preparo do reagente de Bradford	52
3.2.1.5 Preparo das soluções de PEG	53
3.2.1.6 Preparo das soluções de fosfato de potássio mono e dibásico	53
3.2.1.7 Preparo dos tampões	53
3.2.2 Determinação do pH Ótimo	54
3.2.3 Determinação da Temperatura Ótima	54
3.2.4 Determinação da Massa Molar	55
3.2.5 Cálculo da Atividade Enzimática	56
3.2.6 Obtenção das Binodais	57

3.2.7 Obtenção das Linhas de Amarração	58
3.2.8 Obtenção do Coeficiente de Partição da Bromelina do Curauá	58
3.2.9 Calibração do Espectrofotômetro.....	59
3.2.10 Cálculo do Preço de Venda da Solução Enzimática	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE DAS FOLHAS DO CURAUÁ	61
4.1.1 Estudo da Influência do pH sobre a Atividade da Protease	61
4.1.2 Avaliação dos Efeitos da Temperatura sobre a Atividade da Protease	62
4.1.3 Estimativa da Massa Molar das Enzimas do Curauá	64
4.1.4 Cinética da Reação de Hidrólise de BSA por Bromelina.....	66
4.2 DIAGRAMAS DE FASES E ESTABELECIMENTO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO	70
4.3 ESTUDO DA PARTIÇÃO DA BROMELINA DAS FOLHAS DO CURAUÁ	71
4.4 CÁLCULO DO CUSTO DE PRODUÇÃO DA BROMELINA DAS FOLHAS DE CURAUÁ	74
CONCLUSÕES E SUGESTÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÊNDICE	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Plantação de curauá branco e roxo (Foto: PEMATEC)	6
Figura 2.2 – Fruto do curauá (Foto: Pesquisa FAPESP <i>on line</i>)	7
Figura 2.3 – Fibras de curauá (Foto: PEMATEC)	9
Figura 2.4 – Ilustração de um diagrama de fase para um sistema bifásico aquoso PEG/fosfato	27
Figura 4.1 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco	61
Figura 4.2 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo	62
Figura 4.3 - Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco	63
Figura 4.4 - Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo	64
Figura 4.5 – Perfil eletroforético de proteínas de extrato de folhas de curauá.	65
Figura 4.6 – Bandas de massa molar nos perfis eletroforéticos de proteínas de extrato de folhas de curauá	66
Figura 4.7 – Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas das folhas do curauá branco.	67
Figura 4.8 – Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk – Curauá branco	68
Figura 4.9 – Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas das folhas do curauá roxo	69
Figura 4.10 – Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk – Curauá roxo	69
Figura 4.11 – Diagrama de fases do sistema PEG 6000/fosfato de potássio, em pH 9,0 e linhas de amarração	70
Figura 4.12 – Coeficientes de partição nos SBA da bromelina das folhas do curauá branco	72
Figura 4.13 – Coeficientes de partição nos SBA da bromelina das folhas do curauá roxo	73
Figura 4.14 – Tendências dos Coeficientes de partição nos SBA com PEG 4000 das folhas do curauá branco e roxo, em que LA são as linhas de amarração dos sistemas	73
Figura 4.15 – Tendências dos Coeficientes de partição dos SBA com PEG 6000 das folhas do curauá branco e roxo onde LA são as linhas de amarração dos sistemas	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Composição dos sistemas PEG 4000/Sal a $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ nos diferentes pHs	71
Tabela 4.2 - Composição dos sistemas PEG 6000/Sal a $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ nos diferentes pHs	71
Tabela 4.3 – Custos da matéria-prima da solução enzimática das folhas de curauá	75
Tabela 4.4 – Custo da mão de obra para produção da solução enzimática de bromelina das folhas de curauá	76
Tabela 4.5 – Demais elementos formadores do preço de venda - <i>Markup</i>	77
Tabela 4.6 – Variação do preço de venda em função da margem de lucro.	77
Tabela A.1 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 7,0.	94
Tabela A.2 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 8,0.	94
Tabela A.3 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 9,0.	95
Tabela A.4 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 7,0.	95
Tabela A.5 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 8,0.	96
Tabela A.6 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 9,0.	96
Tabela A.7 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 7,0.	97
Tabela A.8 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 8,0.	97
Tabela A.9 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 9,0.	98
Tabela A.10 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 7,0.	98

Tabela A.11 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 8,0. 99

Tabela A.12 - Partição da bromelina das folhas de curauá roxo, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 9,0. 99

LISTA DE ABREVIATURAS

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

BSA - Albumina de Soro Bovina.

C – Custo unitário.

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

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

COM – Comissão de Vendedores.

FEBRAFARMA – Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica.

IMP – Tributos Incidentes sobre o Preço de Venda.

K – Coeficiente de Partição.

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

M – *Markup*.

MLD – Margem de Lucro Desejada.

MM – Massa Molar (g/mol).

PV – Preço de Venda

PEG – Polietilenoglicol.

PI - Ponto isoelétrico.

p/p – Peso/Peso

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

SBA – Sistema Bifásico Aquoso.

t – Tempo (min).

T – Temperatura (° C).

V₀ – Velocidade inicial de reação (micromol de BSA/L.min).

V – Volume (L).

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

1 INTRODUÇÃO

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

Uma de suas funções é a enzimática (toda enzima é uma proteína). As enzimas são catalisadores extremamente eficazes nas reações biológicas, o que significa que aumentam a velocidade da reação sem, no entanto, deixarem-se afetar pela reação propriamente dita. As enzimas são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores, como carboidratos em açúcares, de catalisar alterações estruturais dentro de uma molécula, como a isomerização da glicose em frutose e, também, podem ajudar a construir moléculas específicas de material celular, por exemplo.

Desde a Antiguidade, o homem explora involuntariamente as enzimas para produzir alimentos e bebidas, como o pão, o queijo, a cerveja e o vinho, através da fermentação natural. Inicialmente, o cientista Von Liebig pensou que a fermentação resultasse de um processo químico comum, no qual os fermentos fossem materiais não vivos. Na mesma época, Louis Pasteur estava convencido de que a fermentação só ocorreria na presença de organismos viáveis. Em 1897, ficou demonstrado que compostos sem vida, provenientes de células de levedura viva, eram os responsáveis pelos processos de fermentação. Esse fato provou que nenhum deles estava totalmente certo. Foi-se, então, gradativamente substituindo o termo “fermento” pelo termo atual “enzima”, que significa “na levedura”, uma vez que, a princípio, esses compostos eram encontrados em células de levedura. Posteriormente, em 1926, James Summer isolou e cristalizou urease e postulou que enzimas eram proteínas, conceito revisto depois da descoberta das ribozimas. Logo depois, em 1930, John Northrop e Moses Kunitz cristalizaram a pepsina e a tripsina, e concluíram também que elas eram proteínas (LEHNINGER et al., 2002). Depois disso, centenas de enzimas foram classificadas, purificadas e isoladas.

As enzimas são extraídas de microorganismos, plantas ou tecidos animais e subdividem-se em categorias de acordo com os compostos sobre os quais agem ou com o tipo de reação que controlam. A lipase decompõe lipídeos e gorduras em glicerol e ácidos graxos; a amilase

decompõe amido em açúcares simples; a celulase decompõe a celulose; e a protease converte proteínas em aminoácidos.

Enzimas são largamente utilizadas em muitos ramos da indústria manufatureira. Muitos produtos alimentícios, como o pão e o queijo, são feitos com a colaboração desse tipo especial de proteína. Podem ser utilizadas como suplemento de ração animal, indústria de produtos de limpeza, no processamento da polpa e do papel, na preparação têxtil e em aplicações médicas, em que, com frequência, substituem compostos ou processos químicos.

Bromelina (EC 3.4.22.4) é uma enzima proteolítica encontrada no abacaxizeiro e em outras espécies de plantas da família *Bromeliaceae*, de grande aplicação industrial. Está presente na fruta e na planta, principalmente no talo. Em 1891, foi estabelecida a existência da bromelina como enzima proteica digestiva, por Marcano, químico venezuelano, o qual estudou sua atividade a partir do suco de abacaxi (BALLS et al., 1941). Os estudos que envolvem a produção de bromelina em escala industrial concentram-se na sua obtenção a partir do talo do abacaxizeiro, por esse ser um subproduto de sua exploração.

Outra planta que vem sendo estudada para a extração de bromelina é o curauá (*Ananas erectifolius* L.B. SMITH), uma monocotiledônea também pertencente à família das Bromeliáceas que não tem sua origem claramente determinada. Muitos afirmam que tenha sido transportado das Guianas e das Antilhas para o Brasil. Outros afirmam ser o curauá originário da própria região do vale do Amazonas. A planta é conhecida desde a era pré-colombiana, cultivada por pequenos produtores e utilizada na fabricação de cordas, sacos, redes e artesanato (BERGER et al., 2001). Produz uma fibra ultra-resistente e longa, que é utilizada nas indústrias têxtil, cosmética, farmacêutica, automotiva, calçadista, celulósica, construção civil e informática (SATYANARAYANA et al., 2007), e seu extrato atualmente não tem sido utilizado em importantes aplicações industriais, porém, aproveitado como mistura na ração animal e como adubo orgânico.

Na indústria de alimentos, a bromelina pode ser utilizada no amaciamento de carnes vermelhas; na cervejaria, para hidrolisar certos complexos proteína-taninos, formados durante a fermentação, que se presentes na cerveja, tornam-se insolúveis e formam turvações quando gelada; na suturação de feridas, nas queimaduras, principalmente as de 3º grau, para solubilizar mucos e melhorar a eficiência de raio X no útero, para minimizar as dores menstruais, quando

usada como solução de irrigação (HEINICKE & GORTNER, 1957; WHITAKER, 1976); na produção de pães e biscoitos a partir de farinhas de trigo de alto teor protéico (DIAZ, 1988; SCHMITT, 1994); na produção de ovos desidratados e na preparação de leite de soja e isolados protéicos (WHITAKER, 1976); na medicina é utilizada na digestão de vermes, como ascaris e trichuris (SILVA, 1991); como anti-inflamatório de origem vegetal em cirurgias; e, por último, tem sido estudada sua eficiência na inibição do desenvolvimento de células cancerígenas (ARÁUZ, 1982; TAUSSIG et al., 1985).

A atividade proteolítica é o principal parâmetro utilizado para avaliar o valor comercial da enzima. De acordo com Torres (2001), a medida da atividade enzimática é imprescindível para monitorar a purificação de uma enzima.

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

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

A procura por processos de separação/purificação de biomoléculas, produzidas a partir de processos biotecnológicos de baixo custo e que mantenham sua atividade, tem incentivado a pesquisa do sistema bifásico aquoso. Tal sistema consiste de duas soluções distintas, ambas dispersas em fase aquosa, que são misturadas nas proporções adequadas, e ocasionam a separação em duas fases ricas em água (de 70 a 90%). Não há necessidade do emprego de solvente orgânico que, em muitos casos, pode desestabilizar as biomoléculas. As condições de separação de biomoléculas levam em conta o tipo de polímero a ser empregado, e apresenta como a variável resposta o coeficiente de partição, que indica a distribuição da biomolécula entre as fases aquosas. Essas características tornam esse princípio de separação interessante para o emprego em

técnica de extração líquido-líquido de células, organelas celulares ou proteínas, pois permite a utilização de condições brandas, sem a presença de solventes orgânicos, e evita, por exemplo, a desnaturação da proteína de interesse. Esse enfoque mais recente tem recebido considerável interesse industrial como um meio de simplificar na purificação em larga escala de bioprodutos.

Frequentemente, determina-se o coeficiente de partição para a avaliação da extração. Tal coeficiente é dado pela razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando dissolvida em sistema constituído por duas fases aquosas. De acordo com Albertsson (1986), perto do ponto crítico de um sistema bifásico aquoso, em que as duas fases em equilíbrio apresentam composições bastante semelhantes, o coeficiente é próximo do valor unitário. A partir desse ponto, à medida que se aumenta a concentração dos componentes do sistema, afastando-o do ponto crítico, as biomoléculas distribuem-se de forma desigual entre as duas fases, e podem acumular-se preferencialmente na fase leve ou pesada.

Apesar de estar entre os dez maiores produtores de abacaxi, o Brasil importa quase toda bromelina utilizada nas indústrias. O preço no catálogo Sigma (2010) de um preparado parcialmente purificado é de cerca de US\$ 1,400/kg, e o preço da enzima usada industrialmente é, em média, 20% menor que este (MEINIG, 1999). O valor comercial aumenta à medida que aumenta sua pureza e, conseqüentemente, a sua atividade. Para isso, tem-se a necessidade de estabelecer os custos oriundos da produção em escala industrial.

Este estudo apresenta a caracterização e purificação da bromelina presente nas folhas do curauá, ao ser utilizado o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato de potássio e análise dos custos de produção envolvidos nesse processo de purificação, a fim de verificar se é comercialmente viável e tornar a pesquisa útil aos investidores.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Caracterizar e purificar as proteases presentes nas folhas do curauá das cultivares branco e roxo e analisar a viabilidade econômica do processo de purificação.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desta pesquisa são:

- Caracterizar a Bromelina, através da identificação de pH e temperatura ideais para sua utilização, estimativa da massa molar e determinação de seus parâmetros cinéticos;
- Experimentar diferentes sistemas de extração da bromelina, ao variarem-se as condições de pH, massa molar do polímero e concentração dos componentes das fases do sistema bifásico aquoso;
- Determinar o coeficiente de partição através de ensaios em batelada em sistemas bifásicos aquosos;
- Determinar o custo de produção da bromelina, com os dados do melhor sistema de extração da bromelina encontrado na pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CURAUÁ

Espécie vegetal de porte herbáceo, o Curauá (*Ananas erectifolius* L.B. SMITH), muito comum na Amazônia, é uma monocotiledônea pertencente à família *Bromeliaceae*. É oriundo dos Estados do Pará, Amazonas, Amapá, Acre, Mato Grosso e Goiás (LEDO, 1967).

Possui duas variedades: a roxa e a branca, cuja folha é aproveitada para a produção de fibra no estado do Pará. O curauá branco tem folhas mais curtas e estreitas que o curauá roxo. O caule do curauá branco, por sua vez, é mais curto que o do roxo. Segundo Berger (2003), o branco tem fibras mais claras e fortes. Conforme se pode observar na Figura 2.1, o roxo cresce mais rápido que o branco e também desenvolve mais massa em folhas e, por isso, tem maior rendimento em fibra que o curauá branco.



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

A planta apresenta sistema radicular fasciculado e superficial, sem raiz pivotante. O caule é curto e nele se inserem todas as folhas, dispostas em espiral. As folhas são eretas, coriáceas e lanceoladas, com dimensões de aproximadamente cinco centímetros de largura, dois a três milímetros de espessura e cerca de um metro e meio de comprimento. Os bordos são lisos, com um único espinho no ápice de cada folha. O fruto, apresentado na Figura 2.2, é do tipo sincarpo, pouco suculento e, embora comestível, é pouco apreciado. É uma planta de clima tropical e apresenta ótimo desenvolvimento e qualidade de fibra quando cultivado na região Amazônica. É exigente em luminosidade e não tolera áreas sombreadas. Cresce em solo arenoso e pouco fértil (JACOMINO, 2002). Uma das vantagens agronômicas do curauá é que a mesma planta pode ficar de cinco a oito anos no campo, dependendo da forma como foi cultivada. Um ano após o plantio, atinge a fase adulta, em que as folhas já podem ser colhidas para uso, procedimento que pode se repetir até quatro vezes por ano (ERENO, 2007).



Figura 2.2 – Fruto do curauá (Foto: Pesquisa FAPESP *on line*).

Estudos recentes têm demonstrado o grande potencial dessa planta como produtora de fibra de excelente qualidade, utilizada na indústria automobilística e têxtil devido à sua resistência, maciez e a seu peso reduzido, e pode ainda ser utilizada como celulose e ração animal. Há uma crescente demanda de fibras do curauá por grupos empresariais preocupados,

principalmente, na utilização de produtos naturais biodegradáveis, o que torna essa espécie estratégica para o Estado e cria perspectiva de melhoria da qualidade de vida aos pequenos produtores (LAMEIRA et al., 2003).

Entre as espécies de vegetação fibrosa da Amazônia, o Curauá oferece reais possibilidades de se transformar em importante fonte de matéria-prima para diversas indústrias no mundo. A princípio, o que motivou interesse em pesquisas sobre o Curauá foi a produção de fibras, uma vez que a planta apresentou resultados significativos em seu aproveitamento, quando comparado à fibra de vidro na relação peso/resistência, superando o Sisal, a Malva e a Juta.

De acordo com Jacomino (2002), a planta é conhecida desde a era pré-colombiana, mas nunca havia sido estudada ou explorada de forma intensiva. Várias tentativas ocorreram na região do município de Santarém-PA, o que objetivou a exploração comercial de sua fibra em larga escala, porém esbarraram em diversos problemas relativos a peculiaridades da região, normalmente relacionados a aspectos culturais da população local.

O mercado de fibras naturais no Brasil representa cerca de um milhão de empregos em áreas economicamente deprimidas. O surgimento de novos materiais ecológicos cria uma perspectiva de melhoria da qualidade de vida dos pequenos produtores que ocupam essas áreas. Recentes estudos garantem o seu grande potencial de utilização na indústria automobilística, devido à sua resistência, maciez e a seu peso reduzido. A espécie é nativa e rústica, e chega a atingir entre um metro e um metro e meio de altura (PEREIRA et al., 2007). Cada planta produz entre 12 e 15 folhas, das quais são extraídos cerca de dois quilos de fibras (RAMALHO, 2005 e ROCHA & GHELER JR, 2000).

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

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

Apenas na indústria automobilística há uma demanda de, aproximadamente, 1000 toneladas de fibra por mês. A PEMATEC/Triangel do Brasil – empresa de São Bernardo do Campo (São Paulo) fornecedora de componentes para a Volkswagen, fabricante da fibra vegetal utilizada na indústria automobilística -, produz atualmente 170 toneladas por mês de fibra. Em 2009, cerca de 500.000 carros saíram das linhas de montagem com o curauá. A fibra, apresentada na Figura 2.3, também foi adotada por fabricantes de estofados, calçados e colchões, além de continuar sendo usada pelos índios na fabricação de cordas, redes, cestarias e utensílios domésticos.



Figura 2.3 – Fibras de curauá (Foto: PEMATEC)

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

A família das Bromeliáceas é pouco investigada em relação à composição química das espécies que a constitui. As poucas informações atualmente disponíveis sobre espécies dessa família indicam a presença de grande diversidade de flavonoides (WILLIAMS, 1979) triterpenoides e de esteroides (DAHLGREN et al., 1985), além de polissacarídeos (MOYNA & TUBIO, 1977). A literatura menciona atividade anti-inflamatória, hipoglicêmica, imunomoduladora, anticoagulante e antiviral relacionadas aos polissacarídeos mucilaginosos encontrados em diferentes espécies vegetais e que foram encontrados também no *Ananas erectifolius* (SRIVASTAVA & KULSHRESHTHA, 1989; TOMADA et al., 1987).

Os índios e antigos caboclos da região Norte do país, há muito tempo, usam o curauá para aliviar a dor, e suas propriedades anti-inflamatórias foram comprovadas no Departamento de Microbiologia e Farmácia da Universidade Federal do Pará. Aprofundadas as investigações, confirmaram a sua segunda propriedade farmacológica: anestésica. De acordo com Taussig & Batkin (1988), o curauá tem sido usado para a extração de fármacos, como a bromelina, uma protease que interfere no crescimento de células malignas, inibe coágulos, tem atividade fibrinolítica e ação anti-inflamatória. Além disso, pode ser usado para extração de óleos essenciais, empregados na indústria alimentícia, como aromatizante e corretores de odor e sabor.

2.2 PROTEÍNAS

O nome proteína formou-se do grego *proteios*, que significa *primeiro*. Entre todos os compostos químicos, devem as proteínas certamente ser colocadas em primeiro lugar, pois são um dos principais constituintes dos organismos animais; são elas que agregam as diferentes partes do organismo e que dirigem o seu funcionamento. Encontram-se em todas as células vivas

e são o principal constituinte da pele, dos músculos, dos tendões, dos nervos e do sangue, das enzimas, dos anticorpos e de muitas hormonas (MORRISON & BOYD, 1986).

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

Quimicamente, as proteínas são altos polímeros. São poliamidas. Os monômeros de que elas se formam são os α -aminoácidos naturais. Uma única molécula de proteína contém centenas ou mesmo milhares de unidades aminoácidas. Há apenas uma vintena de unidades aminoácidas diferentes; no entanto, o número de combinações distintas, ou seja, o número de diferentes moléculas protéicas, possíveis, é quase infinito (MORRISON & BOYD, 1986).

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

Outra importante consequência da desnaturação de uma proteína é a perda de sua atividade biológica característica. Assim, quando uma solução aquosa de uma enzima, por exemplo, é aquecida até seu ponto de ebulição por uns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica.

A desnaturação de proteínas pode ser provocada não apenas pelo calor, mas também por valores inadequados de pH, por solventes orgânicos, por solutos como a uréia, pela exposição da proteína a alguns tipos de detergentes, pela agitação vigorosa da solução protéica até formação abundante de espuma, presença de certos íons ou sais caotrópicos na solução que contém as proteínas, oxidação, força iônica, entre outros.

Cada uma das formas citadas como causa de desnaturação pode ser considerada como tratamento relativamente suave, isto é, a desnaturação pode ocorrer em condições amenas, não há necessidade de ocorrer em condições drásticas. As moléculas de proteína nativa são frágeis e

facilmente desorganizadas pelo calor e outros tratamentos aparentemente suaves (YAO et al., 2002). Na maior parte dos casos, a desnaturação é um processo irreversível.

2.3 ENZIMAS

Envolvidas em todos os processos naturais que ocorrem, as enzimas, tipo especial de proteínas produzidas dentro das células dos organismos vivos, servem para auxiliar a digestão, processar nutrientes, produzir energia, dar destino a produtos residuais, rearranjar moléculas e regular uma variedade de outras funções metabólicas.

São moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas. Elas aumentam a velocidade com a qual as reações atingem o equilíbrio. A enzima dá início ao aumento da velocidade de uma reação química por atuar como catalisador. Um verdadeiro catalisador aumenta a velocidade de reação, mas ele próprio não é modificado durante o processo. Nos estágios intermediários da reação, a enzima liga-se à molécula que está sendo transformada e, à medida que o produto vai sendo liberado, a enzima é regenerada na sua forma original (SAID & PIETRO, 2002).

Praticamente todas as reações químicas que se processam nos organismos são catalisadas. A catálise das reações biológicas é imprescindível para a conservação e reprodução dos seres vivos, uma vez que a maioria das reações químicas que ocorrem nos organismos tem, na ausência de catalisadores, velocidades muito baixas. É comum encontrarem-se nas células reações que, na ausência de catalisadores, demoram várias horas, dias ou anos para se completarem ou terem velocidades iguais a zero, quando medidas em tempo finito (TORRES, 2001).

De acordo com Lehninger et al. (2002), a maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são demasiadamente improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis, ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação.

O estudo das enzimas também tem imensa importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas herdadas, pode ocorrer nos tecidos, a deficiência, ou mesmo a ausência total, de uma enzima ou mais. As enzimas tornaram-se importantes ferramentas práticas, não apenas na Medicina, mas também na indústria química, no processamento de alimentos e na agricultura. Essas tomam parte até mesmo nas atividades do dia a dia do lar, como na preparação de alimentos e na limpeza doméstica (LEHNINGER et al., 2002).

A maior parte das enzimas produzidas industrialmente tem aplicação na produção, conservação e modificação de produtos animais e vegetais (em especial os alimentos), na produção de medicamentos (vitaminas e hormônios) e na produção de derivados de matérias primas animais e vegetais. Em todos os casos de aplicação citados, trata-se fundamentalmente de imitar tecnologicamente o que é feito na natureza, embora em escala condicionada à necessidade e à vontade do homem (KIELING, 2002).

Os vegetais são limitados como fonte de enzimas, uma vez que geralmente a quantidade de enzima, que pode ser extraída de uma grande massa vegetal, é bem pequena; isso se torna economicamente viável apenas aonde a mão de obra e a terra têm baixo custo. Nessas condições, poucas são as enzimas que podem ser obtidas, entre elas, as proteinases, papaína, bromelina e ficina.

2.4 BROMELINA

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e têm o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou, ainda, bromelina e têm o número sistemático EC 3.4.22.5. A bromelina é uma glicoproteína e tem um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. A bromelina do talo é uma enzima sulfidrídica, e esse grupamento é essencial para sua atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização

isoeletrica como pH 4,6, e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 (MURACHI, 1976).

A matéria-prima mais empregada para obtenção de bromelina são os talos maduros de abacaxizeiros, ao serem utilizados após a colheita das frutas; no entanto, podem ser usadas também folhas, suco, cascas e resíduos. A bromelina aparece em maior concentração na porção inferior dos talos de plantas maduras. A porção central do talo contém mais proteases do que a porção mais externa (BALDINI et al., 1993). Já Heinicke & Gortnet (1957) afirmaram que os talos imaturos mais novos e suculentos não possuem ou apresentam baixos teores de bromelina.

De acordo com Cesar (2005), a enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto e seu nível aumenta rapidamente; assim, mantém-se elevado até o amadurecimento, quando tem pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi (*Ananas comosus*) em comparação com outras proteases vegetais. O abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro, mesmo com diminuição de sua atividade proteolítica na maturação. No figo e no mamão, a ficina e papaína são encontradas em níveis elevados apenas no fruto verde, sua concentração de protease desaparece com o seu amadurecimento.

No abacaxi, diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto (CESAR, 2005). Omar et al. (1978) e Tisseau (1976) determinaram o rendimento de bromelina em diversas partes do abacaxizeiro e verificaram que o talo apresentou valores muito superiores que o fruto, o cilindro central, a casca e a polpa.

Os usos da bromelina são diversos, todos baseados em sua atividade proteolítica. As medidas de concentração de soluções, expressas em unidades de massa por unidade de volume, não têm aplicação para soluções enzimáticas, já que para essas o que importa não é a massa, mas a *atividade*, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, essa medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar tais dosagens, uma amostra da solução que contém a enzima é incubada com concentrações altas de substratos (para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas). A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma *Unidade Internacional* (U) é a quantidade

de enzima capaz de formar 1µmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura, etc.), especificadas para cada caso (TORRES, 2001).

Estudos feitos por Becze (1970), Greenberg (1965), Johnson (1977), Murachi & Neurath (1960), Yamamoto (1975) e Wieland (1972) comprovam sua utilização em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc. (BORRACINI, 2006). De acordo com Rowan et al. (1990), a bromelina do fruto tem atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos proteicos, e sua atividade é máxima em pH 8,0 e 70 °C de temperatura, enquanto a bromelina do talo apresentou atividade máxima em pH 7,0 e 60 °C.

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

Murachi (1976) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração e determinou a massa molar da fração pura de 28 kDa, por SDS-PAGE. Suh et al. (1992) purificaram a bromelina do fruto (18 vezes de aumento de pureza) e do talo (46 vezes de aumento de pureza) até a homogeneidade, por cromatografia de gel-filtração e determinaram as massas molares de 32.5 e 37 kDa, respectivamente, com rendimento de 23% em atividade. Conforme descrevem Rowan et al. (1990), são quatro as proteases principais presentes no abacaxi (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

Cesar (2000) estudou a extração da bromelina do fruto do abacaxi e utilizou sistema bifásico formado por PEG/sal (fosfato de potássio). Os resultados mostraram-se promissores, com um coeficiente de partição de aproximadamente 3,9 para pH 9,0, PEG 1500 e com concentrações de 17,5% do PEG e 15% do sal.

Estudos feitos por Ferreira (2007) na extração da bromelina da casca e talo do abacaxi, que também utilizou sistema bifásico formado por PEG/sal (fosfato de potássio), indicaram bons

resultados quando o pH era alto (9,0, 10,0 e 11,0), para PEG 4000 e concentrações de 50% do PEG e 15% do sal.

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

Introduzida pela primeira vez como composto terapêutico em 1957, a ação da bromelina inclui: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação anti-inflamatória, ação antitumoral, modulação de citocinas e imunidade, propriedade debridante de pele, aumento da absorção de outras drogas, propriedades mucolíticas, facilitador da digestão, acelerador da cicatrização, melhora da circulação e sistema cardiovascular. Bromelina é bem absorvida por via oral, e a evidência disponível indica que sua atividade terapêutica aumenta com as doses mais altas. Apesar de todos os seus mecanismos de ação ainda não estarem totalmente esclarecidos, foi demonstrado que é um seguro e efetivo suplemento. A bromelina parece ter tanto ação direta quanto indireta, envolvendo outros sistemas enzimáticos, ao exercer seus efeitos anti-inflamatórios (MATTOS, 2005).

Maurer (2001) efetuou estudos com talos e frutos de abacaxi e comprovou que estão presentes, entre outros componentes, várias proteinases, demonstrou *in vitro* e *in vivo* atividades anti-inflamatórias, antiedemas e antitromboses.

Segundo Meinig (1999), o primeiro efeito da bromelina relatado foi como digestivo, ao serem substituídas a pepsina e a tripsina em tratamentos de insuficiência pancreática. É utilizada também no tratamento de cardiopatias, artrite reumatóide, traumas cirúrgicos, edemas, sinusites; devido, principalmente, à sua capacidade de facilitar a coagulação sanguínea, por diminuir os edemas e também por apresentar efeito anti-inflamatório. Faz parte de componentes ativos de fármacos que ativam a circulação sanguínea e respiração, pois suprimem os depósitos proteicos em veias e artérias. Nas terapias contra o câncer, é utilizada no aumento de lises de células cancerosas. Recentemente, tem sido relatado que as proteases extracelulares têm papel específico regulatório na modulação da resposta imune e também pode agir como sinalizadora em processos de mutagêneses (MYNOTT et al., 1999). A bromelina promove o aumento nos níveis de

antibióticos quando administrada concomitantemente a eles (LOTZ-WINTER, 1990). Também é usada em forma de solução para preparação de suspensão de hemácias a ser utilizada na tipagem sanguínea.

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

Michelini (2003) fez estudos de mensuração da atividade da bromelina em plantas de curauá e verificou que a folha, tanto na cultivar branco quanto roxo, apresenta teores menores de atividade enzimática em relação ao fruto 27,4% e 36,18%, respectivamente. Esses valores se aproximam dos valores encontrados por Cesar et al. (1999) ao trabalharem com talo, casca e fruto de abacaxi. O potencial de obtenção da bromelina do curauá também pode ser igualmente significativo, já que, de acordo com Leão et al. (1998), as fibras representam em torno de 5 a 8% da planta, e o restante é considerado resíduo.

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

2.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A diversidade e a crescente importância apresentadas pelos produtos biotecnológicos incentivou o desenvolvimento de vários processos de purificação. Os produtos da indústria biotecnológica são muito diversificados (ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos, peptídeos e proteínas), bem como sua localização em relação à célula. Como resultado dessa diversidade, não há processos de purificação de aplicação geral. Entretanto, o processo pode ser dividido em quatro etapas principais: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução, a qual compreende a separação da molécula alvo, por exemplo, uma proteína em relação a moléculas com características físico-químicas significativamente diferentes (água, íons, pigmentos, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos); purificação de alta resolução, a qual compreende a separação de classes de moléculas com algumas características físico-químicas semelhantes, como, por exemplo, proteínas; e, finalmente, operações para acondicionamento final do produto (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001).

A definição das operações unitárias de um processo de purificação depende do uso da molécula alvo, suas características físico-químicas, bem como aquelas das impurezas. Produtos destinados a usos terapêuticos são, obviamente, os que requerem maior nível de pureza e, portanto, a complexidade do processo de purificação é elevada. Uma medida dessa complexidade é o custo do processo de purificação em relação ao custo final do produto, o qual pode chegar a 80% (ASENJO, 1990).

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

A escolha do método depende das propriedades da proteína e do grau de pureza desejado. Com relação à cromatografia, por exemplo, existem vários princípios de separação que

são selecionados de acordo com as propriedades físico-químicas de cada substância de interesse. Assim, para uma amostra que contém mistura de proteínas de diversas massas molares, pode-se aplicar a gel filtração que utiliza o princípio de separação por tamanhos. Quando o fator é a hidrofobicidade, a melhor opção é a cromatografia por interação hidrofóbica (ASENJO, 1994).

A purificação de proteínas encontra muitas dificuldades e exige elevado número de etapas, tem-se como exemplo a remoção dos fragmentos da célula devido ao pequeno tamanho das partículas e à viscosidade da solução. Além disso, as etapas de precipitação podem levar a baixos rendimentos, reprodutibilidade limitada; e o uso de procedimentos cromatográficos, em muitos casos, é limitado pela escala e custos operacionais (HUSTEDT et al., 1988).

O processo de extração líquido-líquido já é usado há várias décadas na indústria de antibióticos, e é reconhecido como um processo bastante útil na recuperação e na separação de proteínas, particularmente porque pode ser facilmente operado em larga escala e, também, se necessário, em processo contínuo (ASENJO & CHAUDHURI, 1996).

A extração líquido-líquido é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis. Na extração líquido-líquido, a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido, insolúvel ou parcialmente solúvel (o solvente), no qual o componente será extraído da solução (o soluto), que é preferencialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. Esse processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases e a miscibilidade parcial dos líquidos (RABELO, 1999).

2.6 EXTRAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

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

Proteínas, extremamente sensíveis à desnaturação, podem ser purificadas em sistemas constituídos por duas fases aquosas imiscíveis, em decorrência de partição diferenciada da molécula de interesse e impurezas entre as fases líquidas. O que garante a manutenção das

propriedades da proteína é o elevado teor de água (75 a 80% em massa). Em 1956, Albertsson propôs o uso do sistema de duas fases aquosas para a purificação de proteínas e partículas de células. Desde então, a extração em sistema de duas fases aquosas tem sido aplicada à purificação de produtos obtidos em células animais, vegetais e microbianas, na separação de vírus, organelas e ácidos nucleicos (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001).

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

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

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

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

Sistemas de duas fases aquosas são formados pela reunião de determinados polímeros em uma mesma solução ou, ainda, polímeros em combinação com solutos de baixa massa molar. São alguns sistemas comuns: polietilenoglicol (PEG) / dextrana (Dx), polipropilenoglicol (PPG) / Dx; sulfato de dextrana de sódio / PPG; PEG / fosfato de potássio (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001). A fase mais leve é rica em polietilenoglicol, enquanto a mais pesada é enriquecida com dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água e separam-se em duas fases (ALBERTSSON, 1986). De acordo com Coimbra (1995), eles constituem um meio

conveniente e adequado para a extração de substâncias de origem biológica, pois a constituição das fases, entre 70% e 90% de água, proporciona ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, que preservam sua estabilidade molecular e permitem, assim, o seu processamento nesse meio.

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

A extração com sistemas de duas fases aquosas oferece certas vantagens para o processamento em larga escala. Algumas delas são: o elevado rendimento, a faixa de trabalho próxima do equilíbrio, a fácil ampliação de escala (*scale up*) e o uso em processos contínuos. Com isso, o interesse na aplicação de sistemas de duas fases aquosas deixou de se restringir à biologia celular para concentrar-se na análise dos fundamentos da separação de fases e da partição de proteínas; na redução dos custos do processamento; no aumento da seletividade da extração (por exemplo, pela adição de ligantes); na pesquisa de novos componentes formadores das fases, especialmente para substituir a dextrana, que é um componente de elevado custo; e na operação em múltiplos estágios (COIMBRA, 1995).

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

- Dois polímeros não iônicos;

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

- Um polieletrólito e um polímero não iônico;

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

- Dois polieletrólitos;

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

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

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

Há ainda novos sistemas formados por PEG/ FeSO_4 e PEG/ Na_2SO_4 que apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas com sais de fosfato e citrato, como, por exemplo, o baixo nível de PEG na fase salina, que reduz as perdas do PEG e facilita a purificação das biomoléculas e a reciclagem do PEG. Nesse tipo de sistema, foi observado que a concentração de sal na fase PEG e a concentração na fase salina tendem a diminuir com o aumento da temperatura (PATHAK et al., 1991).

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

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

O sucesso do sistema de duas fases aquosas como processo de potencial aplicação comercial foi provado pela existência de numerosos relatos associados com a recuperação de grande número de produtos biológicos. No entanto, uma característica muito conhecida da nova técnica é a falta desse sistema em grande escala como parte de processos de separação comerciais. Isso pode ser atribuído ao fato de que o conhecimento do mecanismo de distribuição de solutos no sistema de duas fases aquosas é limitado. Consequentemente, as indústrias apresentam certa relutância em “abraçar” a tal técnica como parte de seus próprios processos. Desse modo, relatos que tratam da adoção comercial do sistema de duas fases aquosas não são comuns. Contudo, é bem conhecido o estudo comprovando o sucesso da aplicação de tal sistema em grande escala (10.000 L de fermentação) para a recuperação de periplásmico IGF-I. Esse sucesso resultou em um dos poucos casos industriais conhecidos, no qual a aprovação comercial

de sistema de duas fases aquosas para a recuperação de um produto biológico foi alcançada (RITO-PALOMARES, 2004).

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

2.6.1 Sistema PEG/Sal

A formação de sistemas PEG/sal foi observada primeiramente por Albertsson nos anos 50, mas os fundamentos teóricos ainda não são bem explicados. Eles foram introduzidos para a aplicação prática da separação de proteínas em larga escala devido à maior diferença de densidade entre as fases, à menor viscosidade e a menores custos; e levou a uma separação mais rápida do que para os sistemas PEG/dextrana. A aplicação industrial de sistemas PEG/sal foi incentivada e desenvolvida pela disponibilidade de separadores comerciais que permitam separações de proteínas continuamente e de forma mais rápida. (FRANCO, 1992 e KULA, 1990).

Para sistemas PEG/sal, os efeitos de *salting out*¹ parecem atuar ao aumentar o comprimento da linha de amarração, ao retirarem-se as proteínas da fase salina para a fase rica em PEG, ou se a solubilidade da proteína na fase rica em PEG não for suficiente, elas tendem a precipitar na interface. Os limites de solubilidade e *salting out* são dependentes das proteínas, portanto uma resposta diferencial é esperada quando uma mistura de proteínas é manipulada (KULA, 1982).

Os polietilenoglicóis são constituídos por polímeros de óxido de eteno, com a fórmula geral $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$. De acordo com o Boletim Técnico da Oxiteno, conforme o grau de

¹ *Salting out* é um método de separação de proteínas com base no princípio de que as proteínas são menos solúveis em altas concentrações de sal. A concentração de sal necessária para que a proteína precipite para fora da solução difere de proteína para proteína. Esse processo também é usado para concentrar soluções diluídas de proteínas.

etoxilação (n), pode-se obter produtos com diferentes valores de massa molar e diferentes estados físicos, o que permite diversas aplicações. A característica hidrófila da cadeia de polioxietileno permite obter um polímero higroscópico bem solúvel em água. Ao variar-se a massa molar, é possível obterem-se produtos líquidos ou sólidos que abrangem ampla faixa de viscosidade e consistência. Essas características, aliadas à sua baixa volatilidade e toxicidade, são determinantes na aplicação em formulações cosméticas, por exemplo.

O PEG é também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E[®], carbowax E[®], conforme a empresa que o fabrica. Para massas molares acima de 20000 Daltons, são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas, se possuírem massas molares menores que 1000 Da. Os de massas molares elevadas, acima de 1000 Da, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Podem ser estocados à temperatura ambiente, embora a 40°C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. A oxidação do PEG, detectada pela diminuição do pH devido à liberação de grupos ácidos, altera a coloração da solução para marrom (COIMBRA, 1995).

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

Fosfato é um sal inorgânico de grande uso industrial. Apresenta-se em forma de cristais brancos ou em pó cristalino, inodoro, solúvel em água e insolúvel em álcool. Não é inflamável e possui toxicidade muito baixa. É utilizado em sistemas de duas fases aquosas do tipo polímero/sal, pois forma duas fases na presença de polímeros e possui baixo custo.

O fosfato de potássio monobásico, de fórmula química KH_2PO_4 , tem massa molar 136,09 e é utilizado em tampões para determinação de pH, em produtos farmacêuticos como agente tamponante e também como nutriente em fermentações. Sua cinética de dissolução em água é lenta, e necessita de aquecimento para sua dissolução total em altas concentrações.

O fosfato de potássio dibásico anidro, de fórmula química K_2HPO_4 , tem massa molar 174,18 e é utilizado em: soluções nutrientes, uso farmacêutico em fermentações, produção de antibióticos, aditivo de alimentos, sequestrante em alimentos, etc. A cinética de dissolução em água é mais rápida que o monobásico.

De acordo com Kroner et al. (1984), a possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao efetuar-se a produção em grande escala, pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com o volume de produção. A reciclagem de PEG pode ser facilmente integrada ao processo, que chega a níveis de recuperação em torno de 90 a 95% (HUSTEDT et al., 1988).

As técnicas de recuperação de PEG mais usadas são a ultrafiltração e a extração com solvente orgânico seguida de evaporação (COIMBRA, 1995). O descarte de sais é geralmente mais problemático. Em sistemas que contêm células, ácido nucléico, proteínas solúveis e insolúveis, a separação de sais da fase primária por técnicas de separação mecânica, tais como a centrifugação ou ultrafiltração, é muito difícil de ser conduzida eficientemente. A eletrodialise é considerada um método geral para reciclagem de sais e para dessalinização da fase rica em PEG (HUSTEDT et al., 1988).

Sais também podem ser recuperados ao ser usada mistura álcool alifático-sal-água. Especificamente para separação de fosfato de potássio, um resfriamento abaixo de 6 °C provoca a precipitação do sal, e possibilita a sua reutilização (PAPAMICHAEL et al., 1992, COIMBRA, 1995).

Greve & Kula (1991) estudaram maneiras de reciclar a fase fosfato desses sistemas para minimizar a poluição ambiental. A reciclagem de fase fosfato foi obtida pela sua separação

através do uso de alcoóis. Rica em PEG, a fase de topo também pode ser reciclada, isso pode ser visto em alguns trabalhos de Kula e Hustedt, principalmente.

2.7 DIAGRAMA DE FASES

O sistema de duas fases aquosas é representado em um diagrama de fases, no qual a ordenada representa a composição em massa da molécula que apresenta maior concentração na fase superior (fase de menor densidade) e a abscissa representa a composição da molécula que apresenta maior concentração na fase inferior (fase de maior densidade). Composições representadas por pontos acima da curva de equilíbrio levam à formação de duas fases e, abaixo da curva, a uma só fase. A formação de um sistema de duas fases aquosas depende, portanto, da concentração dos componentes do sistema. A Figura 2.4 apresenta a curva binodal de um diagrama de fases em sistema PEG/Fosfato.

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

As diversas linhas de amarração existentes são paralelas entre si, como mostra a linha que passa pelo ponto N. Existe ainda um ponto crítico C (indicado na Figura 2.4), em que a adição de uma pequena quantidade de água transforma o sistema bifásico em solução homogênea e, teoricamente, nessa situação, as duas fases devem possuir a mesma composição e volume.

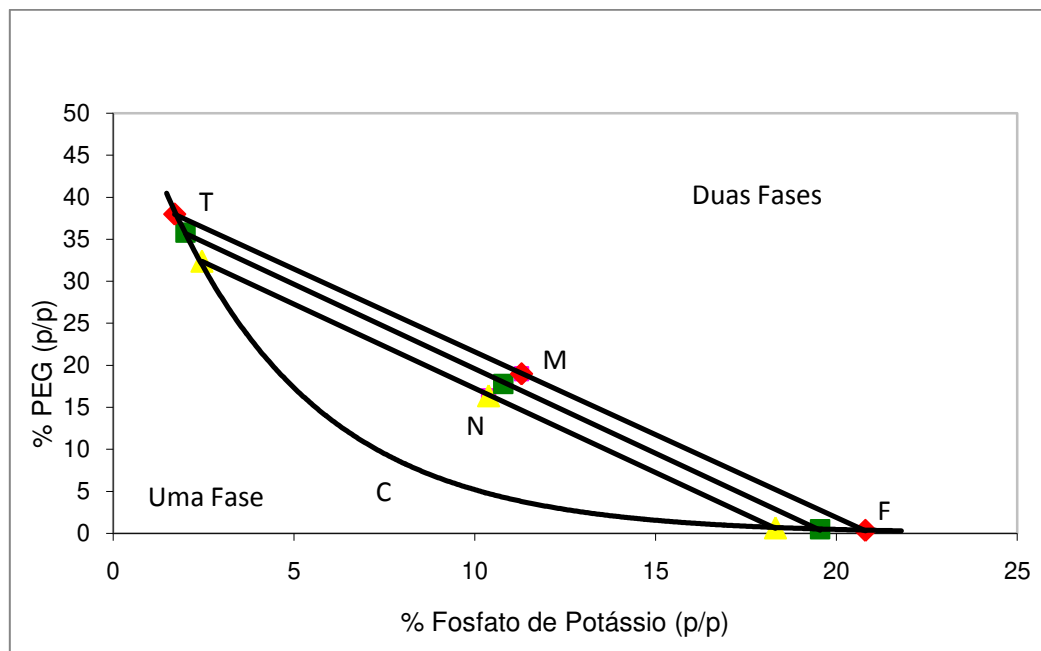


Figura 2.4 – Ilustração de um diagrama de fase para um sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. Os pontos indicam: C, ponto crítico; T, composição da fase superior; F, composição na fase inferior; M, composição total do sistema e N indica uma nova linha de amarração.

2.7.1 Fatores que Influenciam no Diagrama de Fases

Valores de pH, temperatura, tipo de sal e massa molar do polímero são variáveis que influenciam na curva binodal.

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

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

Ainda segundo Cesar (2005), a temperatura influencia o diagrama de fases, pois altera a composição das fases no equilíbrio, desloca a curva binodal e modifica também o comprimento da linha de amarração. Em geral, o comprimento da linha de amarração diminui com o aumento de temperatura. O seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema. Em sistemas PEG/dextrana, a formação das fases é facilitada em temperaturas baixas (menores que a ambiente) e para os sistemas PEG/fosfato, a situação é oposta, visto que temperaturas mais altas e próximas do ambiente facilitam a separação entre as fases. Quando o sistema está próximo ao ponto crítico, ele é mais instável devido ao deslocamento da curva binodal, e pode atingir mais facilmente a região monofásica. O aumento da temperatura do sistema causa, ainda, em sistema PEG/sal, aumento na concentração de PEG na fase polimérica e redução da sua concentração na fase salina. Esse efeito é uma das razões de se trabalhar com a temperatura do sistema fixa.

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

² Os íons do sal associam-se com a superfície da proteína. Isso protege as áreas das moléculas de solvente (água). Na prática, significa que menos moléculas de água são necessárias para interagir com a superfície da proteína, e a concentração de água livre é aumentada.

2.8 PARTIÇÃO DE PROTEÍNAS EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Os fundamentos de partição de biomoléculas entre duas fases ainda não são totalmente compreendidos, apesar do progresso alcançado com a modelagem termodinâmica da distribuição de proteínas na interface dos sistemas de duas fases aquosas. Devido ao grande interesse industrial no desenvolvimento de tecnologias na área de bioengenharia, também se renovou o interesse pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas que servem de base para a produção em escala industrial.

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

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

- Tipo dos polímeros que formam as fases: massa molar média, distribuição da massa molar, modificações químicas poliméricas;
- pH e temperatura;
- Biomolécula: tamanho, carga, propriedades superficiais, concentração;
- Composição das fases: comprimento da linha de amarração, tipos de íons presentes ou adicionados ao sistema, força iônica.

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

2.8.1 Coeficiente de Partição

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

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

Em que:

C_T é a concentração da substância de interesse na fase superior, no equilíbrio;

C_F é a concentração da substância de interesse na fase inferior, no equilíbrio.

O K é uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse, pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Coeficientes de partição para a molécula de interesse e para as demais moléculas, significativamente distintos, indicam ocorrência de purificação (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001).

Diversos tipos de interações podem ocorrer entre as substâncias de interesse e os componentes do sistema, tais como: interações de cargas, interações entre as pontes de hidrogênio, força de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Assim, uma série de fatores pode contribuir para a eficiência da partição (ALBERTSSON, 1986).

De acordo com Kilikian & Pessoa Jr (2001), ao considerar-se que as moléculas se distribuem entre as fases em conformidade com suas solubilidades, características físico-químicas das proteínas (hidrofobicidade e carga superficial) e da solução (pH e força iônica), essas propriedades serão determinantes para o valor de K .

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

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

A massa molar do polímero influencia no valor de K . Em um sistema PEG/sal, se a massa molar do PEG for elevada, a partição da proteína será mais favorável à fase salina, devido

ao mecanismo da exclusão molecular. A magnitude desse fenômeno é diretamente proporcional à massa molar das proteínas (ASENJO, 1990). Caso a massa molar do PEG seja baixa, ocorrerá o oposto, a partição será favorável à fase polimérica. O mesmo ocorre nos sistemas PEG/dextrana: caso a massa molar do PEG seja elevada e a da dextrana seja baixa, a partição será favorável à fase contendo dextrana. Isso ocorre devido ao aumento do efeito do volume excluído que ocorre na fase PEG. Esse efeito é menor para substâncias de baixa massa molar.

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

O K depende também da massa molar da proteína. Ele diminui com o aumento da massa molar, e a magnitude dessa diminuição é maior para PEG com baixa massa molar e tende a ficar estável para PEG com alta massa molar (ALBERTSSON, 1986; FORCINITI et al., 1991). O tipo de proteína também influi no valor de K , porque as proteínas são macromoléculas polieletrólitas que carregam cargas quando estão em soluções aquosas. As cargas dependem da composição, da sequência de aminoácidos e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos (SCHLUCK et al., 1995).

2.8.3 Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição

Outro fator importante que influencia o K é o pH do sistema. Alterado o pH, ocorrem mudanças na distribuição de cargas da proteína. Em baixos valores de pH, ocorre o aumento da carga positiva e em valores altos de pH, da carga negativa. Ao trabalhar-se em um valor de pH próximo ao ponto isoeletrico (PI), em que 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, ao considerar-se apenas os efeitos eletrostáticos. (FORCINITI et al., 1991).

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

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

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

2.8.5 Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição

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

em sal para a fase rica em PEG (ALBERTSSON, 1986; BAMBERGER et al., 1985; MINAMI, 1997).

2.8.6 Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição

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

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

2.9 TEMPO DE SEPARAÇÃO DAS FASES

O tempo requerido para que as fases separem-se varia consideravelmente para diferentes sistemas. Isso depende da diferença na densidade entre as duas fases e suas viscosidades. Perto do ponto crítico, a diferença da densidade é pequena, e o tempo de separação é grande. Longe do ponto crítico, a concentração de polímeros e a viscosidade são altas, o que torna o tempo de separação também longo para esses sistemas. Assim, para composições intermediárias, o tempo de separação é menor (ALBERTSSON, 1986).

Também influencia no tempo de separação 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 (BAMBERGER et al., 1985).

Em um dado sistema, o tempo de separação também depende da relação dos volumes das duas fases se estes têm viscosidades diferentes. Caso a fase mais viscosa for maior em volume do que a outra fase, o tempo de separação será maior do que se a fase mais viscosa tiver volume semelhante ou menor do que a outra fase. Os sistemas PEG/sal e PEG/Dextrana têm um tempo de separação pequeno, de 5 a 30 minutos, enquanto os sistemas Ficoll/Dextrana ou Metilcelulose/Dextrana usualmente têm tempo de separação maior, de 1 a 6 horas. Esses tempos dados são os necessários para o volume principal das fases separar, ou seja, até que uma interface horizontal tenha sido formada. Usualmente, pequenas gotas das fases permanecem por um longo tempo, mesmo depois que a interface horizontal é evidenciada (ALBERTSSON, 1986).

2.10 TRATAMENTOS FINAIS DOS PRODUTOS PURIFICADOS

O grau de pureza necessário de um produto biotecnológico depende de sua aplicação final. A simples secagem de microorganismos cultivados para produção de proteína celular é suficiente para sua comercialização. Caldos enzimáticos impuros ou parcialmente purificados podem ser utilizados como catalisadores em conversões químicas industriais, como, por exemplo, na produção de xarope de frutose em que se utiliza a enzima glicose isomerase. No entanto, uma purificação final é necessária para grande parte dos produtos biotecnológicos, especialmente aqueles de uso farmacêutico. Nesse caso, os produtos devem estar puros, secos, cristalinos ou amorfos. Para tanto, devem ser submetidos a alguns tratamentos finais, como a cristalização ou liofilização (KILIKIAN & PESSOA JR, 2001).

Cristalização é o processo de agregação de cristais de moléculas presentes em soluções homogêneas supersaturadas. É uma técnica comumente empregada na fase final dos processos de purificação de proteínas, particularmente as enzimas. A cristalização é de grande importância em processos biotecnológicos, pois permite a estocagem estável de bioprodutos. Na etapa final de purificação de enzimas, essas devem estar em grau relativamente alto de pureza, pois a cristalização pode ocorrer em misturas impuras de proteínas. Após a cristalização, o produto pode ser recuperado por filtração ou centrifugação seguido de secagem. Compostos cristalizados são

estáveis, pois as moléculas são imobilizadas. Soluções protéicas cristalizadas contaminadas por proteases têm sua atividade preservada, uma vez que a enzima também cristaliza (BELTER et al., 1988; SCOPES, 1994).

Liofilização é o processo de remoção de solvente, tipicamente a água, de uma solução por sublimação. Nesse processo, o material é congelado e em seguida submetido à baixa pressão para sublimação da água livre. Durante o congelamento, a água transforma-se em gelo, num variado, porém, alto grau de pureza, e os solutos são concentrados. Como resultado, as propriedades físico-químicas (pH, força iônica, viscosidade, ponto de congelamento, tensão superficial e interfacial) da fase não congelada alteram-se significativamente. Os materiais liofilizados são apresentados na forma de pó, e as atividades biológicas mantêm-se estáveis por muito mais tempo, quando comparadas com a conservação em solução aquosa. Por esse motivo, muitas proteínas comerciais estão disponíveis na forma liofilizada. Porém, se a liofilização não for adequadamente planejada, pode ocorrer desnaturação de enzimas (HARRIS & ANGAL, 1994).

Importante destacar que, tanto a cristalização, quanto a liofilização, merecem ser realizadas com cuidados, a fim de manter a atividade das proteases.

2.11 APLICAÇÕES DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS EM LARGA ESCALA

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido feitas com sistemas de duas fases aquosas em escala laboratorial para a separação de proteínas, organelas celulares, vírus e outros materiais biológicos. A aplicação desses sistemas para a partição de proteínas em larga escala também vem sendo demonstrada através da utilização de centrífugas e extratores (DIAMOND & HSU, 1992; WALTER et al., 1991).

A extração em duas fases aquosas exhibe inúmeras vantagens sobre outros métodos de separação e recuperação. De acordo com Albertsson (1986) e Walter et al. (1991), as principais vantagens da aplicação dos sistemas bifásicos aquosos são:

- Facilidade no aumento de escala;
- Rápida transferência de massa;
- Equilíbrio alcançado com recurso a baixas energias na forma de mistura mecânica;

- Possibilidade de operação em contínuo e à temperatura ambiente, que é mais econômico que outros processos de separação.

As operações que envolvem os sistemas bifásicos aquosos são, de modo geral, facilmente executadas em qualquer escala técnica. Isso se deve principalmente à rapidez com que ocorre o equilíbrio das fases, o qual atinge um coeficiente de partição constante, devido à baixa tensão interfacial desses sistemas, à simplicidade das unidades de operação e à disponibilidade comercial dos equipamentos necessários (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). Em particular, a facilidade em obter-se o *scale up* pode ser demonstrada pela independência do coeficiente de partição com relação ao volume dos sistemas. Aumentos de escala com fatores de 25.000 já foram mencionados na literatura. Para facilitar a utilização desses sistemas de escala laboratorial para larga escala, no entanto, faz-se necessária a caracterização do sistema bifásico adequado para a partição de determinada proteína e a correlação deste com o coeficiente de partição da biomolécula (DIAMOND & HSU, 1992).

Assim, quando se deseja isolar determinada proteína de uma mistura complexa, torna-se essencial encontrar condições ideais. Isso é realizado normalmente, conforme descrito acima, com experimentos em escala laboratorial, para então se realizar o *scale up*. Para fazer-se o projeto a partir de um experimento, é importante otimizar o rendimento e a partição *versus* o restante dos componentes da mistura, isto é, o fator de purificação. A grande vantagem é que os componentes que podem prejudicar os passos de purificação são removidos sem a necessidade da utilização de centrifugações e filtrações por membranas. Ainda, a partição espontânea de proteínas reside no fato de que o material contaminante é facilmente removido em um só passo. Sob condições favoráveis, é possível atingir elevado fator de purificação no primeiro passo de extração (MATIASSEN & LING, 1987).

Resultados obtidos com a taumatina (proteína com propriedades adoçantes) revelaram, em um único passo de extração com sistema bifásico PEG – 6000/ Fosfato contendo NaCl, a partir de extrato bruto livre de fragmentos de células, valores de rendimento e fator de purificação de 90-95% e 20, respectivamente (CASCONE et al., 1991).

Estudos feitos por Kroner et al. (1984) estabeleceram comparação entre os processos de purificação, que utiliza os sistemas de duas fases aquosas e o processo convencional constituído essencialmente por precipitação, seguida por dois passos cromatográficos, e obtiveram graus de pureza semelhantes, os quais atingiram rendimento superior no protocolo de extração líquido-

líquido (71% *versus* 51%). Uma análise econômica comparativa entre os dois processos, que envolve custo de pessoal, material e operação revelou que uma unidade de atividade enzimática produzida pelo protocolo clássico tinha custo de cerca de 40 vezes superior ao de uma unidade de enzima resultante das extrações sequenciais em sistemas de duas fases aquosas.

2.12 CUSTOS

De acordo com Villen (2001), todo empreendimento comercial baseia-se na compra e na venda. A diferença entre esses dois itens é o lucro, que é o estímulo de toda iniciativa, privada ou não, para a realização de empreendimentos desse tipo. A indústria também pode ser considerada instituição comercial, já que, da mesma forma, compra e vende; porém há uma diferença fundamental: o fator transformação, isto é, os produtos são comprados, modificados ou compostos e depois são vendidos.

Na visão de Horngren (2000), os sistemas de custeio tradicionais aplicados na produção de bens devem ser mais detalhados do que quando aplicados nos setores comerciais e de serviços, devido à industrialização ser mais complexa. As empresas de comercialização de mercadorias e prestadoras de serviços atendem as necessidades dos clientes sem a utilização do processo de transformação de matérias-primas.

Para Chalos (1992), os métodos de custeio padrão são comuns na fundamentação dos sistemas de controle das empresas. Entretanto, os sistemas não são estáticos, por isso devem ser revisados e adequados de acordo com a produção e o ciclo de vida dos produtos. Além disso, há os processos de melhoria contínua, que visam reorientar as formas de trabalho, as quais reduzem assim seus custos.

Os custos são o resultado da soma de inúmeras parcelas (VILLEN, 2001):

- custo de matérias-primas e produtos auxiliares;
- custos de fabricação;
- despesas administrativas, industriais e comerciais;
- impostos, taxas;
- utilidades: água, energia elétrica;
- mão de obra, etc.

O processo de custeio é a apuração analítica e a valorização monetária do que ocorre na produção em que se utilizam informações operacionais (fábrica) e informações contábeis. Desde que seja apurado devidamente e usado corretamente, o sistema de custos é uma valiosa ferramenta de controle e de tomada de decisão.

Existem diversas terminologias contábeis aplicadas à área de custos, devido à grande quantidade de nomes para um único conceito e também conceitos diferentes para uma única palavra.

Segundo Crepaldi (1998), gasto é todo sacrifício financeiro com que a entidade arca para a obtenção de um produto ou serviço qualquer, sacrifício esse representado por entrega ou promessa de entrega de ativos (normalmente dinheiro). É um conceito amplo aplicado a todos os bens e serviços recebidos. Citam-se, como exemplos, gastos com a compra de matéria-prima, com a mão de obra tanto na produção como na distribuição, na compra de imobilizado, entre outros.

O custo também é um gasto; contudo, no momento da utilização deste nos fatores de produção (bens e serviços), para a fabricação de um produto ou a execução de um serviço, será considerado como custo. Como exemplo, pode-se citar a energia elétrica utilizada na fabricação de qualquer bem ou serviço que é um gasto e que passa imediatamente para o custo, sendo diferente da matéria-prima que, na hora da compra, é um gasto, na hora da estocagem, torna-se investimento e, finalmente, no momento de sua utilização, na fabricação de qualquer item, torna-se custo. Custo é gasto relativo a bem ou a serviço utilizado na produção de outros bens ou serviços (MARTINS, 2003).

Ainda de acordo com Martins (2003), as despesas, bens ou serviços, consumidos direta ou indiretamente para obtenção da receita, representam sacrifícios na obtenção de receitas, pois reduzem o patrimônio líquido.

Cada componente que foi usado no processo de produção, no momento da saída, torna-se despesa, chamado de custo do produto vendido. Todas as despesas são ou foram gastos. Todos os custos que são ou foram gastos, que se transformaram em investimento ou não, acabam transformados em despesas. Por outro lado, as receitas são entradas de valores no ativo, de forma imediata, ingresso em caixa ou de direitos a receber; sempre aumenta a situação líquida da empresa (FREITAS & VEY, 2005).

O custo de produção de um determinado período é a totalidade de custos incorridos na produção durante determinado período de tempo. De maneira geral, tais custos também podem ser classificados da seguinte forma (MARTINS, 2003):

- Custos Diretos e Indiretos - dizem respeito ao relacionamento entre o custo e o produto feito: os primeiros são fáceis, objetivos e diretamente apropriáveis ao produto feito. Os Indiretos precisam de esquemas especiais para a alocação, tais como bases de rateio, estimativas, etc;

- Custos Fixos e Variáveis são uma classificação que não leva em consideração o produto e, sim, o relacionamento entre o valor total do custo num período e o volume de produção. Fixos são os que num período têm seu montante fixado não em função de oscilações na atividade e Variáveis, os que têm seu valor determinado em função dessa oscilação.

2.12.1 Classificações dos Custos

As informações sobre os custos devem atender aos mais variados propósitos. Uma adequada classificação dos custos proporciona uma utilização eficiente dessas informações. De acordo com Leone (1981), os custos podem ser assim classificados:

2.12.1.1 Custos Definidos em Relação ao Objeto de Estudo

Ao fazer-se uma análise do objeto de estudo, é possível verificar que alguns custos podem ser diretamente apropriados aos produtos, desde que haja uma medida de consumo. Outros, não oferecem realmente condição de uma medida objetiva, e qualquer tentativa de alocação deve ser feita de maneira estimada e, muitas vezes, arbitrária. Assim, podem ser classificados os custos definidos em relação ao objeto de estudo da seguinte maneira:

- a) Custos Diretos: são aqueles que podem ser diretamente apropriados a um só produto ou a um só serviço (FLORENTINO, 1972). Como exemplo, citam-se material direto e mão de obra;

- b) Custos Indiretos: são aqueles que não podem ser identificados com o produto que está sendo fabricado ou serviço prestado (LEONE, 1981);

Começa a existir custo indireto quando a empresa executa mais de um serviço, e, assim mesmo, quando esse custo é atribuível a mais de um produto ou a mais de um serviço (FLORENTINO, 1972). Tais custos precisam da utilização de algum critério de rateio para serem incorporados aos produtos. Esse critério varia de caso para caso, quando se utilizam índices ou outra mecânica de forma direta. Um exemplo de custo indireto de fabricação é o aluguel do prédio onde se situa a fábrica.

c) Custos Imputados: são valores apropriados para efeitos internos ao produto, mas não contabilizáveis como tais;

d) Custo por Natureza: são valores gastos com materiais, mão de obra, custos gerais, de seguro, de depreciação, de manutenção, etc.;

e) Custos Totais: são todos os custos (diretos e indiretos) de determinado objeto ou atividade.

2.12.1.2 Custos Definidos em Relação a Custo - Volume – Lucro

Diz-se que uma empresa tem controle dos seus custos quando conhece os que estão sendo incorridos, verifica se estão dentro do esperado, analisa as divergências e toma medidas para a correção de tais desvios. Nessa perspectiva, podem-se classificar os custos em Fixos (Não Controláveis) e Variáveis (Controláveis):

a) Custos Fixos: são aqueles que a empresa deve realizar em qualquer hipótese, independente do volume físico de produção dentro de uma capacidade instalada. Existe variação no custo fixo unitário com a mudança de volume. Como exemplos, citam-se: aluguel de um prédio, depreciação e honorários profissionais do contador de custos;

b) Custos Variáveis: são os que variam proporcionalmente ao volume produzido e proporcionais ao nível da atividade (o custo total aumenta à medida que a atividade aumenta) que aparece quando a mesma é realizada ou a produção também é;

De acordo com Santos (1995), as principais características dos custos variáveis são: quanto maior o volume de produção, maior será o custo variável total, e os custos variáveis permanecem constantes, quando unitários.

c) Custos Semivariáveis: são aqueles que não têm um comportamento certo em relação ao nível de atividade, que dispõem de uma parcela fixa e de uma parcela variável;

d) Custos Controláveis: quando os itens de custo podem ser controlados por alguém dentro de uma escala hierárquica. Podem ser previstos, realizados e organizados pelo responsável daquela unidade, o qual poderá ser cobrado por desvios apurados;

e) Custos Não Controláveis: quando fogem ao controle do chefe do departamento;

f) Custos por Degraus: são aqueles que permanecem constantes até certo ponto do volume de atividade e sobem, nesse determinado momento, para uma plataforma onde permanecem constantes até outro ponto crítico do volume de atividade.

2.12.1.3 Custos Definidos em Relação ao Momento do Cálculo

Alguns custos podem ser definidos antes de ter início o processo produtivo, entretanto, outros só poderão ser conhecidos após esse processo. Assim, é possível classificar tais custos, como apresentados a seguir:

a) Custos Pré-Calculados: são os Custos Estimados ou Predeterminados alocados ao produto através de taxas predeterminadas de Custos Indiretos de Fabricação (CIF). São baseados numa média dos CIFs passados, em possíveis mudanças futuras e no volume previsto de produção;

b) Custos Pós-Calculados: são os Custos Incorridos ou Efetivos. Esses somente serão apurados após a conclusão do processo produtivo. São os custos reais apurados no final do período;

c) Custo Padrão: é cientificamente predeterminado e constitui-se numa base para avaliação do desempenho efetivo. Significa, na verdade, quanto o produto deve custar.

2.12.1.4 Custos Definidos em Relação ao Período de Aplicação

São os custos considerados em relação ao período em que estão sendo aplicados. Classificam-se em:

a) Custos Inventariáveis (sinônimos: aplicados, capitalizáveis e ativados): são os debitados aos produtos que estão sendo fabricados;

b) Custos Periódicos: são relacionados ao período de tempo. Ao mesmo tempo são custos repetitivos;

c) Custos Históricos (sinônimos: reais, registrados, contabilizados): são os realmente incorridos.

2.12.1.5 Custos Definidos em Relação à Determinação da Rentabilidade e Avaliação do Patrimonial

a) Custo Primário: é a soma do material direto e da mão de obra direta;

b) Custo Fabril ou de Fabricação: é a soma dos custos de material direto, de mão de obra direta e das despesas indiretas de fabricação debitadas à produção durante determinado período;

c) Custo das Mercadorias Vendidas: é a soma dos itens vendidos pela entidade em determinado período, extraídos da conta de Estoque de Mercadorias (ou Produtos Acabados);

d) Custo Unitário: é um indicador representado por uma fração, em que o denominador será a quantidade de produtos fabricados em determinado período ou num processo produtivo. O numerador será o custo.

2.12.1.6 Custos Definidos em Relação à Tomada de Decisões

A cada processo decisório, devem-se considerar os custos envolvidos, pois no momento em que se define qual o caminho a seguir, eles devem ser avaliados. Destacam-se:

a) Custos Incrementais: representam a diferença entre os custos totais de duas alternativas que estão sendo consideradas;

b) Custos de Oportunidade: correspondem ao valor do benefício que se deixa de ganhar quando, no processo decisório, toma-se um caminho em detrimento de outro;

c) Custos Evitáveis e Não Evitáveis: são os que serão ou não eliminados ao se deixar de realizar uma determinada atividade;

d) Custos Relevantes: são analisados num processo decisório, nos problemas de adicionar ou eliminar uma linha de produção, nas decisões de fazer ou comprar e na escolha de recursos escassos;

e) Custos Empatados: são os de recursos já adquiridos.

2.12.2 Mão de Obra

O custo da mão de obra direta é o custo de todas as atividades relacionadas à contratação, ao treinamento e ao apoio de pessoal. Assim como os materiais, a utilização de mão de obra também poderá ser considerada tanto como custo Direto ou Indireto, isso vai depender da situação. Será considerado custo Direto, se for definido em que (produto ou serviço) será utilizado e, Indireto quando não houver indicação do consumidor desse recurso.

Denomina-se o custo da mão de obra com base na remuneração do pessoal e nos encargos dela decorrentes, mediante a efetiva aplicação da força de trabalho em cada produto (mão de obra direta) e em cada Centro de Custo (mão de obra indireta), a partir das informações fornecidas pelo Sistema de Pessoal e pelos controles de produção. O custo da mão de obra é composto por remunerações, encargos e outros benefícios.

O cálculo do custo da mão de obra, para o pessoal mensalista, segue metodologia própria e é aplicada, segundo as necessidades de alocação de custo de cada empresa ou de cada atividade em uma mesma empresa (FREITAS & VEY, 2005).

2.12.3 Custos Indiretos de Fabricação

Custos indiretos de fabricação são caracterizados pelo consumo dos recursos produtivos não classificados como Material Direto nem como Mão de Obra Direta. Pode-se dizer que esses custos englobam todos os recursos concorrentes para a produção, sem que haja identificação direta com um consumidor. De acordo com Mandarino (2000), é o consumo de valores, representado por materiais, mão de obra e serviços, que não se constituem no essencial, mas são necessários ao processo produtivo. No processo de produção, não basta mão de obra direta que

transforma material direto em produto. Outros materiais de consumo, remuneração de pessoal administrativo, máquinas e energia são consumidos no processo de produção.

2.12.4 Estabelecimento do Preço de Venda

Segundo Padoveze (1996), o preço final é resultante da intensa negociação com os mercados secundários e do jogo das forças de oferta e demanda dos diversos agentes com percepções distintas.

De acordo com Martins (2003), para administrar preços de venda, sem dúvida, é necessário conhecer o custo do produto; porém essa informação, por si só, embora seja necessária, não é suficiente. Além do custo, é preciso saber o grau de elasticidade da demanda, os preços de produtos dos concorrentes, os preços de produtos substitutos, a estratégia de marketing da empresa, etc. E tudo isso depende também do tipo de mercado em que a empresa atua, que vai desde o monopólio até a concorrência perfeita, mercado de *commodities*, entre outros.

O importante é que os sistemas de custos produzam informações úteis e consistentes com a filosofia da empresa, particularmente com a sua política de preços. Desse modo, os preços podem ser fixados com base nos custos, com base no mercado ou numa combinação de ambos.

Na formação de preços com base em custos – de dentro para fora -, o ponto de partida é o custo do bem ou serviço apurado, segundo os critérios de custos de fabricação. Sobre esse custo, agrega-se uma margem, denominada *markup*³, que deve ser estimada para cobrir os gastos não incluídos no custo, os tributos e comissões incidentes sobre o preço e o lucro desejado pelos investidores. Esse preço é uma referência, sujeita a ajustes - para mais ou para menos - de acordo com as condições de mercado e com negociações específicas com cada cliente, talvez transação a transação (MARTINS, 2003).

O preço, componente do composto mercadológico, é fundamental para a estratégia de vendas da empresa. Assim, é muito importante que a empresa, uma vez definida sua política de vendas, considere o preço como fator competitivo em suas políticas, de modo a atingir seus

³ *Markup* ou multiplicador sobre os custos é uma metodologia para calcular-se o preço de venda de forma rápida a partir do custo por absorção de cada produto, de tal forma que os demais elementos formadores do preço de venda sejam adicionados ao custo, a partir desse multiplicador. Aplicável para empresas de todos os portes o markup, apesar de ser um multiplicador aplicado sobre o custo dos produtos, sua construção está ligada a determinados percentuais sobre o preço de venda.

objetivos, e isso está intimamente relacionado aos custos e à estruturação do *markup* (BERNARDI, 2008).

2.12.5 Ponto de Equilíbrio

O Ponto de Equilíbrio é uma informação importante para a administração de uma empresa. De acordo com Florentino (1972), os custos fixos somente se diluem depois de produzida uma quantidade y de unidades. Alcançada essa quantidade, os custos fixos (acrescidos aos variáveis) proporcionarão um custo unitário total passível de igualar-se ao preço de venda corrente.

Quando se dá esse fato, isto é, quando se alcança esse ponto, diz-se que a empresa conseguiu obter o ponto de equilíbrio dos custos. Daí por diante, a cada nova unidade produzida, a empresa conseguirá, paulatinamente, aumentar a sua margem de lucro unitária.

Conforme Bornia (2002), no ponto de equilíbrio contábil, são levados em conta todos os custos e as despesas contábeis relacionados com o funcionamento da empresa. No ponto de equilíbrio econômico, são também incluídos os custos e as despesas fixas, considerados todos os custos de oportunidades referentes ao capital próprio, ao possível aluguel das edificações e a outros itens do gênero. Com relação ao ponto de equilíbrio financeiro, os custos considerados são apenas os custos desembolsados que realmente oneram financeiramente a empresa.

O termo “equilíbrio” indica o nível de produção em que a empresa não realiza lucro nem sofre prejuízo. Para Padoveze (1996), os pontos de equilíbrio fornecem importantes subsídios para um bom gerenciamento da empresa. O ponto de equilíbrio financeiro informa o quanto a empresa terá que vender para não ficar sem dinheiro. O econômico mostra a rentabilidade real que a atividade escolhida traz, confrontando-a com outras opções de investimento.

2.13 AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Quando se deseja viabilizar a fabricação de produtos de interesse comercial a preços competitivos, vários aspectos básicos devem ser levados em conta (VILLEN, 2001):

- O capital investido nos equipamentos deve ser o mínimo permissível, com atenção para que esses estejam dimensionados à produção especificada;
- Matérias-primas necessárias devem ser as mais baratas possíveis, como também, utilizadas eficientemente. A busca de novas alternativas propõe uma preocupação constante, mesmo com o processo já em operação;
- Buscar a automação que vise substituir mão de obra;
- Quando se trabalha com um processo descontínuo, o cronograma de operação deve ter por objetivo a minimização dos “tempos mortos”;
- Novos processos, que apresentem maior produtividade, têm de ser pesquisados;
- Os procedimentos que visam à recuperação e purificação de produtos devem ser os mais simples e rápidos possíveis;
- Minimizar a carga de efluentes;
- Usar eficientemente o calor e a energia;
- O *lay-out* deve ser otimizado com vista ao melhor aproveitamento do espaço, porém sem esquecer a possibilidade de virem a ocorrer futuras expansões.

Tais critérios são de caráter geral, que depende da maior ou menor ênfase dada a cada um dos itens do processo em particular.

2.13.1 Métodos de Avaliação de Investimento

Quando se considera que todo empreendimento fabril visa ao maior lucro possível dentro do menor tempo e com o menor risco envolvido, há necessidade que se conheça, com a maior certeza possível, as perspectivas de um investimento, ou seja, o seu custo e a rentabilidade a curto e longo prazo, a fim de ser possível a comparação com outros investimentos ou outras formas de aplicação dos recursos disponíveis.

Devido a um grande número de fatores que interferem no processo de decisão de investimento e de um longo período entre o momento de aprovação do empreendimento e a sua conclusão, é necessária uma análise minuciosa da viabilidade econômica e financeira do projeto, através de técnicas gerais de engenharia econômica, subsidiadas pelas informações que o mercado pode fornecer. No momento da decisão, é fundamental que seja considerada a diferença

entre a disponibilidade de capital no presente e no futuro, decorrente da existência de incertezas e da necessidade de remunerar o capital, através de uma taxa de juros.

Várias são as técnicas para análise econômica e financeira, comumente utilizadas, aquelas baseadas em fluxos de caixa descontados, como o *Payback* (Pb, prazo de retorno do investimento inicial), da taxa interna de retorno (TIR) ou do Valor Presente Líquido (VPL, resultado dos fluxos de caixas). De acordo com Bruni et al. (2009), essas técnicas podem ser assim definidas:

2.13.1.1 *Payback*

Payback representa o prazo necessário para a recuperação do capital investido, que pode ser simples (sem considerar o custo de capital, valor do dinheiro no tempo) ou descontado (aqui se considera o valor do dinheiro no tempo). O *payback* comumente é usado de forma preliminar a outros métodos, como uma peneira “passa- não- passa” inicial. Se, por exemplo, o *payback* descontado de um projeto for superior ao período máximo estabelecido pela empresa para recuperar o investimento inicial, esse não deve ser aceito pela empresa, mesmo que apresente TIR superior ao custo de capital ou VPL positivo. Assim, suas principais vantagens e desvantagens podem ser resumidas como:

- Vantagens: Simplicidade: já que não exige nenhuma sofisticação de cálculos, apenas sucessivas subtrações; serve como parâmetro de liquidez (quanto menor, maior a liquidez do projeto) e de risco (quanto menor, menor o risco do projeto);
- Desvantagens: Não considera o custo de capital, o valor do dinheiro no tempo; não considera todos os fluxos de caixa.

2.13.1.2 Valor Presente Líquido

O Valor Presente Líquido (simplesmente VPL ou NPV, do inglês *Net Present Value*) representa a diferença entre os Fluxos de Caixa futuros trazidos a valor presente pelo custo de oportunidade do capital e o investimento inicial. Se positivo, deve ser aceito. Lapponi (1996) ressalta que VPL positivo indica que o capital investido será recuperado, remunerado na taxa de

juros a qual mede o custo de capital do projeto k e gerará um ganho extra, na data zero, igual ao VPL. As principais vantagens e desvantagens do uso do VPL podem ser expressas por:

- Vantagens: Informa se o projeto de investimento aumentará o valor da empresa; considera o valor do dinheiro no tempo; incluiu todos os capitais na avaliação; considera também o risco já embutido no k ;
- Desvantagens: É preciso conhecer k ; resposta em valor monetário (é difícil, por exemplo, responder se é melhor investir \$100 para um VPL de \$5 ou se é investir \$10 para um VPL de \$3).

De acordo com a maioria dos autores clássicos de finanças, o VPL é o principal método de avaliação de projetos. Assim, em caso de seleção de projetos, pode-se sempre escolher aquele que apresentar o maior VPL.

2.13.1.3 Taxa Interna de Retorno

A taxa interna de retorno representa o valor do custo de capital que torna o VPL nulo, ou seja, é então uma taxa que remunera o valor investido no projeto. Quando superior ao custo de capital do projeto (k), deve ser aceito.

O maior problema de uso da TIR consiste ao ocorrer a inversão de sinais do Fluxo de Caixa em mais de uma vez. Segundo Lapponi (1996), dependendo da estrutura dos fluxos de caixa do projeto, esse pode ser classificado de diferentes formas:

- Projeto Simples: quando os capitais do fluxo de caixa apresentam apenas uma mudança de sinal;
- Projeto Não – Simples: quando os capitais do fluxo de caixa apresentam mais de uma mudança de sinal;
- Projeto Puro: é o projeto de investimento com data terminal igual a n , que apresenta uma única taxa interna de juros (TIJ), e os valores do saldo em qualquer data quando calculados com a TIJ são negativos até a data n e, iguais a zero em n ;
- Projeto Misto: é o projeto de investimento não simples que não atende as regras do projeto puro.

As vantagens e desvantagens da TIR podem ser representadas por:

- Vantagens: O resultado é uma taxa de juros (valor relativo), fácil de ser comunicado;
- Desvantagens: Não pode ser usado quando o fluxo de caixa não é do tipo simples (e apresentar mais de uma TIR); requer a análise dos fluxos de caixa incrementais na seleção de projetos mutuamente exclusivos.

Ao basear a escolha na TIR, devem-se ter cuidados, já que o projeto de maior TIR não representa necessariamente o melhor projeto. Nesse caso, seria interessante montar os fluxos de caixas incrementais, comparando-se a TIR desses incrementos com o custo de capital do projeto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram feitos no Laboratório de Processos de Separação II, do Departamento de Processos Químicos e Informática, da Faculdade de Engenharia Química, da UNICAMP.

As folhas de curauá foram coletadas no campo, na fazenda experimental São Manoel, Botucatu – SP (fornecidas pelo Prof. Dr. Isaac Stringheta Machado, da UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Departamento de Ciências Ambientais). No laboratório, foram armazenadas em sacos plásticos e conservadas sob refrigeração, até sua utilização.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

1) Sistema de duas fases aquosas: Todos os reagentes foram adquiridos na Merse Artigos para Laboratório Ltda e fornecidos pela Synth (São Paulo).

- Polietilenoglicol (PEG) com duas massas molares, PEG 4000 e PEG 6000;
- Fosfato de Potássio monobásico anidro P.A, de fórmula molecular KH_2PO_4 e massa molar de 136,09 g/mol;
- Fosfato de Potássio bibásico anidro P.A, de fórmula molecular K_2HPO_4 e massa molar de 174,18 g/mol.

2) Soluções utilizadas para a determinação da atividade enzimática e quantidade total de proteínas:

➤ Reagente do biureto: Todos os reagentes foram adquiridos na Merse Artigos para Laboratório Ltda e fornecidos pela Synth (São Paulo).

- Sulfato de cobre pentahidratado, de fórmula molecular $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e massa molar de 249,68 g/mol;
- Tartarato duplo de sódio e potássio, de fórmula molecular $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e massa molar de 282,22 g/mol;
- Hidróxido de sódio, de fórmula molecular NaOH e massa molar de 40 g/mol.

➤ Solução padrão de proteína: adquirida na Merse Artigos para Laboratório Ltda e fornecida pela Sigma Chemical.

- Proteína padrão albumina de soro bovino (BSA) de massa molar 66.500-67.500 Da (ponto isoelétrico 5,1).

➤ Reagente de Bradford: para o preparo do Reagente de Bradford foram utilizados reagentes adquiridos na Merse Artigos para Laboratório Ltda e fornecidos pela Synth (São Paulo), com exceção do *Coomassie Brilliant Blue G-250*, que foi fornecido pela Vetec (Rio de Janeiro).

- *Coomassie Brilliant Blue G-250*, de fórmula molecular $C_{47}H_{50}N_3O_7S_2^+$ e massa molar 833,048 g/mol;

- Álcool Etílico 99,5% de pureza, de massa molar 46,07 g/mol;

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

3.1.2 Equipamentos

- Centrífuga de Alimentos VitaPro, Arno;
- Balança Eletrônica Marte, modelo AL 200;
- Agitador Biomatic, modelo 1005;
- pHmetro Adamo, modelo MPA – 210;
- Agitador magnético, com aquecimento Nova Ética, modelo 119;
- Banho termostatizado Fanem, modelo 100;
- Micropipetas automáticas;
- Espectrofotômetro UV/VIS Spectronic 21D;
- Sistema vertical de eletroforese Mini Protean III (BioRad, EUA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo das Amostras

3.2.1.1 Preparação da amostra a partir da folha de curauá

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

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

3.2.1.2 Preparo do reativo de biureto

- Dissolução em 500 mL de água destilada de 1,5 g de sulfato de cobre pentahidratado e 6,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio;
- Adição de 300 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% com constante agitação;
- Adição de água destilada suficiente para um litro de solução (ZANCAN, 2005).

3.2.1.3 Preparo da solução padrão de proteína

- Dissolução de 0,5 g de BSA (Soro Albumina Bovina) em água deionizada suficiente para completar 100 g de solução.

3.2.1.4 Preparo do reagente de Bradford

- Dissolução de 0,1 g de *Coomassie Brilliant Blue G-250* em 50 mL de etanol 95% (47,73 mL de etanol 99,5% + 2,26 mL de água);
- Adição, em agitação, nessa solução, de 100 mL de ácido fosfórico 85%;
- Agitação da solução por mais 2 horas;
- Adição de água deionizada suficiente para completar 1 Litro de solução;

- Agitação por 12 horas;
- Filtração do reagente (papel de filtro para filtração rápida – qualitativo 80g) em frasco coberto com papel alumínio;

- Repouso na geladeira por 24 horas antes do uso (BRADFORD, 1976).

Em todas as etapas, manteve-se o reagente coberto com papel alumínio para evitar que o Coomassie Blue reagisse com a luz.

3.2.1.5 Preparo das soluções de PEG

- Dissolução em água deionizada das duas massas molares de PEG usadas (4000 e 6000 Da) até se obterem concentrações a 50% (p/p).

3.2.1.6 Preparo das soluções de fosfato de potássio mono e dibásico

- Dissolução do fosfato de potássio monobásico sólido (seco previamente em estufa para retirada da umidade) em água deionizada, até atingir as concentrações de 15 % e 22 % (p/p);
- Agitação no agitador magnético com aquecimento até a dissolução total do sal;
- Dissolução do fosfato de potássio dibásico sólido (seco previamente em estufa para retirada da umidade) em água deionizada, até atingir as concentrações de 15 % e 22 % (p/p);
- Agitação no agitador magnético com aquecimento até a dissolução total do sal.

3.2.1.7 Preparo dos tampões

Para determinação de temperatura e pH ótimos, as soluções tampão foram preparadas nos pHs 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5 a partir de soluções de fosfato de potássio mono e dibásico a 15% (p/p), e para partição da bromelina em sistema bifásico aquoso, nos pHs 7,0; 8,0 e 9,0 a 22% (p/p), todos seguiram a metodologia descrita por Morita e Assumpção (1986).

- Preparação das soluções padrão de fosfato de potássio monobásico (solução A) e fosfato de potássio bibásico (solução B);

- Mistura em constante agitação, das soluções A e B, em béquer que contém um eletrodo de cloreto de prata, para medir o pH do meio, até atingir os pHs desejados.

3.2.2 Determinação do pH Ótimo

Com a temperatura fixada em 37° C, foram feitos ensaios em batelada para medir-se a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais de amostras em diversos pHs, quais sejam: 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5, do seguinte modo:

Em tubos numerados, foram colocados 5 mL de solução de BSA 5 g/L e mantidos sob aquecimento (banho) por 15 minutos, para estabilizar o biorreator na temperatura desejada.

As amostras de suco das folhas de curauá, nas variedades branco e roxo, também foram mantidas na temperatura acima estabelecida.

Para cada um dos pH das amostras de curauá, foi medida a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais, de acordo com o procedimento descrito a seguir:

Foram colocados 5 mL de BSA em um tubo, adicionou-se 1 mL de enzima (suco da folha de curauá) para cada pH em estudo. Em seguida, o tubo foi agitado no agitador magnético e foi retirada uma amostra que corresponde ao tempo zero (tempo inicial). Logo após, essa amostra foi colocada em outro tubo e adicionou-se, imediatamente, 5 mL de biureto.

Depois de retirada a amostra, deixou-se a amostra inicial reagir por 10 minutos e, logo após, retirou-se outra amostra, que seguiu o procedimento anterior.

As amostras foram lidas no espectrofotômetro somente depois de 10 minutos de descanso, para sua estabilização. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

3.2.3 Determinação da Temperatura Ótima

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

Em tubos numerados, foram colocados 5 mL de solução de BSA 5g/L e mantidos sob refrigeração ou aquecimento (banho) por 15 minutos, para estabilizar o biorreator na temperatura desejada.

As amostras de suco das folhas de curauá, nas variedades branco e roxo, também foram mantidas nas temperaturas acima estabelecidas.

Para cada temperatura das amostras de curauá, foi medida a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais, de acordo com o procedimento descrito a seguir:

Foram colocados 5 mL de BSA em um tubo, adicionou-se 1 mL de enzima (suco da folha de curauá) para cada temperatura em estudo. Em seguida, o tubo foi agitado no agitador magnético e foi retirada uma amostra que corresponde ao tempo zero (tempo inicial). Logo após, essa amostra foi colocada em outro tubo, e adicionou-se, imediatamente, 5 mL de biureto.

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

As amostras foram lidas no espectrofotômetro somente após 10 minutos de descanso, para sua estabilização. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

3.2.4 Determinação da Massa Molar

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

A curva de calibração da massa molar das proteínas foi feita pela plotagem dos valores de log MM *versus* a mobilidade de cada padrão. A mobilidade é tida como a distância percorrida (no gel) pelo padrão, dividida pela distância percorrida (no gel) pelo marcador. A determinação

da massa molar das proteínas do curauá foi feita ao serem usadas as mobilidades medidas no gel e inseridas nas equações das curvas de calibração.

3.2.5 Cálculo da Atividade Enzimática

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

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

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

$$AE = \frac{V_{reator} (Litros) * 10^6 (\mu mol / mL)}{MM_{BSA} * V_{enzima} (mL) * t_{reação} (min)} \quad (Eq. 3.1)$$

Em que:

V_{reator} é o volume do reator;

MM_{BSA} é a massa molar do BSA;

V_{enzima} é o volume da enzima;

$t_{reação}$ é o tempo de reação.

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

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

Em que:

V_0 é a velocidade inicial;

$V_{máx}$ é a velocidade máxima da reação;

K_m é a constante de Michaelis–Menten;

$[S]$ é a concentração do substrato.

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

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

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{máx}} + \frac{K_m}{V_{máx}} \frac{1}{[S]} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

3.2.6 Obtenção das Binodais

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

De acordo com Ferreira (2007), em tubos de ensaio, foi colocada certa quantidade de sal com posterior gotejamento da solução de PEG, utilizou-se balança analítica (10^{-3} g) e vórtex para pesagem e agitação dos tubos, respectivamente. O mesmo procedimento foi usado para obtenção dos pontos com alta concentração de PEG. A construção dos diagramas de fases foi feita a partir das diferentes composições das soluções de PEG e sal em temperatura ambiente. Concentrações de 50% (p/p) foram preparadas para PEG 4000 e 6000, respectivamente. A 22% a solução estoque do sal fosfato foi também preparada de forma a obter o pH desejado. As diferentes

composições permitiram a construção da curva binodal do sistema para cada massa molar de PEG em todos os pH. Por convenção, a concentração do sal (% sal fosfato) que se distribui preferencialmente na fase inferior foi plotada na abscissa, e a concentração do PEG (% PEG) que se distribui preferencialmente na fase superior foi plotada na ordenada.

3.2.7 Obtenção das Linhas de Amarração

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

As binodais e linhas de amarração (concentrações de equilíbrio dos sistemas bifásicos aquosos) foram estabelecidas de acordo com Ferreira (2007) e complementadas nesta pesquisa para o SBA PEG 6000 em pH 9.

3.2.8 Obtenção do Coeficiente de Partição da Bromelina do Curauá

A partição da bromelina foi feita em processo em batelada. Ao seguir o procedimento de Ferreira (2007), cada ponto das linhas de amarração foi reproduzido em tubos graduados com massa total do sistema de 8 g. A esses tubos, foi adicionado, com o auxílio de pipeta automática, o extrato bruto da folha do curauá, tamponado nos pHs de 7 a 9, na fase inferior do sistema. Assim que o sistema atingiu o equilíbrio difusivo, coletou-se 1 mL de amostra de cada fase. A determinação da concentração de proteínas totais nas fases inferior e superior foi feita através do Método de Bradford. A atividade enzimática foi determinada pelo método do Biureto. Ao dividir os valores das concentrações de proteína da fase leve (superior) pela da fase pesada (inferior), obteve-se o chamado coeficiente de partição (K) do sistema bifásico aquoso em estudo, conforme a Equação 3.4.

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

3.2.9 Calibração do Espectrofotômetro

Num tubo, foi adicionado 1 mL de água e 5 mL de biureto, estabelecido como Branco. Em seguida, essa solução foi colocada em cubeta e inserida no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. As leituras de Transmitância e Absorbância para a amostra devem ser 100 e 0, respectivamente.

A calibração do equipamento, quando da utilização do reagente de Bradford, segue o mesmo procedimento, substitui-se o biureto por 5 mL de Reagente de Bradford, e a leitura é feita no comprimento de onda de 595 nm.

3.2.10 Cálculo do Preço de Venda da Solução Enzimática

O cálculo do preço de venda da solução enzimática é feito de acordo com Martins (2003), pelo método do preço de vendas baseado em custos, que é dado pela Equação:

$$PV = C + (M * PV) \quad (3.5)$$

Em que:

C é o custo unitário do produto, que leva em consideração o custo das matérias-primas (incluem-se as utilidades) e da mão de obra;

M é o *markup*;

PV é o preço de venda do produto;

O *markup* é calculado da seguinte forma:

$$M = DGA + COM + IMP + MLD \quad (3.6)$$

Em que:

DGA são as despesas gerais e administrativas (10% da receita bruta e estima-se as despesas operacionais fixas);

COM são as comissões dos vendedores (5% do preço de venda bruto);

IMP são os tributos incidentes sobre o preço de venda (20% do bruto);

MDL é a margem de lucro desejada, que pode ser estimada em 5, 10, 20% (ou mais, se desejar) sobre a receita bruta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE DAS FOLHAS DO CURAUÁ

4.1.1 Estudo da Influência do pH sobre a Atividade da Protease

As enzimas possuem pH ótimo em que a distribuição das cargas é ideal para a catálise; acima deste pH ótimo a atividade enzimática diminui, visto que a enzima começa a perder sua função, até tornar-se inativa.

As Figuras 4.1 e 4.2 mostram o efeito do pH sobre a atividade da bromelina da folha do curauá nas variedades branco e roxo. Os resultados observados evidenciam que a atividade foi afetada na faixa de pH estudado. Foi observado que a máxima atividade foi encontrada no pH 8,5 tanto para o curauá branco como roxo; isso indica que esse é o pH ótimo para a bromelina das folhas de curauá. Entretanto, um pico de menor intensidade foi observado no pH 5,5, e sugere que pode haver mais do que uma protease nas folhas de curauá.

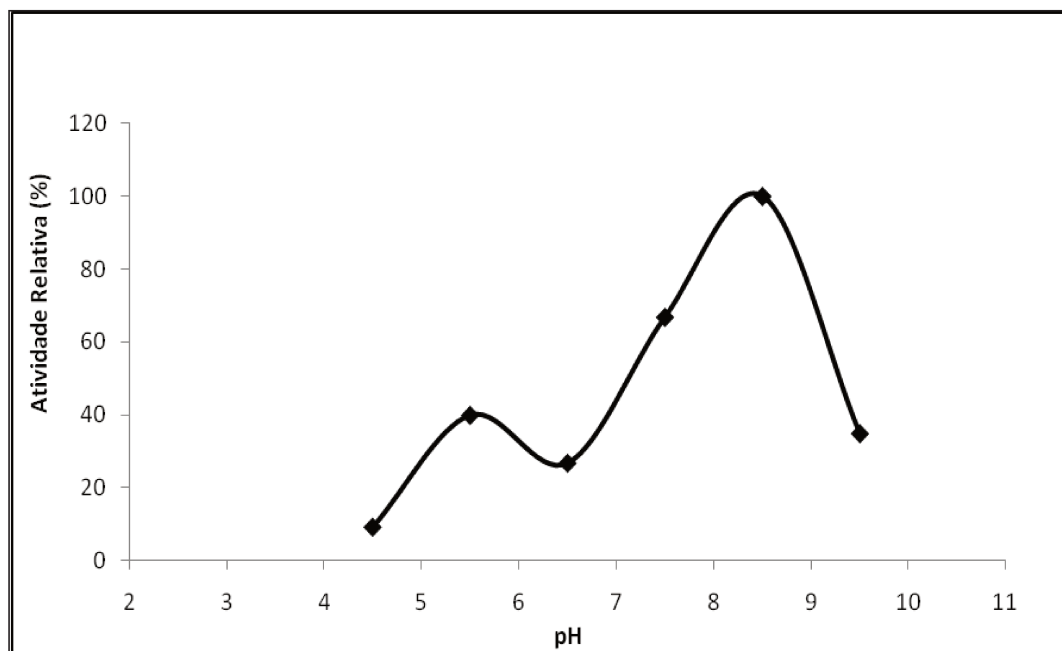


Figura 4.1 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco.

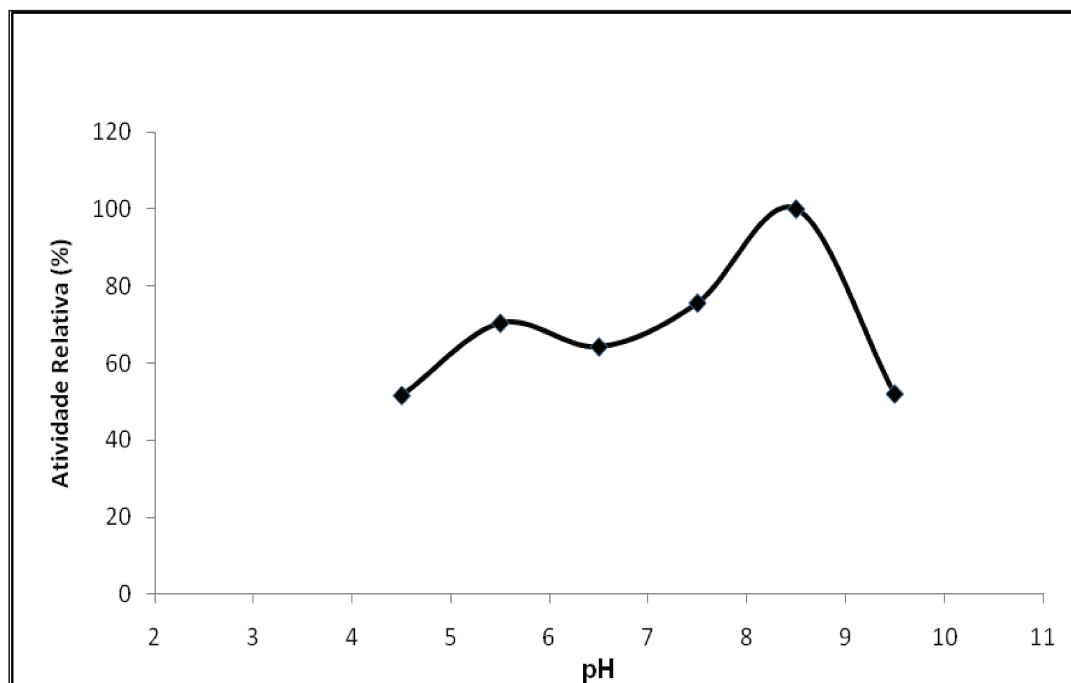


Figura 4.2 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo.

Tais dados são de extrema importância na estratégia de purificação da enzima bromelina e na sua aplicação industrial; desse modo, evita-se a perda de atividade pelo uso de faixas de pH agressivos às enzimas e a redução na eficiência do método empregado (SANTANA, 2006).

Uma vez que não foram encontrados resultados anteriores sobre a caracterização das proteases do curauá, uma comparação com a bromelina do abacaxi foi realizada. Ferreira (2007), Ko & Kang (1990), Rasheedi et al. (2003) e Rowan et al. (1990) encontraram maior atividade no pH 7,0, para a bromelina da casca e talo do abacaxi.

4.1.2 Avaliação dos Efeitos da Temperatura sobre a Atividade da Protease

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

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

A Figura 4.3 descreve o perfil da atividade da bromelina das folhas de curauá branco, em diferentes temperaturas. A atividade máxima foi observada em 30 °C. Outro pico foi observado em 10 °C.

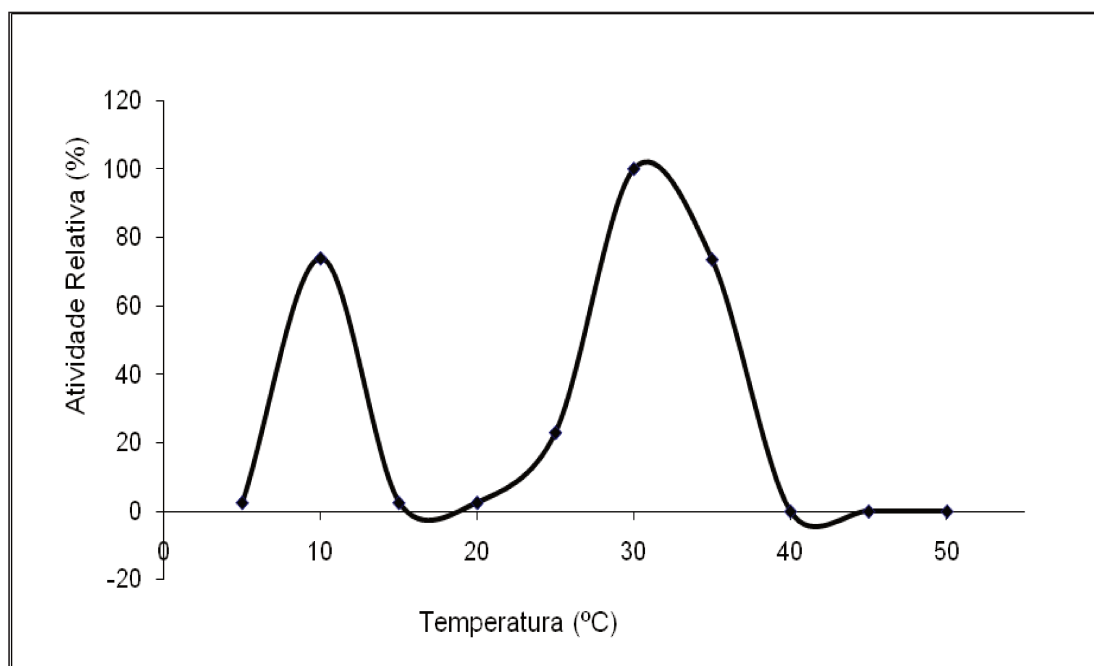


Figura 4.3 - Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco.

A Figura 4.4 descreve o perfil da atividade da bromelina das folhas de curauá roxo, em diferentes temperaturas. Para essa variedade, os resultados mostraram três picos em que a atividade foi máxima (10, 20 e 35 °C). A presença de dois ou mais picos nos quais a atividade foi elevada, indica mais uma vez a presença de outras proteases nas folhas de curauá.

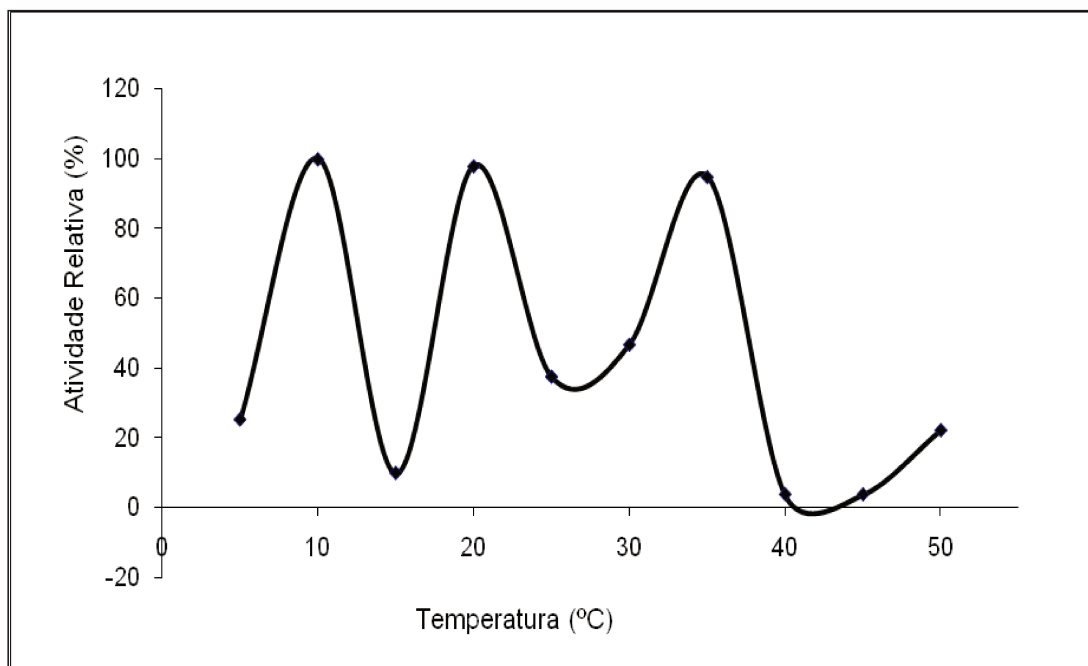


Figura 4.4 - Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo.

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

4.1.3 Estimativa da Massa Molar das Enzimas do Curauá

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

De acordo com as eletroforeses apresentadas na Figura 4.5, verifica-se que, para ambas as espécies de curauá (branco e roxo), proteínas com massa molar semelhante à bromelina comercial foram detectadas. A melhor diluição do extrato para observação dos resultados na

eletroforese é a de duas vezes (faixa 2; Figura 4.5a e 4.5b), em que se percebe claramente uma banda de massa molar de 24 kDa, assim como o marcador da bromelina comercial proveniente do abacaxi. Ainda na Figura 4.5, as faixas são: (LMW) marcador de baixa massa molar; (1) extrato bruto; (2) extrato diluído 2 vezes; (3) extrato diluído 3 vezes; (4) extrato diluído 4 vezes; (5) extrato diluído 5 vezes; (M) marcador de bromelina, feito com solução de bromelina comercial (Fluka, EUA).

Os padrões do marcador de massa molar (LMW, low molecular weight) foram: fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa).

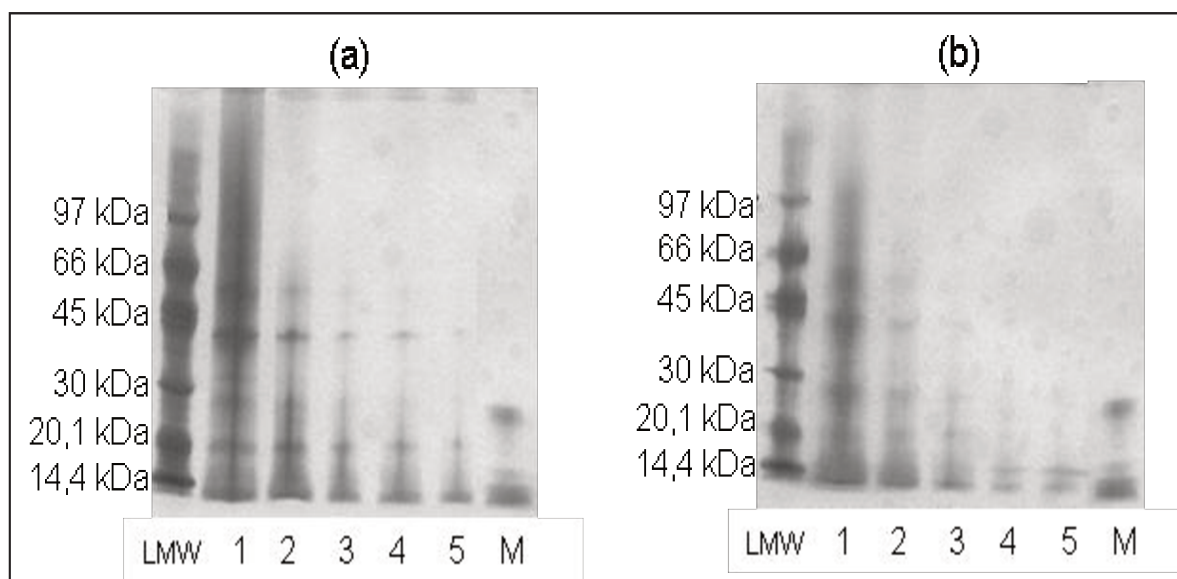


Figura 4.5 – Perfil eletroforético de proteínas de extrato de folhas de curauá. Amostras em condições desnaturantes e não-redutoras. (a) gel de poliacrilamida a 15 % com amostras de extrato de folhas de curauá branco. (b) gel de poliacrilamida a 15% com amostras de extrato de folhas de curauá roxo.

Foram observadas presença de outras bandas com massas molares de 20, 43 e 59 kDa na eletroforese do curauá branco e, 20, 40 e 49 kDa na eletroforese do curauá roxo, conforme indica a Figura 4.6. Isso evidencia que pode existir a presença de outras proteases, como citado nos estudos dos efeitos de pH e temperatura.

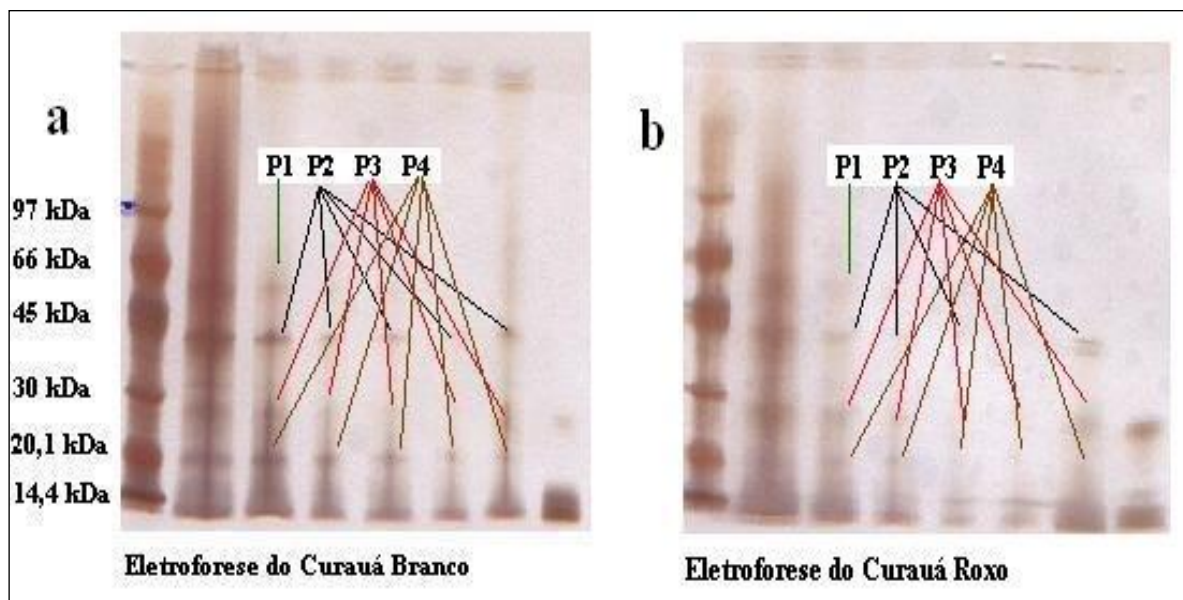


Figura 4.6 – Bandas de Massa Molar nos perfis eletroforéticos de proteínas de extrato de folhas de curatua. P1, P2, P3 e P4 indicam as bandas de diferentes massas molares em cada amostra de curatua branco (a) e roxo (b).

Lopes et al. (2009), ao utilizarem eletroforese SDS-PAGE, observaram que na purificação da bromelina da polpa do abacaxi (*Ananas comosus*) por ultrafiltração, a massa molar é de 24,5 kDa. Murachi (1976) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração e determinou a massa molar da fração pura de 28 kDa, por SDS-PAGE. Suh et al. (1992) purificaram a bromelina do fruto e do talo por cromatografia de gel-filtração e determinaram as massas molares em 32,5 e 37 kDa, respectivamente. Yamada et al. (1976) caracterizaram o abacaxi e encontraram massas molares de 31 e 28 kDa para o fruto e talo, respectivamente.

4.1.4 Cinética da Reação de Hidrólise de BSA por Bromelina

A reação catalisada por enzima utiliza a mesma quantidade de substrato e gera a mesma quantidade de produto que uma reação não catalisada. Tal como ocorre em outros tipos de catálise, as enzimas não alteram em absoluto o equilíbrio da reação entre substrato e produto. Ao contrário do que acontece em outras reações químicas, as enzimas saturam-se. Isso significa que, com maior quantidade de substrato, mais centros catalíticos estarão ocupados, o que aumentará a

eficiência da reação, até o momento em que todos os sítios possíveis estejam ocupados. Nesse momento, o ponto de saturação da enzima é alcançado e, embora se adicione mais substrato, não aumentará mais a eficiência.

A obtenção da curva cinética da reação para o curauá branco foi feita na temperatura de 30 °C e pH 8,5. A Figura 4.7 demonstra a influência da concentração do substrato, na velocidade de hidrólise de BSA, por bromelina das folhas de curauá.

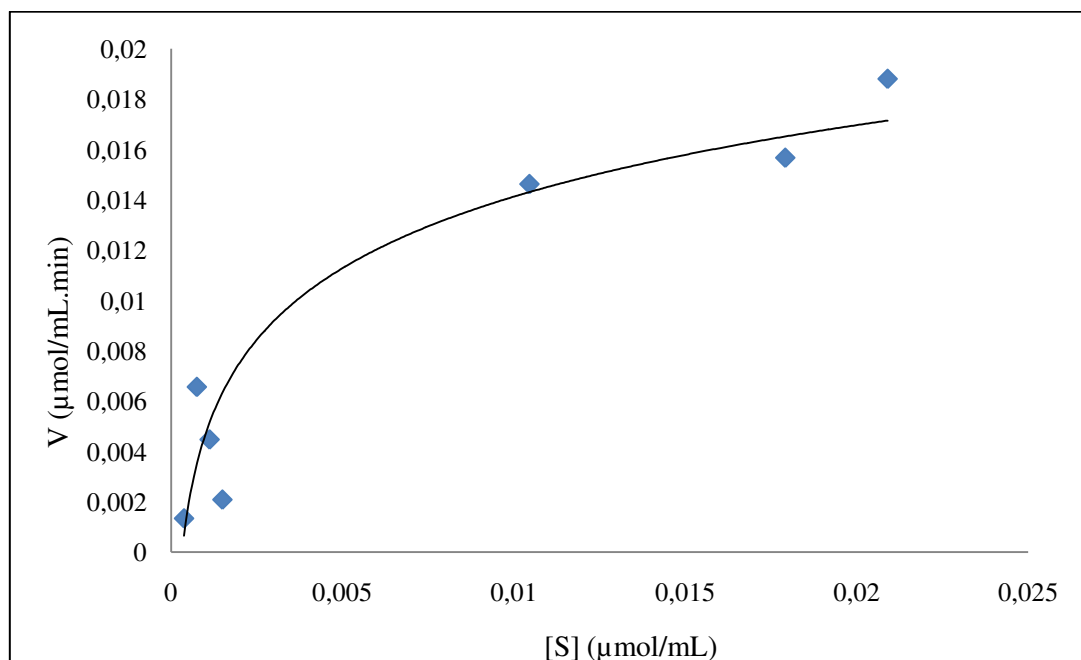


Figura 4.7 – Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas das folhas do curauá branco.

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

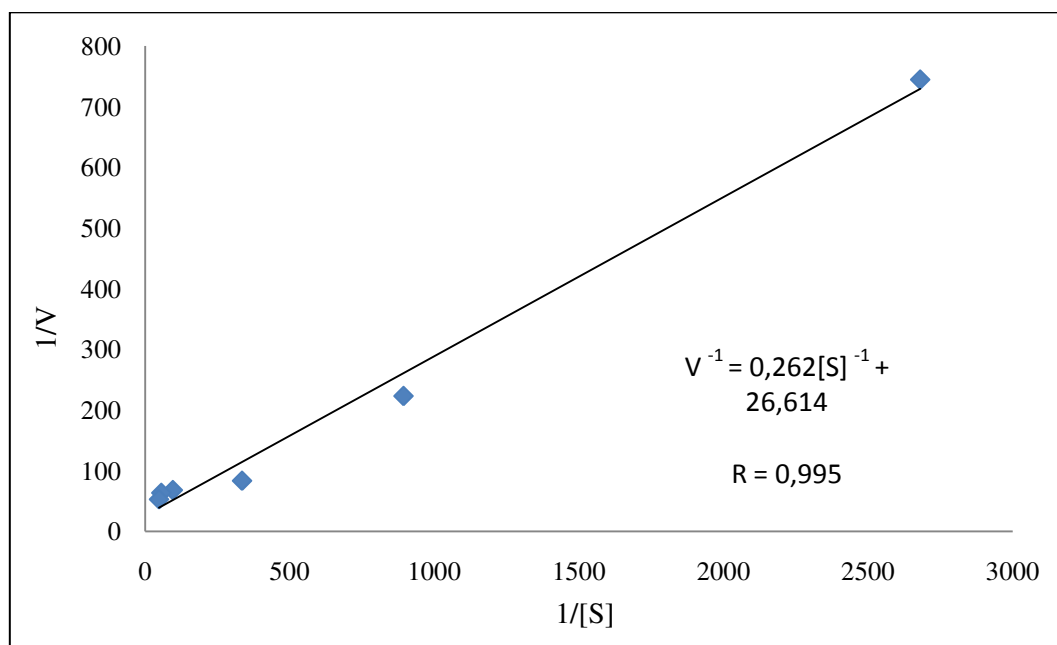


Figura 4.8 – Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk – Curauá branco.

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

A obtenção da curva cinética da reação para o curauá roxo foi realizada na temperatura de 35 °C e pH 8,5. A Figura 4.9 apresenta a influência da concentração do substrato, na velocidade de hidrólise de BSA, por bromelina das folhas de curauá.

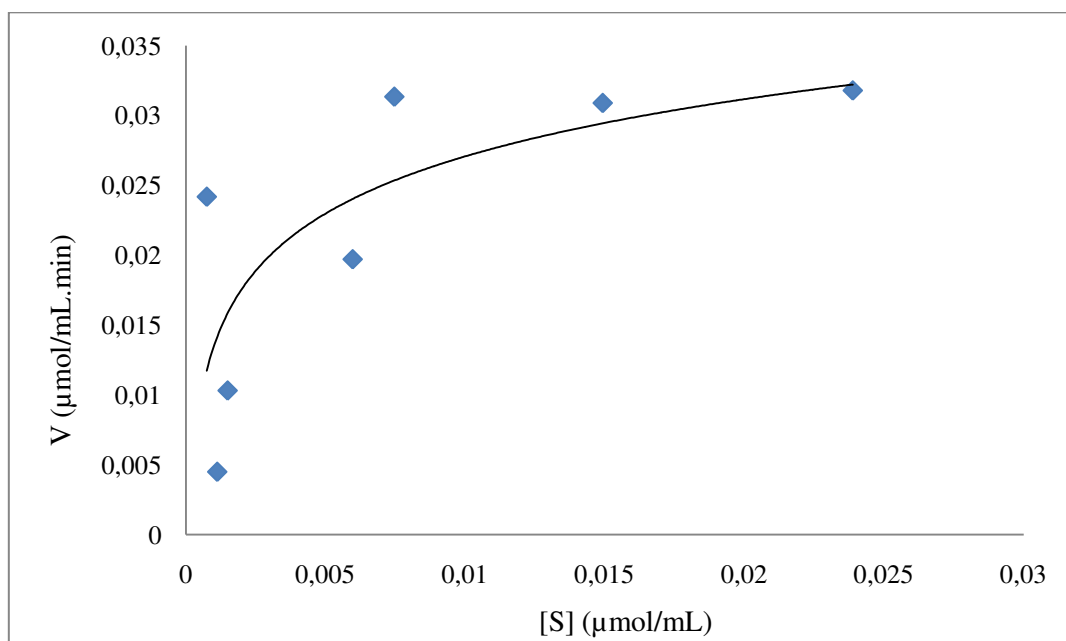


Figura 4.9 – Curva cinética de hidrólise de BSA por bromelinas das folhas do curauá roxo.

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

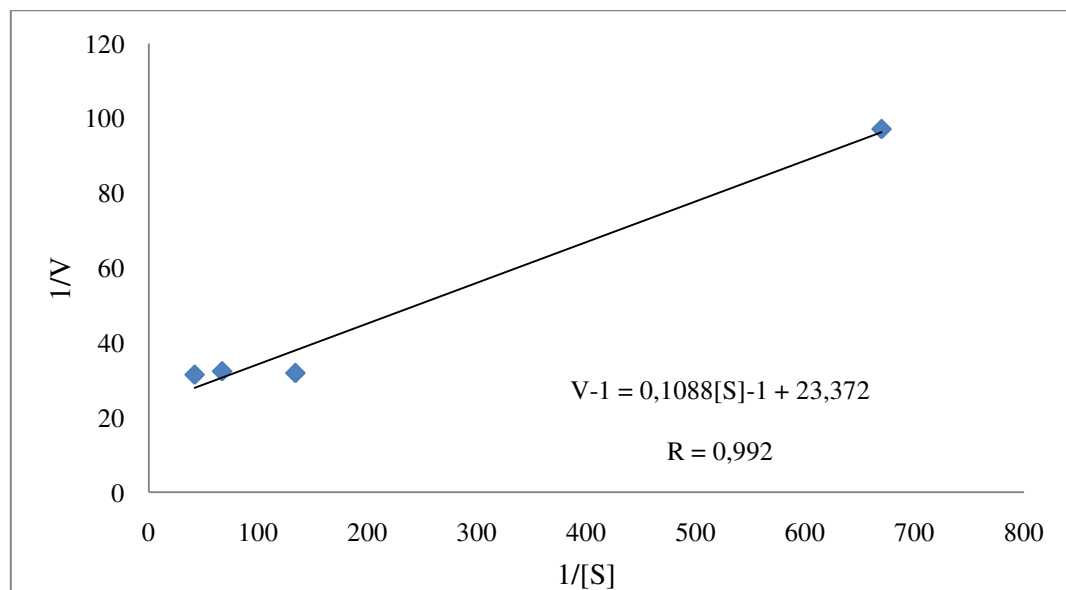


Figura 4.10 – Linearização dos dados cinéticos de hidrólise de BSA para determinação das constantes pelo método de Lineweaver-Burk – Curauá roxo.

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

4.2 DIAGRAMAS DE FASES E ESTABELECIMENTO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO

As composições dos diagramas de fases foram estabelecidas por Ferreira (2007) e complementadas na pesquisa com o sistema PEG 6000/fosfato de potássio (pH 9,0).

Na Figura 4.11 é apresentado o diagrama de fases do sistema PEG 6000/fosfato de potássio, em pH 9, em que foram estabelecidas as linhas de amarração.

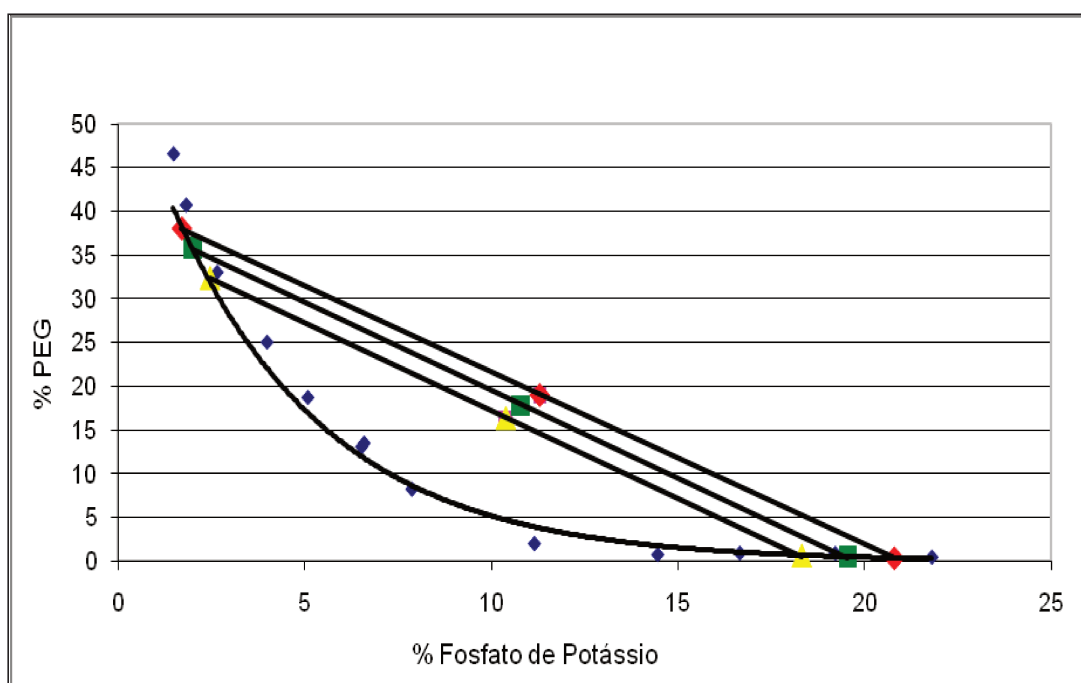


Figura 4.11 – Diagrama de fases do sistema PEG 6000/fosfato de potássio, em pH 9,0 e linhas de amarração.

As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam as composições dos sistemas de duas fases aquosas, PEG/Sal para diferentes pHs, utilizados nesta pesquisa.

Tabela 4.1 - Composição dos sistemas PEG 4000/Sal a $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ nos diferentes pHs.

Linha de Amarração	Composição do Sistema para pH 7,0 (%p/p)			Composição do Sistema para pH 8,0 (%p/p)			Composição do Sistema para pH 9,0 (%p/p)		
	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
1	13,50	16,23	70,27	11,68	16,95	71,37	13,50	19,80	66,70
2	13,40	12,40	74,20	11,47	14,88	73,73	12,20	18,50	69,30
3	13,50	8,51	77,99	11,00	12,00	77,00	11,20	16,03	72,77

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

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

4.3 ESTUDO DA PARTIÇÃO DA BROMELINA DAS FOLHAS DO CURAUÁ

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

Esse estudo, o qual utiliza processo de extração em descontínuo, através da avaliação da atividade específica e do coeficiente de partição da proteína, tem a finalidade de encontrar as condições adequadas de um sistema bifásico aquoso, que permitam obter resultados viáveis de

extração da bromelina das folhas do curauá, ao variarem-se pH do sistema, comprimento da linha de amarração (concentração de PEG e sal) e massa molar do PEG.

Como se observa nos resultados apresentados nas Figuras 4.12 e 4.13, as partições foram superiores a unidade, indicando que as proteases das folhas de curauá branco e roxo possuem afinidade com o PEG. Os sistemas bifásicos aquosos, em que se utiliza PEG 4000, apresentam melhores resultados na partição da bromelina, se comparados aos sistemas em que se utiliza PEG 6000.

Nos sistemas em que foi utilizado o PEG 4000, observou-se que a partição tende a aumentar com o aumento do pH do sistema, mas quando se utiliza o PEG 6000, essa tendência não é observada. Nesta pesquisa, tanto para o curauá branco quanto para o roxo, o melhor sistema de partição da bromelina é o SBA PEG 4000 em pH 9, linha de amarração 1, em que os coeficientes de partição são 3,42 e 5,17 para o curauá branco e roxo, respectivamente.

A solução enzimática dos melhores sistemas contém 7 U de bromelina e, aproximadamente, 17 mg/L de proteína total medida por Bradford, para o curauá branco; e 6 U de bromelina e, aproximadamente, 23 mg/L de proteína total medida por Bradford, para o curauá roxo.

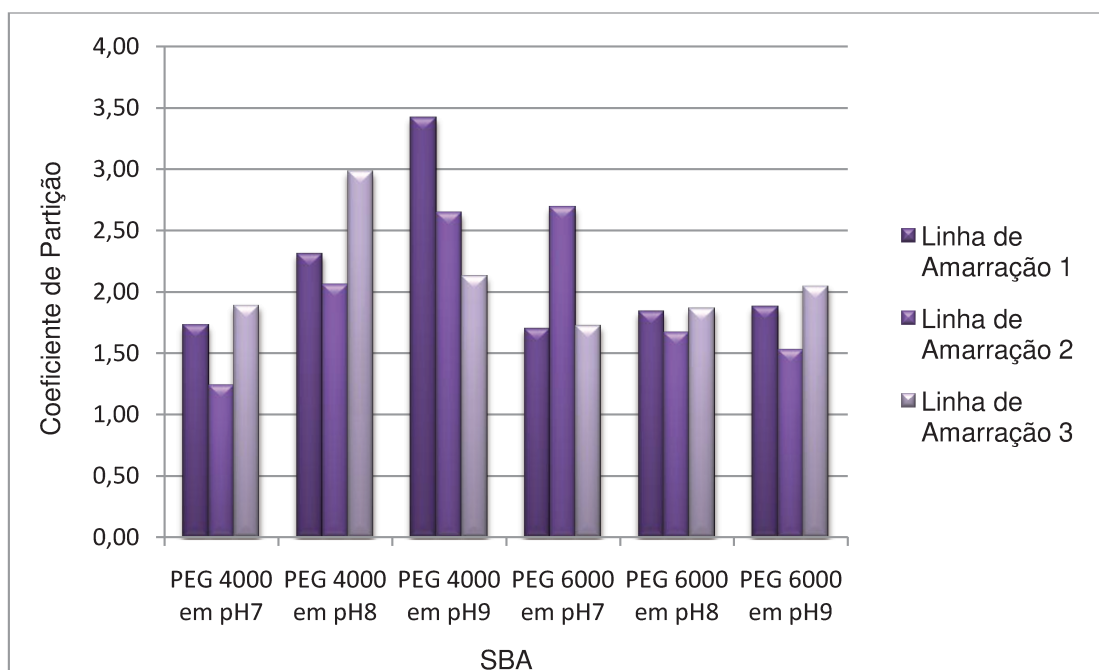


Figura 4.12 – Coeficientes de partição nos SBA da bromelina das folhas do curauá branco.

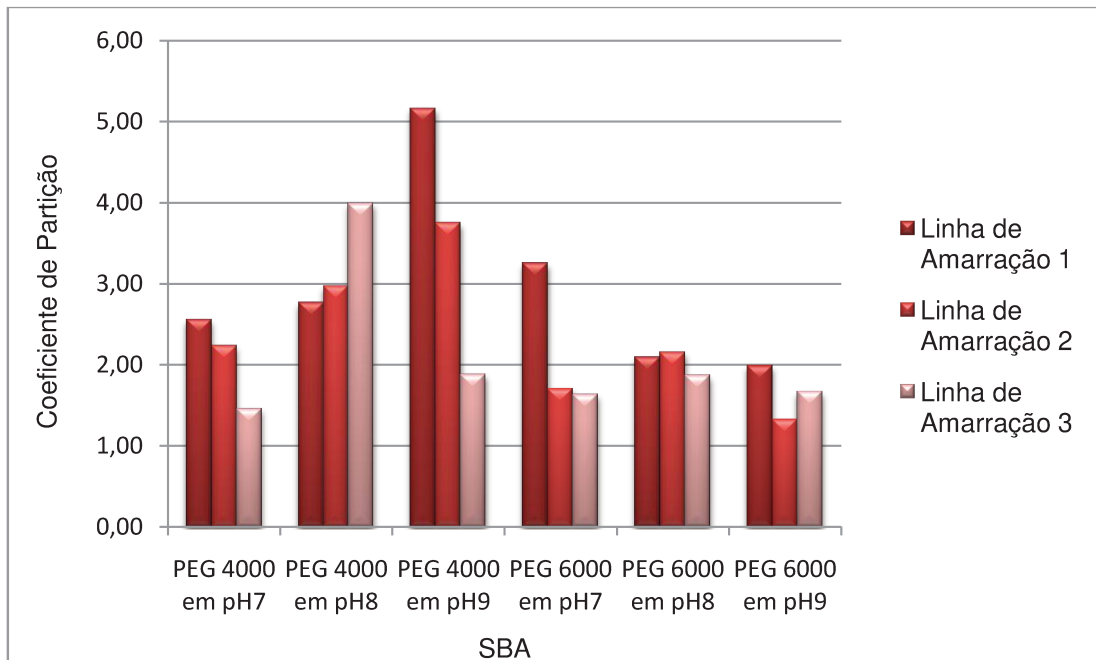


Figura 4.13 – Coeficientes de partição nos SBA da bromelina das folhas do curatá roxo.

Através da Figura 4.14, nota-se que os comportamentos do curatá branco e roxo são semelhantes, nos SBA com PEG 4000. Nas linhas de amarração 1 e 2, tende a aumentar o K com o aumento do pH, enquanto que na linha de amarração 3, o K apresenta comportamento parabólico com o aumento do pH.

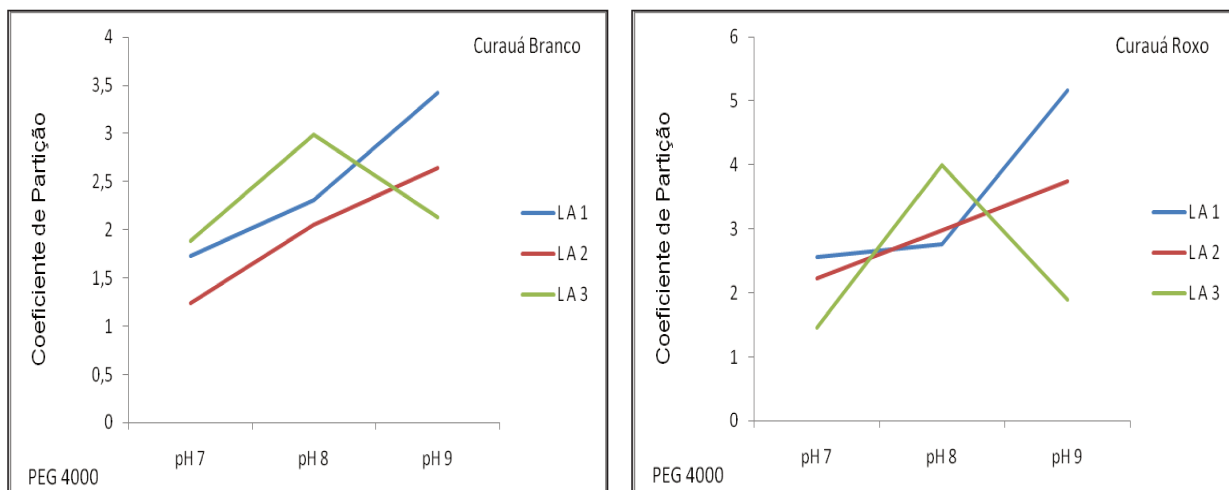


Figura 4.14 – Tendências dos Coeficientes de partição nos SBA com PEG 4000 das folhas do curatá branco e roxo, em que LA são as linhas de amarração dos sistemas.

Na Figura 4.15, observa-se a variação do K com o aumento do pH para o curauá branco e roxo, nos SBA com PEG 6000. Nesse caso, as tendências não apresentam semelhança quando comparados os curauás branco e roxo.

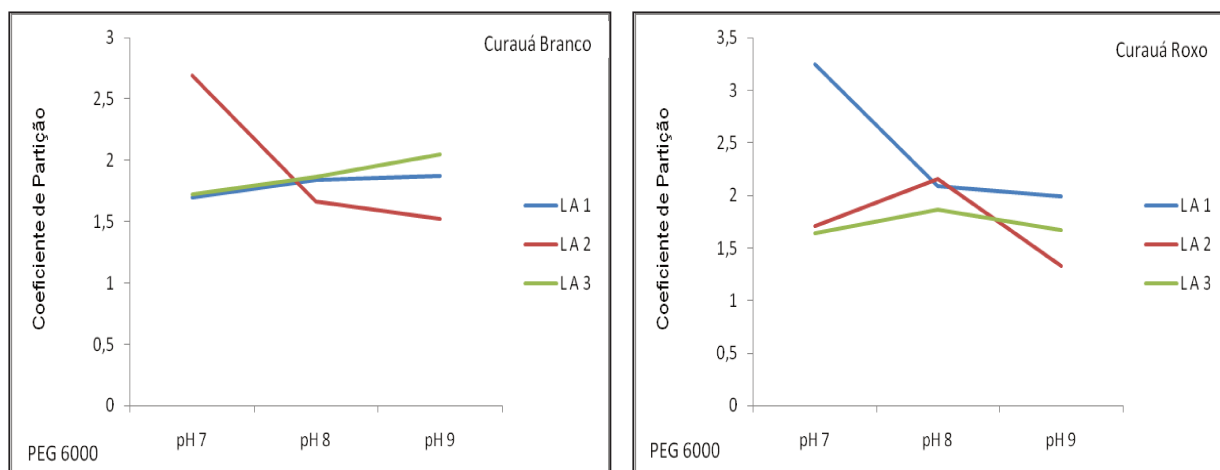


Figura 4.15 – Tendências dos Coeficientes de partição dos SBA com PEG 6000 das folhas do curauá branco e roxo onde LA são as linhas de amarração dos sistemas.

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

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

4.4 CÁLCULO DO CUSTO DE PRODUÇÃO DA BROMELINA DAS FOLHAS DE CURAUÁ

Objetivou-se efetuar a apuração dos custos e viabilidade do processo de extração e purificação da bromelina presente nas folhas de curauá branco e roxo, que tenha aplicação mercadológica.

De acordo com a definição de custos definidos em relação ao objeto de estudo, dada por Leone (1981), foram identificados os custos diretos de produção e levaram-se em consideração os

rendimentos obtidos em escala laboratorial do melhor sistema de cada variedade de curauá (SBA PEG 4000 em pH 9, linha de amarração 1).

As matérias-primas necessárias para formação do Sistema Bifásico Aquoso são PEG 4000, Fosfato de Potássio Monobásico P.A, Fosfato de Potássio Dibásico P.A, preços médios (de varejo) para 1 kg, cotados em R\$ 62,30, R\$ 44,50 e R\$ 41,80 respectivamente (VETEC Química Fina Ltda e Merse Artigos para laboratório Ltda, agosto/2009). A água foi cotada a R\$ 26,54 / 10 m³ (SANASA Campinas, fevereiro/2010) e a energia elétrica foi cotada a R\$ 278,70 / MWh (CPFL Campinas, fevereiro/2010). O valor do curauá é de R\$ 2,00/kg de folha (Projeto Curauá - PEMATEC, outubro/2009), e considerou-se que no processo de separação da fibra, o rendimento do extrato utilizado para purificação da enzima corresponde a 45% de sua massa (valor médio para as duas cultivares de curauá), tem-se que o preço por quilo de extrato das folhas de curauá é de R\$ 4,44.

Ao considerar-se que os frascos são adquiridos em lotes de 100 e o valor é de R\$ 132,00 por lote (TECNOFARMA Embalagens e Equipamentos Farmacêuticos, março/2010); que o custo do reator é R\$ 12.300,00 (ECIRTEC Equipamentos e Acessórios Ltda, março/2010), o qual será depreciado em 10 anos; que os cálculos de custo levam em consideração dois turnos de produção, ou seja, 16 horas por dia; que a capacidade do equipamento é 10L de SBA por hora de produção, e ainda que para cada 10 litros de SBA produzido, há rendimento de 5 litros de solução enzimática, tem-se para produção mensal os valores apresentados na Tabela 4.3, os quais representam 77,65% dos custos de produção.

Tabela 4.3 – Custos da matéria-prima da solução enzimática das folhas de curauá.

	Preço (R\$)	Quantidade para preparar 2L SBA	Custo para 1L de solução enzimática (R\$)
PEG	62,30/kg	396 g	24,67
Fosfato de Potássio Monobásico	44,50/kg	135 g	6,01
Fosfato de Potássio Dibásico	41,80/kg	135 g	5,64
Água	26,54/mês	1334 g	0,02

Folhas de Curauá	4,44/kg	25 g	0,11
Frascos	132,00/100 frascos	1	1,32
Depreciação do Reator	12.300/reator		0,06
Energia Elétrica	278,70/MWh	0,1KWh	0,06
TOTAL			37,89

A mão de obra constitui-se no salário mensal de um engenheiro, dois técnicos de produção (um por turno), um técnico administrativo e dois técnicos de serviços gerais, com jornadas de 40 horas semanais. Visto que os encargos trabalhistas acrescentam em torno de 70% ao salário base, a Tabela 4.4 apresenta os custos com mão de obra, que representam 22,35% dos custos de produção.

Tabela 4.4 – Custo da mão de obra para produção da solução enzimática de bromelina das folhas de curauá.

	Custo Unitário/mês	Custo Total/mês	Custo/L de solução enzimática
Engenheiro	R\$ 4.590,00	R\$ 4.590,00	R\$ 2,61
Técnicos de Produção	R\$ 2.000,00	R\$ 4.000,00	R\$ 2,27
Técnicos de Serviços Gerais	R\$ 600,00	R\$ 1.200,00	R\$0,68
Técnico Administrativo	R\$ 1.500,00	R\$ 1.500,00	R\$ 0,85
Encargos Trabalhistas (70%)		R\$ 7.903,00	R\$ 4,49
TOTAL mão de obra		R\$ 19.193,00	R\$ 10,91

O custo de produção de um litro de solução enzimática é dado pela soma dos custos de matéria-prima com os custos de mão de obra:

$$C = R\$ 37,89 + R\$ 10,91$$

$$C = R\$ 48,80/\text{L de solução enzimática}$$

Para estabelecer o preço de venda com base em custos, de acordo com Martins (2003), é necessário agregar uma margem (*markup*), demonstrada na Tabela 4.5, que deve ser estimada

para cobrir os gastos não incluídos ao custo, os tributos e comissões incidentes sobre o preço e o lucro desejado pelos investidores (Equação 3.6):

Tabela 4.5 – Demais elementos formadores do preço de venda - *Markup*.

Despesas Gerais e Administrativas	10% da receita bruta
Comissões dos Vendedores	5% do preço de venda bruto
Tributos incidentes sobre o preço de venda	20% bruto
Margem de Lucro desejada	0% sobre a receita bruta
TOTAL (<i>Markup</i>)	35% sobre o preço de venda bruto

Dessa maneira, quando não se obtém lucro (margem de lucro desejada é 0%), e ao utilizar-se a Equação 3.5, tem-se o preço de venda (PV):

$$PV = R\$ 75,06$$

A Tabela 4.6 apresenta a variação do preço de venda por litro de solução enzimática, quando se altera a margem de lucro:

Tabela 4.6 – Variação do preço de venda em função da margem de lucro.

Margem de Lucro (%)	Preço de Venda (R\$/L)	Margem de Lucro (%)	Preço de Venda (R\$/L)
5	R\$ 78,81	40	R\$ 105,08
10	R\$ 82,56	50	R\$ 112,58
20	R\$ 90,07	75	R\$ 131,35
30	R\$ 97,57	100	R\$ 150,11

Não foi encontrado nenhum estudo semelhante de estimativa de custo de produção da bromelina a partir das folhas do curauá que possa servir de comparação. No catálogo SIGMA (2010), o preço de 10g de bromelina comercial proveniente do abacaxi, com 3 – 7 U e 35% de proteína medida por Biureto é de R\$ 224,00. Cesar (2005) efetuou análise de viabilidade de extração da bromelina do caldo prensado do abacaxi, utilizou uma micro-coluna para extração líquido-líquido em duas fases aquosas, num sistema PEG/sal, e apurou custo de produção de R\$

808,90/kg de precipitado e R\$ 10,65/g de extrato purificado, revelou, assim, a possibilidade concreta de aplicação comercial do método proposto.

Diante dos resultados apresentados, pode-se afirmar que o processo de purificação da bromelina das folhas de curauá, ao utilizar-se sistema bifásico aquoso, PEG/sal, é promissor no que diz respeito à sua possibilidade de produção em escala industrial.

A comercialização da solução enzimática seria facilitada se definida a aplicação a que se destina. Uma vez que, de acordo com o seu uso, é definido o teor de pureza do produto, e dessa maneira, devem-se estabelecer outros estágios de purificação necessários para determinados usos da bromelina, como, por exemplo, para utilização na produção de medicamentos, em que a legislação exige grau de pureza de 99,9%. Por outro lado, em processos de clarificação de cerveja ou amaciamento de carnes esse tipo de purificação é suficiente, isto é, não há necessidade de outros estágios para elevar sua pureza.

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O objetivo geral desta pesquisa foi de caracterizar e purificar as proteases presentes nas folhas do curauá das cultivares branco e roxo e analisar a viabilidade econômica do processo de purificação.

Na caracterização da enzima, foi estudada a influência do pH e da temperatura sobre a atividade da protease. Evidenciou-se que a atividade foi afetada na faixa de pH estudado. A máxima atividade foi encontrada no pH 8,5, tanto para o curauá na variedade branco, como na variedade roxo; isso indica que esse é o pH ótimo para a bromelina das folhas de curauá. Entretanto, um pico de menor intensidade foi observado no pH 5,5. Para o curauá branco, a atividade máxima foi observada em 30°C, e outro pico foi observado em 10°C; para o curauá roxo, os resultados mostraram três picos em que a atividade foi máxima, (10, 20 e 35°C).

A presença de dois ou mais picos em que a atividade foi elevada, tanto no estudo do pH, quanto no estudo da temperatura, indica que pode haver mais de uma protease nas folhas de curauá.

Na estimativa da massa molar das enzimas do curauá, verificou-se que, para ambas as espécies de curauá (branco e roxo), a eletroforese apresentou bandas de massa molar de 24 kDa, semelhante à bromelina comercial proveniente do abacaxi. Outras bandas foram observadas com massas molares de 20, 43 e 59 kDa na eletroforese do curauá branco e 20, 40 e 49 kDa na eletroforese do curauá roxo. Dessa forma, evidenciou-se que pode existir a presença de outras proteases, como citado nos estudos dos efeitos de pH e temperatura.

Quando os dados experimentais do curauá branco foram ajustados ao modelo linearizado de Lineweaver-Burk, obteve-se o valor da constante K_m igual a 0,00985 $\mu\text{mol/mL}$, e o valor de V_{max} igual a 0,03757 $\mu\text{mol de BSA/mL.min}$. Para o curauá roxo, os valores encontrados foram K_m igual a 0,00465 $\mu\text{mol/mL}$, e V_{max} igual a 0,0428 $\mu\text{mol de BSA/mL}$.

O estudo da partição da bromelina das folhas de curauá, em que se utilizou processo de extração em descontínuo, através da avaliação da atividade específica e do coeficiente de partição da proteína, objetivou encontrar as condições adequadas de um sistema bifásico aquoso, que permitissem obter resultados viáveis de extração da bromelina, ao variarem-se pH do sistema comprimento da linha de amarração (concentração de PEG e sal) e massa molar do PEG.

As partições foram superiores a unidade, isso indicou que as proteases das folhas de curauá branco e roxo possuem afinidade com o PEG. Os sistemas bifásicos aquosos, em que se utiliza PEG 4000 apresentam melhores resultados na partição da bromelina se comparados aos sistemas nos quais se utiliza PEG 6000.

Tanto para o curauá branco, quanto para o roxo, o melhor sistema de partição da bromelina foi o SBA PEG 4000 em pH 9, linha de amarração 1, em que os coeficientes de partição encontrados foram 3,42 e 5,17 para o curauá branco e roxo, respectivamente.

A solução enzimática dos melhores sistemas contém 7 U de bromelina e, aproximadamente, 17 mg/L de proteína total medida por Bradford, para o curauá branco; e 6 U de bromelina e, aproximadamente, 23 mg/L de proteína total medida por Bradford, para o curauá roxo.

O preço de venda calculado para um litro de solução enzimática com essas características, quando não se obtém lucro (margem de lucro desejada é 0%), foi estimado em R\$ 75,06. Assim, pode-se concluir que o processo de purificação da bromelina das folhas de curauá, ao ser utilizado sistema bifásico aquoso PEG/sal, é promissor no que diz respeito a sua possibilidade de produção em escala industrial. Desse modo, parece útil conhecer sua aplicação a fim de definir o teor de pureza almejado.

Quando se utiliza matriz vegetal, ocorrem algumas interferências, pois quantidade de sol e água durante seu crescimento, dia e hora da colheita da planta, e tempo de sua estocagem no laboratório, por exemplo, influenciam nos resultados; portanto, novos estudos, com utilização de outros métodos, tornam-se importantes para confirmação dos resultados.

É considerável fazer também a purificação, ao ser usada mistura das duas cultivares do curauá, uma vez que no subproduto das indústrias produtoras de fibras, os extratos das duas variedades estão misturados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ARÁUZ, J. F. S. **Estudo comparativo dos anti-inflamatórios de origem vegetal (bromelina, escina e papaína) em cirurgia**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiróz", Universidade de São Paulo, 1982. Tese (Mestrado)

ASENJO, J.A.; CHAUDHURI, J.B. Innovative separation methods in bioprocessing. In: **Separation processes in the food and biotechnology industries: Principles and Applications**. GRANDISON, A.S. (ed); LEWIS, M.J. (ed). Cambridge, U.K.: Woodhead Publ. Limited, 1996.

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

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

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

BALLS, A .K.; THOMPSON, R.R.; KIES, M.W. Bromelain. Properties and commercial production. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 33, p. 950-953, 1941.

BAMBERGER, S.; BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; VAN ALSTINE, J.M.; WEBWE, T.J. Preparation of phase system and measurement of their 87 physicochemical properties. In: **Partitioning in aqueous two-phase systems**. BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. Orlando: Academic Press, 1985.

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

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

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

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

BERGER, N.; KROSCHER, J.; HILGER, T. Effect of fertilization on the fiber production of curauá (Ananas lucidus Miller) in the eastern Amazon Region of Brazil. In: **Deustcher Tropentag – Conference on International Agricultural Research for Development**, Bonn/Alemanha, p. 9-11 2001.

BERNARDI, L.A. **Manual de formação de preços: políticas, estratégias e fundamentos**. 3. ed. São Paulo: Atlas, 2008.

BORNIA, A.C. **Análise gerencial de custos: aplicação em empresas modernas**. 1. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

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

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

BRUNI, A.L.; FAMÁ, R.; SIQUEIRA, J.O. **Análise do risco na avaliação de projetos de investimento: uma aplicação do método de Monte Carlo.** Infinita Consultoria, Treinamento e Editora Ltda. Disponível em < <http://www.infinitaweb.com.br>>. Acesso em: set 2009.

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

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

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

CESAR, A.C.W. **Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000. Tese (Mestrado).

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

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

CHALOS, P. **Managing costs in today's manufacturing environment.** New Jersey: Prentice-Hall, 1992.

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

CREPALDI, S.A. **Contabilidade gerencial: teoria e prática.** São Paulo: Atlas, 1998.

DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD, H.T.; YEO, F.F. **The families of the monocotyledons**. New York: Springer-Verlag, 1985.

DIAMOND, A.D.; HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. *In: Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, v.47, p. 90-134, 1992.

DIAZ, N. A. M. Enzimas em panificação. In: VITTI, P. **Seminário sobre uso de enzimas em biscoitos e panificação**. Campinas: ITAL, p. 19-26, 1988.

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

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

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

FLORENTINO, A.M. **Custos: princípios, cálculo e contabilização**. São Paulo: FGV, 1972.

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

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

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

FREITAS, A.L.; VEY, I.H. Custos nas refeições industriais: estudo de caso. In: 1º Simpósio de Iniciação Científica dos Cursos de Ciências Contábeis de Santa Maria. **Revista Eletrônica de Contabilidade**. Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

HARRIS, E.L.V.; ANGAL, S. **Protein purification methods. A practical approach**. 5. ed. Oxford: IRL Press, 1994.

HEINICKE, R.M.; GORTNER, W. A. Stem bromelain: A new protease preparation from pineapple plants. **Economic Botany**, v. 11, n. 3, p. 225-234, 1957.

HIRANO, Z.M.B.; SILVA FILHO, H.H.; MULLER, G.C.K. ; SCHIMIDT, S.R. **Bioquímica: manual prático**. Blumenau: Editora da FURB, 2001.

HORNGREN, C. T. **Contabilidade de custos**. 9 ed. São Paulo: LTC, 2000.

HUSTEDT, H.; KRONER, K.H.; PAPAMICHAEL, N. Continuous cross-current aqueous two-phase extraction of enzymes from biomass: automated recovery in production. **Process Biochemistry**, v. 23, p. 129-137, 1988.

JACOMINO, A.P. **Relatório de Visita Técnica**. Santarém, 2002.

JOHNSON, J.C. **Industrial enzymes: recent advances**. New Jersey: Noyes Data Corporation, 1977.

KHAN, R.H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S.K. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. **Journal of Biosciences**, v. 28, p. 709-714, 2003.

KIELING, D.D. **Enzimas, aspectos gerais**. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2002.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR, A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: **Biotecnologia industrial. Volume II. Engenharia Bioquímica**. Cood: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

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

KRONER, K.H.; HUSTEDT, H.; KULA, M.R. Extractive enzyme recovery: economic considerations. **Process Biochemistry**, v. 19, n. 5, p. 170-179, 1984.

KULA, M.R. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 24, p. 73-118, 1982.

KULA, M.R. Use of phase partitioning to scale up protein purification. In: **Protein purification: micro to macro**. BURGESS R.J. (ed). New York: Liss, A.R., 1987.

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

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMEIRA, O.A.; REIS, I.N.R.S; CORDEIRO, I.M.C.C. Otimização da propagação in vitro de curauá (*Ananas erectifolius* L.B.Smith). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 78-81, 2003.

LAPPONI, J.C. **Avaliação de projetos de investimento: Modelos em excel**. 3. ed. São Paulo: Laponi, 1996.

LEÃO, A.L., TAN, I.H., CARASCHI, J.C. Curaua fiber – A tropical natural fibers from Amazon - Potential and application in composites. **International Conference on Advanced Composites**, pp. 557–564, Hurghada, Egito, 1998.

LEDO, I.A.M. **O cultivo do curauá no Lago Grande da Franca**. Banco de Crédito da Amazônia S/A, 1967.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2002.

LEONE, G.S.G. **Custos: planejamento, implantação e controle**. 1. ed. São Paulo: Atlas, 1981.

LOPES, F.L.G. **Recuperação da bromelina a partir da polpa do Ananas Comosus L. Merrill, utilizando processo de separação por membrana**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Tese (Doutorado)

LOPES, F.L.G.; SEVERO JR, J.B.; SOUZA, R.R.; EHRHARDT, D.D.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOURGI, E.B. Concentration by membrane separation processes of a medicinal product obtained from pineapple pulp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 457-464, 2009.

LOTZ-WINTER, H. On the pharmacology of bromelain: An update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. **Planta Medica**, v. 56, n. 3, p. 249- 253, 1990.

MANDARINO, U. **Custos**. São Paulo: Atlas, 2000.

- MARTINS, E. **Contabilidade de custos**. 9. ed. São Paulo: Atlas, 2003.
- MATTIASSEN, B.; LING, T.G.I. Extraction in aqueous two-phase systems for biotechnology. In: **Separations for biotechnology**. VERRALL, M.S.; HUDSON, M.J. (Eds.). Chichester: Ellis Horwood, p. 270-292, 1987.
- MATTOS, P.E.O. **Validação clínica da suplementação de bromelaína para atletas. Projeto de Pesquisa**, Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular, UNIFESP, São Paulo, 2005.
- MAURER, H.R. Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. **Cell Mol Life Sci**, v. 58, p. 1234–1245. 2001.
- MEINIG, G.E. Bromelain. **Phytomedicine**, v. 2, p. 1-2, 1999.
- MICHELINI, J. **Atividade de bromelina em plantas de curauá (Ananas erectifolius L.B.Smith) em diferentes condições físico-químicas, na fase de extração da fibra**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2003. Relatório de Iniciação Científica
- MINAMI, N.M. **Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação da amiloglicosidase**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997. Tese (Mestrado)
- MOYNA, P.; TUBIO, R. Mucilages in succulent plants. **Planta Medica**, v. 32, p. 201-205, 1977.
- MOORE, D.J.; CAYGILL, J.C. Proteolytic activity of malaysian pineapple. **Tropical Science**, London, v.21, n.2, p.97-102, 1979.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1986.
- MORRIS, J. G. Cinética de reações catalisadas por enzimas. In: **Físico-química para biólogos**. 1. ed. São Paulo: Editora Polígono, Edusp, p. 323 – 367, 1972.
- MORRISON, R.T.; BOYD, R.N., **Química orgânica**. 8. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986.
- MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with

enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307-310, 1981.

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

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

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

OMAR, S.; IDRUS, A.Z.; RAZAK, O.A. Extraction and activity of bromelain from pineapple. **Mardi Research Bulletin**, Malásia, v.6, n.2, p.172-9, 1978.

OXITENO. *Boletim Técnico*. Disponível em <http://www.oxiteno.com.br/aplicacoes/mercados/doc/documento.asp?segmento=0600&idioma=PO&produtoMarca=441405153474BBBD9JBBD0444J&r=.pdf>. Acesso em: ago. 2009.

PADOVEZE, C.L. **Contabilidade gerencial: um enfoque em sistema de informação contábil**. 3. ed. São Paulo: Atlas, 1996.

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

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

PEMATEC. Projeto Curauá. Disponível em <http://www.pematecpara.com.br/projeto.asp>. Acesso em: jul. 2009.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CASTRO, D.M.; RODRIGUES, H.C.A.; BEIJO, L.A.; LAMEIRA, O.A. **Caracteres anatômicos de fibras foliares de brotações de**

curauá propagadas in vitro - ActaSciBiolSci. Maringá, v. 29, n. 1, p. 23-28, 2007.

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

PORTO, A.L.F. **Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998. Tese (Doutorado).

RABELO, A.P.B. **Estudo e desenvolvimento de uma micro-coluna de campânulas pulsantes para a purificação de proteínas**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. Tese (Doutorado).

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

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

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Volume 3. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária – UFPEL, 2000.

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

ROCHA, E.C.; GHELIER JR, J. **Aproveitamento de resíduos gerados na aglomeração de fibras de coco com látex natural**. Matéria técnica SENAI. Rio de Janeiro, 2000.

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

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Editora Eventos, 2002.

SANTANA J.C.C. **Caracterização e recuperação das enzimas α e β - amilases por sistema de**

adsorção em leito expandido. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Tese (Doutorado).

SANTOS, J.J. **Análise de custos: um enfoque gerencial.** São Paulo: Atlas, 1995.

SATYANARAYANA, K.G.; GUIMARÃES, J.L.; WYPYCH, F. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production, morphology, properties and applications. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 38, p. 1694-1709, 2007.

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

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

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

SCOPES, R.K. **Protein purification. Principles and practice.** 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1994.

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

SILVA, L. C. Os usos da bromelina na medicina. **Revista Racine**, v. 5, n. 1, p. 6, 1991.

SRIVASTAVA, R.; KULSHRESHTHA, D.K. Bioactive polysaccharides from plants. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2877-2883, 1989.

SUBRAMANIAM, N.; CARTAXO, M.E.Q.; SUBRAMANIAM, S.; FARIAS, J.L. Study of bromelain present in the pineapple plant of Paraíba. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 30, n.11, p. 373-8, 1978.

SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y.; YANG, H.C. **Purification and characterization of bromelain**

isolated from pineapple, v. 35, p. 300-307, 1992.

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

TAUSSIG, S. J.; SZEKERCZES, J.; BATKIN, S. Inhibition of tumous growth *in vitro* by bromelain, an extract of the pineapple plant (*Ananas comosus*). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 6, p. 583-639, 1985.

TISSEAU, R. Activité proteolytique de l'ananas utilisé em conserverie et de sés déchets. **Fruits**, Paris, v. 31, n. 6, p. 373-378, jun. 1976.

TOMODA, M.; GONDA, R.; SHIMIZU, N.; NAKANISHI, S.; HIKINO, H. A mucilage from *Hibiscus moscheutos* leaves. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2297-2300, 1987.

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

VILLEN, R.A. Aspectos econômicos. In: **Biotecnologia industrial. Volume II. Engenharia Bioquímica**. Cood: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

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

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

WILLIAMS, C. A., The leaf flavonoids of the orchidaceae. **Phytochemistry**, v. 18, p. 803-813, 1979.

WHITAKER, J. R. Practical applications of enzyme technology. **Revista Enzymes**, v. 2, n. 1, p. 54-83, 1976.

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

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

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

YAO C.Y.; TANG S.K.; ZHANG J.H.; YU Y.T. Kinetics of lipase deactivation in aot/isooctane reversed micelles. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 18, n. 4, p. 279-284, 2002.

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

APÊNDICE

Resultados obtidos na partição da bromelina das folhas de curauá:

Tabela A.1 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 7,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	<i>K</i>
1	Fase Leve	0,004778	18,73471	0,255035	1,73
	Fase Pesada	0,004809	32,57347	0,147635	
2	Fase Leve	0,004809	22,02277	0,218365	1,24
	Fase Pesada	0,006301	35,75313	0,176236	
3	Fase Leve	0,007711	30,62231	0,251810	1,89
	Fase Pesada	0,007296	54,72270	0,133327	

Tabela A.2 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 8,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	<i>K</i>
1	Fase Leve	0,004919	21,64940	0,227212	2,31
	Fase Pesada	0,004712	47,88161	0,098409	
2	Fase Leve	0,008043	22,23957	0,361653	2,06
	Fase Pesada	0,006633	37,74042	0,175753	
3	Fase Leve	0,005079	32,32054	0,157145	2,98
	Fase Pesada	0,004623	87,74782	0,052685	

Tabela A.3 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 9,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,008396	35,39180	0,23723	3,42
	Fase Pesada	0,007836	113,04095	0,06932	
2	Fase Leve	0,008775	28,97828	0,302813	2,64
	Fase Pesada	0,008489	74,14393	0,114494	
3	Fase Leve	0,007774	30,65844	0,253568	2,13
	Fase Pesada	0,008116	68,16400	0,119066	

Tabela A.4 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 7,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,004478	21,73371	0,206039	1,70
	Fase Pesada	0,006095	50,35067	0,121051	
2	Fase Leve	0,006716	19,47543	0,344845	2,69
	Fase Pesada	0,005771	45,02112	0,128184	
3	Fase Leve	0,005871	20,43294	0,287330	1,73
	Fase Pesada	0,006434	38,64373	0,166495	

Tabela A.5 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 8,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,005317	19,42123	0,273773	1,84
	Fase Pesada	0,004882	32,79026	0,148886	
2	Fase Leve	0,004975	20,10775	0,247417	1,67
	Fase Pesada	0,005141	34,66912	0,148288	
3	Fase Leve	0,009315	28,54123	0,326387	1,87
	Fase Pesada	0,008001	45,89751	0,174324	

Tabela A.6 - Partição da bromelina das folhas do curauá branco, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 9,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,007836	16,63903	0,470941	1,88
	Fase Pesada	0,009577	38,17401	0,250877	
2	Fase Leve	0,006281	23,17901	0,270978	1,53
	Fase Pesada	0,007587	42,72670	0,177570	
3	Fase Leve	0,007960	23,28742	0,341815	2,05
	Fase Pesada	0,006302	37,74042	0,166983	

Tabela A.7 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 7,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,008706	32,21214	0,270271	2,55
	Fase Pesada	0,005804	54,86723	0,105783	
2	Fase Leve	0,005556	22,09504	0,251459	2,23
	Fase Pesada	0,005638	50,09774	0,112540	
3	Fase Leve	0,005348	21,30012	0,251078	1,46
	Fase Pesada	0,005442	31,63402	0,172030	

Tabela A.8 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 8,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,005721	34,81368	0,164332	2,77
	Fase Pesada	0,005265	88,61500	0,059414	
2	Fase Leve	0,010033	32,39280	0,309729	2,97
	Fase Pesada	0,008085	77,55845	0,104244	
3	Fase Leve	0,010282	33,31418	0,308637	3,99
	Fase Pesada	0,005721	34,81368	0,164332	

Tabela A.9 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 4000/fosfato em pH 9,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,005576	22,63702	0,246322	5,17
	Fase Pesada	0,005203	109,13828	0,047673	
2	Fase Leve	0,008060	24,66044	0,326839	3,75
	Fase Pesada	0,005605	64,29782	0,087172	
3	Fase Leve	0,004436	17,79527	0,249280	1,89
	Fase Pesada	0,004478	33,87424	0,132195	

Tabela A.10 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 7,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,008292	26,86453	0,308660	3,25
	Fase Pesada	0,005307	55,87894	0,094973	
2	Fase Leve	0,004989	23,70895	0,210427	1,71
	Fase Pesada	0,006095	49,47144	0,123202	
3	Fase Leve	0,005307	22,05890	0,240583	1,64
	Fase Pesada	0,006638	45,14758	0,147029	

Tabela A.11 - Partição da bromelina das folhas do curauá roxo, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 8,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,006468	34,19943	0,189126	2,09
	Fase Pesada	0,006385	70,54874	0,090505	
2	Fase Leve	0,005628	20,57747	0,273503	2,15
	Fase Pesada	0,004291	33,80197	0,126945	
3	Fase Leve	0,007753	27,26199	0,284389	1,86
	Fase Pesada	0,007090	46,44835	0,152643	

Tabela A.12 - Partição da bromelina das folhas de curauá roxo, no SBA PEG 6000/fosfato em pH 9,0.

Linha de Amarração	Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	K
1	Fase Leve	0,004519	19,09604	0,236646	1,99
	Fase Pesada	0,005452	45,79797	0,119045	
2	Fase Leve	0,006447	25,47343	0,253087	1,33
	Fase Pesada	0,008727	45,70764	0,190931	
3	Fase Leve	0,004726	23,14288	0,204210	1,67
	Fase Pesada	0,004540	37,01777	0,122644	