

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LUCAS ARAUJO TRAJANO SILVA

RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE CELULASES
PRODUZIDAS POR *Penicillium sp.* FSDE 15

João Pessoa – PB

2023

LUCAS ARAUJO TRAJANO SILVA

**RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE CELULASES PRODUZIDAS
POR *Penicillium* sp. FSDE 15**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa

Coorientadora: Profa. Dr. Sharline Florentino de Melo Santos

JOÃO PESSOA PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586r Silva, Lucas Araujo Trajano.

Recuperação e purificação parcial de celulasas produzidas por *Penicillium* sp. FSDE 15 / Lucas Araujo Trajano Silva. - João Pessoa, 2023.
71 f. : il.

Orientação: Carlos Alberto Bispo de Sousa.

Coorientação: Sharline Florentino de Melo Santos.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Catalisadores - Enzimas. 2. Fungo filamentoso - *Penicillium*. 3. Biomassa. 4. Sistemas aquosos bifásicos. I. Sousa, Carlos Alberto Bispo de. II. Santos, Sharline Florentino de Melo. III. Título.

UFPB/BC

CDU 542.973:577.15(043)

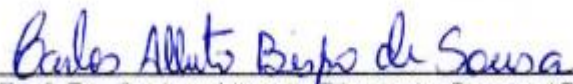
LUCAS ARAUJO TRAJANO SILVA

**RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE CELULASES PRODUZIDAS
POR *Penicillium* sp. FSDE 15**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovado em 21 de setembro de 2023.

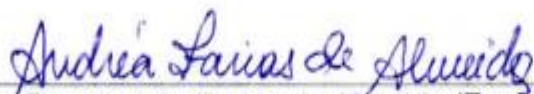
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa (Orientador)



Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos (Coorientadora)



Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida (Examinadora Interna)



Profa. Dra. Andréa Lopes de Oliveira Ferreira (Examinadora Interna)



Prof. Dr. Marcelo Barbosa Muniz (Examinador Externo)

Ao meu querido pai,
Edson de Araújo Silva
(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai, que foi não apenas um pai, mas também um grande amigo que tive nos últimos momentos de sua vida. Ele foi um exemplo de abnegação para sua família, sempre agindo com honestidade e caráter exemplar. Ele costumava dizer discretamente que seu maior orgulho residia no fato de que um de seus filhos decidiu estudar e buscar uma vida diferente da dele. Infelizmente, ele não viveu para testemunhar a realização desse sonho em terra, mas eu sei que ficaria imensamente feliz.

Minha mãe, uma mulher incrível, sempre me colocou em primeiro lugar, abrindo mão de qualquer luxo que poderia ter para garantir minha educação. Sua dedicação e sacrifícios foram fundamentais para eu estar aqui hoje.

Quero expressar minha gratidão à Wanessa de Oliveira, minha melhor amiga que perdi durante esta jornada. Ela foi quem me incentivou a embarcar no mestrado. Sem o apoio dela, eu não teria dado o primeiro passo. Wanessa me ensinou o verdadeiro significado de se dedicar ao próximo, ajudando alguém sinceramente, sem esperar nada em troca.

Gostaria de estender meus agradecimentos ao professor Carlos Alberto Bispo, que me deu a oportunidade de ser orientado por ele neste trabalho. Ele dedicou seu tempo para me ajudar na realização dos experimentos, participando de reuniões e confiando em mim com a chave do laboratório.

Minha equipe na coordenadoria de medições ambientais – SUDEMA também merece meu reconhecimento. Especialmente a João Carlos de Miranda, meu coordenador, que me deu total apoio e disponibilidade para perseguir este sonho.

Agradeço também aos meus amigos, especialmente a João e Larissa, que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada. Durante a pandemia e a doença do meu pai, eles me deram um lugar para dormir e apoio emocional, mostrando o verdadeiro significado da amizade.

Por último, mas não menos importante, quero expressar minha profunda gratidão a Alan Moreira Sá. Ele renunciou a momentos preciosos com sua família e amigos para me ajudar inúmeras vezes ao longo desses anos. Não existem palavras suficientes para descrever o quanto ele me incentivou e apoiou durante o momento mais difícil da minha vida. Ele me fez perceber que esta conquista vai além de um simples título, é um sonho compartilhado por várias pessoas, e por isso, é ainda mais significativa.

**“Don’t you worry. I’m going
to make sure that tomorrow is
another great day. I promise.”**

(Inside Out)

RESUMO

As enzimas são moléculas de proteína altamente especializadas que desempenham um papel crucial ao acelerar as reações químicas nos organismos vivos. Elas atuam como catalisadores, diminuindo a energia de ativação necessária para uma reação ocorrer, aumentando, assim, a velocidade das reações metabólicas. A caracterização enzimática envolve a análise de fatores como temperatura, pH e termoestabilidade para compreender suas propriedades e funcionalidades. Tanto temperatura quanto pH afetam sua atividade, com a maioria das enzimas apresentando valores ótimos de funcionamento. Desvios desses parâmetros podem levar à desnaturação. Este estudo teve como objetivo a caracterização do complexo enzimático produzido pelo fungo *Penicillium* sp. FSDE 15, obtido a partir de resíduos agroindustriais, como farelo de trigo e sabugo de milho. A pesquisa incluiu a análise de parâmetros como temperatura e pH, estabilidade térmica e diferentes valores de pH das enzimas CMCase, FPase e AVICELase. O processo de purificação e concentração das enzimas foi realizado utilizando sais, solventes orgânicos e sistemas aquosos bifásicos com polietilenoglicol 4000 e tampão citrato. Os testes foram conduzidos em diversas temperaturas (de 40 a 90 °C) e faixas de pH (de 3 a 6). A faixa de temperatura ótima encontrada foi de 40 a 50 °C, que diminuiu em temperaturas mais elevadas. Nos ensaios de pH ótimo, os valores variaram entre 3 e 4, dependendo da atividade em estudo, com as enzimas sendo mais ativas em pHs mais ácidos. A utilização de etanol como solvente precipitante das enzimas se mostrou viável na proporção 1:1 v/v, mantendo as características das enzimas. Por outro lado, concentrações mais elevadas de etanol, acetona ou sal de amônia resultaram em desnaturação gradual das enzimas. As enzimas demonstraram estabilidade em faixas específicas de temperatura, de 40 a 70 °C, durante 120 minutos, e pH variando de 3 a 6, o que é relevante para aplicações industriais. O estudo de partição em sistemas aquosos bifásicos não revelou interferências estatisticamente significativas nas concentrações de polietilenoglicol e sal citrato de sódio analisadas, levando à escolha do sistema aquoso de menor custo para a formação da fase bifásica. A análise comparativa com estudos anteriores encontrados na literatura confirmou os resultados e tendências observadas neste estudo.

Palavras-chave: Fungo Filamentoso; Enzimas; Biomassa; SABS; *Penicillium*

ABSTRACT

Enzymes are highly specialized protein molecules that play a crucial role in accelerating chemical reactions in living organisms. They act as catalysts, reducing the activation energy required for a reaction to occur, thereby increasing the speed of metabolic reactions. Enzyme characterization involves analyzing factors such as temperature, pH, and thermostability to understand their properties and functionalities. Both temperature and pH affect their activity, with most enzymes having optimal operating values. Deviations from these parameters can lead to denaturation. This study aimed to characterize the enzymatic complex produced by the fungus *Penicillium* sp. FSDE 15, obtained from agroindustrial residues such as wheat bran and corn cobs. The research included the analysis of parameters such as temperature and pH, thermal stability, and different pH values for the enzymes CMCase, FPase, and AVICELase. Enzyme purification and concentration were carried out using salts, organic solvents, and aqueous biphasic systems with polyethylene glycol 4000 and citrate buffer. Tests were conducted at various temperatures (from 40 to 90°C) and pH ranges (from 3 to 6). The optimal temperature range found was from 40 to 50°C, decreasing at higher temperatures. In optimal pH assays, values varied between 3 and 4, depending on the activity under study, with enzymes being more active at lower pH values. The use of ethanol as a precipitating solvent for enzymes was viable at a 1:1 v/v ratio, preserving enzyme characteristics. However, higher concentrations of ethanol, acetone, or ammonium salt resulted in gradual denaturation of the enzymes. The enzymes demonstrated stability within specific temperature ranges, from 40 to 70°C, for 120 minutes, and pH ranging from 3 to 6, which is relevant for industrial applications. The partition study in aqueous biphasic systems revealed no statistically significant interference in the concentrations of polyethylene glycol and sodium citrate analyzed, leading to the choice of the aqueous system with the lowest cost for the formation of the biphasic phase. Comparative analysis with previous studies found in the literature confirmed the results and trends observed in this study.

Keywords: Filamentous Fungus; Enzymes; Biomass; ATPS; *Penicillium*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO GERAL	14
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	15
3.2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	17
3.3 CELULASES	18
3.4 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO	20
3.5 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	22
3.6 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS	23
4 METODOLOGIA	28
4.1 MICRORGANISMO E INÓCULO	28
4.2 SUBSTRATO	29
4.3 CULTIVO	29
4.4 EXTRATO BRUTO	30
4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	30
4.6 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	32
4.6.1 Ensaios de temperatura ótima e estabilidade	32
4.6.2 Ensaios de pH ótimo e estabilidade	32
4.7 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO	32
4.7.1 Precipitação com solventes orgânicos	33
4.7.2 Precipitação com sulfato de amônio	33
4.8 ENSAIOS DE PARTIÇÃO EM SABS	34
4.8.1 Avaliação do SABS por planejamento fatorial	34
4.9 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO	35
4.10 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA NOS SISTEMAS DE CONCENTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO	36
4.10.1 Ensaios de atividade enzimática	36
4.10.2 Ensaios de proteína	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

5.1 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	37
5.1.1 Temperatura ótima	37
5.1.2 Valor de pH ótimo	39
5.1.3 Estabilidade térmica	42
5.1.4 Estabilidade ao pH	44
5.2 CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS POR PRECIPITAÇÃO	46
5.2.1 Precipitação com etanol e acetona	46
5.2.2 Precipitação por sal	51
5.2.2.1 <i>Precipitação com sulfato de amônio.</i>	51
5.3 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO	55
5.4 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE PARTIÇÃO POR SABS	57
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

As enzimas geralmente são proteínas que atuam como catalisadores bioquímicos em diversas reações biológicas, com aplicações industriais em diferentes áreas, tais como a indústria farmacêutica, alimentícia e têxtil (NASCIMENTO, SILVA e CESARINO, 2017). Nos últimos anos, intensificaram-se as pesquisas para desenvolvimento de processos de produção de enzimas mais eficientes, com maiores rendimentos e menores custos. Uma opção tem sido o aproveitamento de resíduos da agroindústria para produção de enzimas por meio de fermentação em estado sólido, dentre os quais, podemos citar casca de coco, bagaço de milho, entre outros (PANESAR et al., 2016).

Os resíduos agroindustriais contêm nutrientes diversos, além de fontes de carbono e energia (pectina, celulose, amido), podendo ser utilizados como substratos em processos biotecnológicos para obtenção de bioprodutos. Assim, em condições favoráveis, microrganismos podem produzir de forma satisfatória uma grande variedade de enzimas, como xilanases, celulasas, amilases, pectinases, etc (COELHO et al., 2001; SANTOS, 2021). Porém, a recuperação das enzimas a partir do meio fermentado ainda é um desafio, devido aos elevados custos das operações convencionais de extração e purificação, o que eleva o custo final da produção, inviabilizando processos importantes, como a hidrólise enzimática de biomassa vegetal para a obtenção de combustíveis. As celulasas, por exemplo, são indispensáveis para a conversão enzimática de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis e a aplicabilidade industrial deste processo depende da sua produção em larga escala (SOUSA, 2014).

As diferentes etapas do processo de recuperação e purificação de enzimas podem incluir operações como precipitação, extração líquido-líquido que utilizem detergentes, solventes orgânicos, condições extremas de pH e cromatografia que podem promover a desnaturação irreversível das enzimas durante o processamento, ocasionando perda de atividade e, conseqüentemente, diminuição de rendimento e elevação de custos de produção (ANTUNES et al., 2017). Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de processos que produzam extratos fermentados com elevada atividade enzimática e boa estabilidade, sendo a qualidade das enzimas produzidas no processo fermentativo um fator determinante para sua aplicação industrial (SOUSA, 2014).

No que diz respeito à etapa de recuperação e purificação de enzimas, a extração líquido-líquido por meio de sistemas aquosos bifásicos (SABs) tem se mostrado promissora para uma grande variedade de produtos biotecnológicos. Tais sistemas destacam-se pela

vantagem em separar facilmente contaminantes e outras substâncias do refinado de interesse e apresenta baixo custo comparado a técnicas mais sofisticadas, como a cromatografia e eletroforese (PHONG et al., 2018; VARADAVENKATESAN et al., 2021).

A aplicação de SABs na concentração e purificação de bioprodutos consiste na mistura do extrato bruto proveniente da fermentação ou de uma extração de baixa resolução, com um polímero e sal, ou outras substâncias imiscíveis, formando assim um sistema bifásico, com uma fase rica em polímero e outra rica em sal. Para o estabelecimento de um equilíbrio químico, as substâncias presentes no extrato serão particionadas para a fase superior ou inferior, dependendo da afinidade que têm com o polímero ou o sal. Assim, é possível concentrar a enzima de interesse em uma das fases e os contaminantes na outra, promovendo sua concentração e purificação (GONTIJO et al., 2017).

A composição dos SABs é fator determinante para sua eficiência. A ação dos SABs depende de diversos fatores, como massa molar do polímero, composição dos sistemas, temperatura, pH etc. Sua aplicação necessita de estudos para cada caso em particular. Para recuperação e purificação parcial de celulasas já foi demonstrado que são adequados, servindo como etapa inicial de processos de purificação (SOUSA, 2014).

O microrganismo *Penicillium sp.* FSDE 15 foi isolado por Carvalho-Gonçalves (2017) e tem demonstrado boa capacidade de produção de celulasas e amilases em diferentes resíduos agroindustriais, como bagaço de malte, farelo de trigo, crueira e sabugo de milho, em diversos trabalhos do grupo de pesquisa vinculado ao PPGEQ da UFPB nos últimos anos (ALEIXO JÚNIOR, 2018; SIMÕES, 2021; SANTOS, 2021). Apesar disso, não foram realizadas ainda pesquisas a respeito do processo de recuperação e purificação das enzimas produzidas por este fungo, as quais têm demonstrado boa atividade e estabilidade, mostrando-se bastante promissoras para aplicação industrial.

Portanto, esta pesquisa tem por finalidade estudar a recuperação e purificação de enzimas celulolíticas (FPase e CMCase) a partir do extrato bruto obtido a partir das melhores condições operacionais de cultivo apontadas na literatura a partir de resíduos agroindustriais (SANTOS, 2021). Foram testados métodos de precipitação (precipitação por adição de solventes, sais e polímeros) e sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol e citrato de sódio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o processo de concentração e recuperação de enzimas celulasas produzidas por *Penicillium sp.* FSDE 15.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter o extrato bruto de acordo com as melhores condições apontadas na literatura por Santos, 2021.
- Caracterizar as enzimas obtidas quanto ao pH ótimo, temperatura ótima e termoestabilidade.
- Avaliar a aplicabilidade de processos de recuperação de enzimas de baixa resolução, como precipitação por solvente e por sais.
- Aplicar SABs formados por polietilenoglicol e citrato de sódio que resultam em concentração e aumento de pureza das celulasas presentes no extrato bruto ou precipitado, estudando a influência da temperatura e otimização da composição.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Nos últimos anos, o uso dos resíduos da produção agroindustrial tem se tornado relevante e uma prática regular empregada em bioprocessos. O desenvolvimento de caminhos tecnológicos alternativos para utilização da biomassa, oriunda de tais sobras, são aplicados em substituição aos substratos convencionais e não renováveis. Tal solução reflete a orientação e busca de opções sustentáveis, além de agregar valor a subprodutos, gerando substâncias de interesse econômico. Dentre os bioprodutos produzidos encontram-se: biofertilizantes, suplementos para ração animal, biopesticidas, biofungicidas, esporos, probióticos, pigmentos, enzimas celulolíticas, dentre outros (BRAGA, BAFFI, ALVES DO PRADO, 2023; SANTOS et al., 2018; RODRIGUES, 2021).

Dentre os meios de obtenção de enzimas microbianas, a tecnologia de fermentação se mostrou útil na sua produção através do cultivo de microrganismos, de forma bem caracterizada e em grandes quantidades (GAETE, TEODORO e MARTINAZO, 2020). E isso é altamente encorajador, no sentido acadêmico e industrial, visto que, segundo dados BBC Research (2018), mediante a observação da tendência crescente do mercado mundial de catalisadores biológicos, é projetado para 2025 uma rentabilidade global de 7,48 bilhões de dólares.

Dentre os tipos de fermentação, destaca-se o cultivo de microrganismos por meio de Fermentação em Estado Sólido (FES). Considerada uma fermentação mais natural, por ter um processo semelhante às condições ambientais de crescimento desses organismos microscópicos. Autores como Raimbault (1980), Maheva (1984) e Lonsane et al. (1985), descreveram a técnica como um processo fermentativo realizado em substratos sólidos, cuja característica é a sua ocorrência na ausência de líquido na forma livre ou com níveis muito baixos de umidade. A umidade desses meios geralmente não ultrapassa 70%, o que acaba por limitar significativamente o número de microrganismos capazes de se adaptar a este processo (SANTOS et al., 2018). Vale ressaltar que, considerando que a fermentação pode ocorrer na presença ou ausência de oxigênio, esse processo pode ser aeróbio ou anaeróbio (BERENJAN e MAHDINIA, 2021).

A Fermentação em Estado Sólido (FES) apresenta diversas vantagens, relação a outros tipos de fermentação como:

- No geral, o meio é simples, constituído de produtos agrícolas não refinados, contendo a maioria dos nutrientes necessários para o crescimento do

microrganismo (BRAMORSKI, 1997);

- Maior facilidade no monitoramento de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas (EMATER, 2023);
- Uso de equipamentos mais simples e maior resistência a contaminações, devido ao menor uso de água (DORIYA et al., 2016);
- Fácil transporte gasoso, alta produtividade volumétrica com alta concentração de produtos, maior rendimento, possibilidade de uso de resíduos celulósicos, como os resíduos agroindustriais, menor necessidade de energia, menor produção de efluentes (MESHRAM et al., 2017; RAVINDRAN e JAISWAL, 2016; SRIVASTAVA et al., 2019 apud PERILLI et al., 2023).

Apesar das vantagens citadas, algumas limitações da FES devem ser consideradas. Para Bramorski (1997), Doriya (2016), Ravindran e Jaiswal (2016), Zhang, Wang e Chen, (2017) são elas:

- Maior dificuldade na padronização dos processos por causa do meio.
- Controle adequado de temperatura;
- A condutividade térmica do gás (fase móvel do método) é muito menor do que a da água;

De acordo com Sales (2023), outros pontos de atenção do processo remetem:

- A seleção de um substrato apropriado e com umidade suficiente para induzir a formação do bioproduto desejado;
- O tamanho de partícula também deve ser considerado, para que haja maior acessibilidade aos nutrientes ao passo que não propicie a compactação do material e consequentemente limitando o crescimento do microrganismo.

Alguns autores relatam na literatura, tipos de resíduos agroindustriais para produção de enzimas fibrinolíticas, destacando Nascimento et al., 2015 que utilizaram casca de maracujá, sabugo de milho, casca de mandioca, soja, semente de acerola, farelo de trigo e polpa cítrica. Dentre os citados, destacam-se o farelo de trigo, devido à ser um dos substratos mais empregados para o cultivo de microrganismos (SANTOS et al., 2018), e o sabugo de milho, devido a ser um dos três cereais mais cultivados do mundo, e pela colocação do Brasil de terceiro produtor e segundo exportador mundial (COELHO, 2021).

As enzimas representam exemplo de produtos de origem microbiana que podem ser obtidos a partir da FES. Dentre elas estão: as amilases, proteases, xilanases, celulasas e pectinases (SILVA e ANDRADE, 2016).

3.2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

O Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), da Esalq/USP, define o agronegócio como um setor econômico com ligações com a agropecuária, tanto a montante como a jusante. Sendo tido, de modo mais amplo, como uma porção de cadeias produtivas, em uma sequência organizada que, a partir de insumos, chega à produção de matérias primas agropecuárias, ao seu processamento e à distribuição, e demais serviços necessários para que os produtos agropecuários e agroindustriais cheguem ao consumidor final (BARROS, 2022; CASTRO, 2022).

Nos últimos 40 anos, o efeito transformador da revolução agrícola elevou o Brasil a novos patamares na conjectura mundial, abrindo um leque de possibilidades para o desenvolvimento do país. À vista disso, o setor se tornou protagonista do equilíbrio da balança comercial brasileira, batendo recordes de exportação ano após ano. Atualmente, o Brasil é considerado líder mundial nas exportações de: soja, açúcar, carne bovina e de frango, e suco de laranja (CNA, 2021; COMEX DO BRASIL, 2023).

A despeito das inúmeras vantagens econômicas que o agronegócio vem trazendo para a economia brasileira, aspectos negativos devem ser considerados, visto que, a agroindústria gera um elevado volume de carga poluidora e uma grande quantidade de resíduos (MAGALHÕES et al., 2019).

Sabe-se que 40 % da massa dos produtos agroindustriais são desperdiçados em etapas iniciais de seu processamento. Em razão disso, é observável a urgência e o crescente interesse em encontrar meios que mitiguem os impactos ambientais advindos das atividades, o que se traduz em tentativas de demonstrar inúmeras utilidades para os resíduos e agregar valor em produtos que seriam descartados (BOERIA et al., 2022).

Os resíduos agrícolas são, em sua maioria, de natureza lignocelulósica, sendo compostos de uma fração significativa de carboidratos. Por esse motivo, são caracteristicamente altamente nutritivos, facilitando o crescimento microbiano e seu emprego em bioprocessos. Tal traço, possibilita a aplicação dos resíduos agroindustriais na produção de diversos tipos de produtos, notabilizando biomoléculas de alta relevância na economia verde. Esses produtos do metabolismo microbiano são eco-amigáveis, possuem uma alta especificidade pelos substratos, melhor eficiência catalítica e um bom custo-benefício no ponto de vista biotecnológico e industrial (NNOLIM, OKOH e NWODO, 2020).

Apesar de não haver uma aplicação direta de resíduos como: bagaço de cana, espiga de milho e farelo de arroz; a sua reutilização como matéria prima para diferentes estratégias

de fermentação estão sendo bastantes estudadas, intentando a produção de biomoléculas (RAVINDRAN et al., 2018). Os resíduos agroindustriais citados são boas fontes de nutrientes, como carbono, se encontram facilmente disponíveis no cenário agrícola brasileiro e possuem elevada degradação biológica, os tornando adequados para Fermentação em Estado Sólido (FES). Além disso, outra consequencia relevante é a redução de custos de produção e impacto ambiental (NAIDU, SIDDIQUI e IDRIS, 2020; SADH, DUHAN e DUHAN, 2018).

3.3 CELULASES

Os resíduos agrícolas possuem majoritariamente natureza lignocelulósica, composta essencialmente por: celulose, hemicelulose e lignina; frações poliméricas unidos entre si por ligações covalentes, sendo muito importantes na indústria (DIAZ et al., 2018; ALENCAR et al., 2020).

Devido à complexidade e variação dos polímeros lignocelulose, a presença de várias enzimas são precisas para a sua hidrólise completa. Em concordância com sua atuação, tais enzimas podem ser divididas em três grupos: enzimas celulósicas (celulases), enzimas hemicelulósicas (hemicelulases) e enzimas ligninolíticas (lignases) (BARBIERI, 2022).

Sharma e Chunbao (2019), citaram alguns exemplos de enzimas de cada classe:

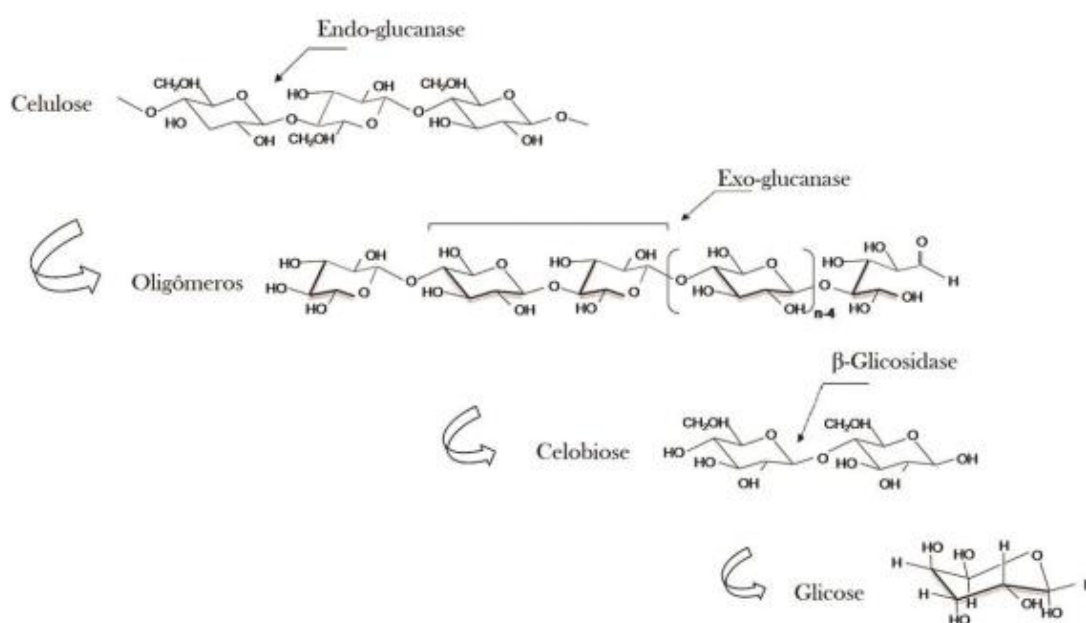
- Celulases:
 - Endoglucanase;
 - β -glicosidase;
 - Celobiohidrolase ou exoglucanase;
 - Glicosiltransferase;
- Hemicelulases:
 - Xilanases;
 - Manases;
 - Endoglucanases
 - β -xilosidases;
 - α -galactosidases;
 - Acetil esterase;
 - β -glucosidases;
- Lignases:
 - Lacases;

- Lignina peroxidase;
- Manganase peroxidase;
- Peroxidase versátil;
- Celobiose desidrogenase.

No que se refere as celulasas, elas são enzimas que compõem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise e é largamente utilizada em vários setores e processos industriais. As principais enzimas necessárias para a hidrólise da celulose são divididas de modo a depender da sua forma de atuação no processo: celobiohidrolases, exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidase. Os três últimos tipo são as maiores e atuam em uma associação cooperativa, produzindo substratos uma para a outra, pois, individualmente nenhuma enzima do complexo é capaz de hidrolisar a celulose de forma eficiente (Figura 3.1).

Quanto a produção das celulasas, ela ocorre por um grupo de bactérias, protozoários e fungos, descartado para o último grupo as espécies *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Além disso, são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, que são muito visados devido ao fácil controle do seu processo enzimático, da sua seletividade e por exigir condições amenas de pH e temperatura (OBENG et al., 2017 apud ÁVILA, 2022; ALBAN et al., 2018; SOUSA, 2014; DADWAL et al., 2021; ÁVILA, 2022; TIBOLLA, 2014; KALRA et al., 2020).

Figura 3.1 - Mecanismo de ação das celulasas sobre a cadeia de celulose.



Fonte: Yeoman et al. (2010)

3.4 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO

Nos últimos anos, houve um aumento na procura por procedimentos de purificação de biomoléculas, especialmente proteínas, que sejam altamente eficazes, rápidos e confiáveis, sobretudo na esfera da biotecnologia e dos bioprocessos. O setor industrial mostra um interesse crescente nessas tecnologias enzimáticas devido à sua aplicação como catalisadores em seus processos, abrangendo reações de síntese, hidrólise e interesterificação de lipídios. Alguns exemplos de métodos de purificação adotados pelas indústrias incluem a precipitação com sulfato de amônio ou solventes, como etanol e acetona, bem como a diálise e a ultrafiltração (MELO et al., 2021; RAZZAQ et al., 2019).

O processo de purificação de proteínas é desafiador devido à sensibilidade dessas moléculas a fatores externos, como temperatura e pH. Isso se torna ainda mais crítico quando se considera a demanda industrial por proteínas em diversas aplicações. O alto custo das técnicas tradicionais de purificação tornou necessária a busca por alternativas mais eficientes e econômicas. Portanto, o foco atual está no desenvolvimento de métodos de purificação que garantam a integridade das proteínas, mas também sejam viáveis em termos de custos (SANKARAN et al., 2019)

A indústria procura maneiras práticas, economicamente viáveis e eficazes de separar e purificar biomoléculas provenientes de subprodutos. Isso envolve a utilização de técnicas como a precipitação utilizando solventes orgânicos, como acetona e etanol, ou soluções salinas, como sulfato de amônio, juntamente com processos sucessivos de centrifugação e filtração, com o objetivo de aprimorar a pureza dessas biomoléculas.

Uma etapa inicial da recuperação de enzimas obtidas por fermentação semissólida é a lixiviação ou extração sólido-líquido do material fermentado. Esta etapa envolve a extração altamente seletiva de um componente solúvel contido em uma substância sólida, fazendo uso de um solvente (MESQUITA, 2020). Tal solvente pode ser: água, tampões, soluções salinas diluídas ou soluções aquosas de glicerol, de modo a obter-se, após a operação de separação do tipo sólido-líquido, um extrato enzimático bastante límpido. Alternativamente, a massa semissólida pode ser seca a baixas temperaturas, antes da extração. O material seco pode ser armazenado para posterior manipulação ou pode ser usado como uma preparação comercial bruta. O extrato bruto líquido pode ser concentrado a vácuo ou por ultrafiltração. O concentrado assim obtido pode ser vendido na forma líquida, após a adição de estabilizantes, como, por exemplo, glicerol ou tampões (CASTILHO, 1997).

Foi empregada a ESL (Extração Sólido-Líquido) a temperatura amena nos resíduos

de agrotóxicos vindos da polpa de cajá-manga. O solvente usado como extrator, foi a acetonitrila (6 mL) e o congelamento aconteceu na temperatura de - 4 °C por 90 minutos. Recuperações na ordem de 75 a 129% com limite de detecção entre 0,17 a 0,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ foram calculados para quatro pesticidas analisados. Foram verificadas como mais vantajosas em relação às metodologias normalmente usadas para extração de pesticidas em alimentos, o menor volume de solvente orgânico, menor tempo de congelamento e massa de amostra inferior a 75%. Ainda, mesmo a matriz estando com coloração intensa e alto teor de substâncias solúveis, não foi necessária etapa de clean-up (SANTANA et al. 2018).

Este método com uso de solvente ocorre quando os compostos solúveis do material sólido são extraídos por um solvente líquido que é seletivo a ele. No citado processo, o solvente adentra nos capilares do composto e o dissolve, ocasionando a produção de uma solução de concentração elevada. Pela difusão, ocorre uma modificação da concentração entre a solução do material extraído e a solução que rodeia as partículas (SAWADA, 2012).

A precipitação é uma das operações mais adotadas para a purificação de proteínas, tanto de origem microbiana como, animal ou vegetal. É uma das principais técnicas utilizadas para a separação de proteínas de uma mistura em virtude da sua simplicidade, sendo empregada há décadas. Tradicionalmente é considerada como um método de concentração e utilizada antes da aplicação de métodos de maior resolução na purificação (KILIKIAN e PESSOA JUNIOR, 2020.).

A precipitação de proteínas utilizando sais e solventes orgânicos tem como finalidade concentrar e eliminar contaminantes ou substâncias não desejadas. Em termos gerais, a capacidade de solubilização das enzimas está relacionada à distribuição de grupos ionizáveis, regiões hidrofóbicas e hidrofílicas na superfície da molécula. Esses elementos são responsáveis por interações com o solvente aquoso, interações iônicas com os sais e interações de repulsão eletrostática entre as moléculas. O gerenciamento desses elementos permite aprimorar o processo de separação e recuperação das enzimas (DAMODARAN et al., 2018).

No processo de precipitação por adição de sais, são utilizadas concentrações mais elevadas com o objetivo de modificar a solubilidade das enzimas, tornando assim o fracionamento e a separação mais eficazes. A escolha do sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ como agente de precipitação de proteínas é devido à sua alta solubilidade, custo acessível, baixa toxicidade e praticidade. É fundamental garantir que o sal não cause alterações na estrutura da molécula a ser purificada, uma vez que isso poderia resultar na redução parcial ou completa de sua atividade funcional (SANTOS, 2020; ISIK e SOYDAN, 2023.)

A utilização do sal sulfato de amônio na purificação parcial da enzima Exopoligalacturonase apresentou resultados elevados em uma concentração de 75% do ponto de saturação. Ainda neste estudo os autores demonstraram que o sobrenadante não possuía atividade, em seguida foi realizado a coleta dos pellets e dialisados como segunda etapa em água destilada para remoção dos sais (AMIN et al., 2023)

Portanto o método de precipitação com etanol é empregado com o propósito de eliminar impurezas solúveis em álcool, resultando na obtenção de uma forma purificada da enzima. A acetona, por sua vez, demonstra uma versatilidade ainda maior em procedimentos experimentais de purificação de proteínas, desempenhando funções como agente precipitante, solvente desengordurante e extrator de metabólitos de menor solubilidade. Entretanto, é relevante destacar que a utilização de solventes orgânicos pode acarretar em desvantagens, como o risco de desnaturação da biomolécula alvo e a necessidade de cuidadosa remoção do solvente após a precipitação. Portanto, é fundamental otimizar criteriosamente a escolha do solvente e as condições de precipitação para assegurar a eficácia do processo e a manutenção da integridade da biomolécula alvo (MELO et al., 2021).

A utilização de etanol a 95% (v/v) como etapa preliminar de purificação mostrou resultados otimistas onde essas enzimas obtidas do *B.gladioli* Bps-1 passaram por uma segunda etapa onde foram suspendidas em tampão de piperazina e posteriormente purificadas por cromatografia tiveram um fator de purificação (Fp) de 4,57 (ZHU et al., 2019).

Com a busca pela utilização de enzimas no setor industrial tem se destacado estudo na procura de técnicas mais baratas e confiáveis seguindo na linha de purificação e caracterização destas biomoléculas (ABDULAAL e ALMULAIKY, 2020; NAWAY et al., 2021).

3.5 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Fatores como temperatura e pH são eficientes em controlar a atividade de uma enzima e podem ser ajustados a fim de aumentar ou diminuir a velocidade de uma reação.

O aumento da temperatura está diretamente relacionado ao aumento na taxa de reação, chegando eventualmente a um ponto conhecido como temperatura ideal ou ótima, no qual a atividade enzimática atinge seu máximo desempenho. No entanto, à medida que a reação de interesse continua, a velocidade da reação tende a diminuir, e a molécula passa por desnaturação ou inativação térmica. Essa transformação ocorre devido a modificações na conformação da estrutura enzimática em temperaturas mais elevadas, o que afeta a interação

entre a enzima e o substrato, tornando-a incapaz de realizar sua função catalítica (LUO et al., 2023; MIGUEL-RUANO et al., 2021).

As enzimas, em sua maioria, possuem um pH ótimo, no qual sua atividade é máxima e, assim como ocorre com a temperatura, conforme o pH se afasta deste valor a velocidade da reação diminui. O pH interfere tanto no estado de ionização da enzima como na velocidade de reação, pois, as enzimas possuem grupos químicos ionizáveis nas cadeias laterais de seus aminoácidos e, conforme muda o pH do meio, estes grupos podem possuir carga elétrica negativa, positiva ou neutra e ainda contribuir na manutenção da estrutura da molécula ou fazer parte do sítio ativo dela. Portanto, deve-se determinar as condições de temperatura e pH nas quais as enzimas devem ser ativadas para sua utilização em processos industriais.

3.6 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Os sistemas aquosos bifásicos (SABS) são uma técnica que consiste na separação de substâncias de interesse como proteínas e outras, utilizando dois polímeros ou um polímero mais um sal. Ocorrendo a formação de duas fases imiscíveis que atua no fracionamento de proteínas em uma das fases a depender dos componentes utilizados no sistema (BALOCH et al., 2023).

A extração líquido-líquido utilizando SABS é amplamente empregado na indústria em diversas áreas pois apresenta um baixo custo e um caráter amigável com o meio ambiente, diferentes de outras técnicas de extração que liberam gases poluidores, solventes prejudiciais à saúde, entre outros. Na extração de molibdênio essa técnica tem a capacidade de formar duas fases cada uma rica em um componente de forma seletiva, após atingir o equilíbrio (MURUCHI, LUNARIO e JIMENEZ, 2019).

A separação das fases ocorre acima das concentrações termodinâmicas críticas desses componentes. Quando essas concentrações excedem determinado valor, há a formação das duas fases aquosas, formando um meio capaz de manter a atividade biológica de macromoléculas, para posterior partição (KILIKIAN e PESSOA JUNIOR, 2020.).

A composição química das duas fases se encontra em equilíbrio termodinâmico, e para garantir que o sistema seja formado, é necessário ter conhecimento da concentração global destes reagentes no sistema (GONTIJO et al., 2017).

Devido as vantagens, como simplicidade operacional, separação rápida e seletiva, facilidade de escalonamento, transferência de massa eficiente e a possibilidade de alcançar níveis de rendimento e pureza considerados, a extração por meio de sistemas aquosos

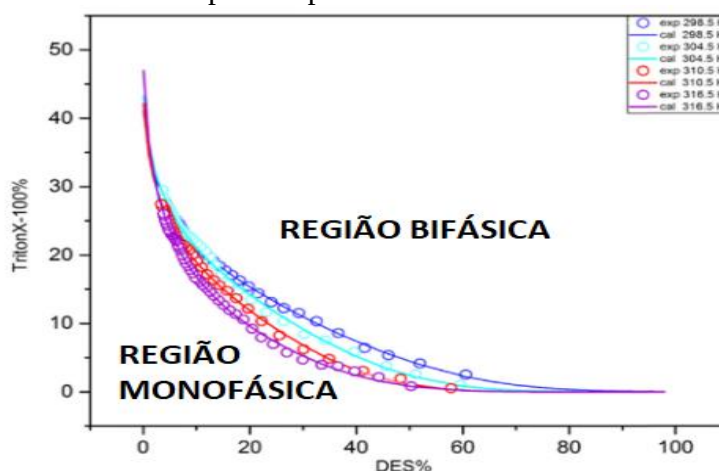
bifásicos vem ganhando espaço na obtenção de biomoléculas (LAFETÁ JUNIOR et al., 2022).

Esses sistemas dependem de fatores como, resistência à deformação, viscosidade, permeabilidade interfacial e tensões interfaciais, que contribuem no processo de separação das fases. Na tentativa de determinar as melhores condições de trabalho muitos trabalham visam identificar as condições de formulação (SILVA et al., 2020).

Os diagramas de fases são representações gráficas que ilustram a relação entre a concentração de um polímero com um sal ou um segundo polímero em solução. Eles incluem as chamadas "linhas de amarração," que estabelecem conexões entre dois pontos que correspondem às concentrações das fases completamente segregadas. Além disso, esses diagramas contêm a curva binodal, que define os limites do sistema multifásico. Quando as concentrações de polímeros se encontram abaixo dessa curva, ocorre a miscibilidade entre eles. Os diagramas de fases são uma ferramenta valiosa para analisar como a temperatura e o peso molecular do polímero afetam a composição das fases aquosas nas emulsões. Por exemplo, em situações envolvendo polímeros de maior peso molecular, as curvas binodais tendem a deslocar-se para concentrações mais baixas desses polímeros. Essas representações gráficas fornecem informações essenciais para determinar as condições requeridas e criar emulsões a partir de polímeros específicos, levando em consideração suas concentrações (DUMAS et al., 2020, JIMÉNEZ et al., 2020).

Na Figura 3.2, pode-se observar um diagrama de fases onde é possível determinar características do equilíbrio formado por SAB.

Figura 3.2 - Diagrama de fases esquemático de um Sistema Aquoso Bifásico (SAB) formado por um polímero e um sal.



Fonte: Adaptado de Teymoornejad e Jabbari (2023)

No diagrama em questão, uma variedade de informações está disponível, todas relacionadas à redução da energia livre do sistema. Por exemplo, é possível identificar as composições globais em que o sistema existe como uma única fase ou como duas fases distintas. Essas duas regiões são delimitadas por uma linha conhecida como curva binodal (SILVA et al., 2020).

As curvas binodais são representações das concentrações mínimas encontradas em sistemas aquosos bifásicos (SABs). Quando as concentrações de polímeros e sais excedem essas curvas, torna-se fundamental poder prever tanto o volume quanto a composição das fases resultantes da separação líquido-líquido nos SABs, além de calcular a tensão interfacial entre essas fases. Essas propriedades para cada fase e a tensão interfacial podem ser obtidas por meio de linhas de ligação que unem pontos específicos ao longo da curva binodal (KOJIMA et al., 2019).

Qualquer conjunto de pontos que pertençam à região bifásica e que estejam sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores, que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc.). Aplica-se o mesmo raciocínio para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre uma mesma linha de amarração (SILVA e LOH, 2006).

O particionamento de biomoléculas entre as fases depende principalmente das relações de equilíbrio do sistema. O coeficiente de partição é definido como (Equação 3.1):

$$K = \frac{[Ct]}{[Cb]} \quad (3.1)$$

Na Equação 3.1, $[Ct]$ representa a concentração do soluto na fase superior, enquanto $[Cb]$ corresponde à concentração na fase inferior. O valor do coeficiente de distribuição, denotado como K , é influenciado por várias variáveis experimentais, incluindo pH, temperatura, presença de sais, peso molecular e concentração do polímero, bem como hidrofobicidade e tamanho da proteína, entre outras. Ao controlar cuidadosamente essas variáveis, é viável direcionar uma proteína presente em uma mistura complexa para uma das fases, ao passo que as proteínas indesejadas permanecem na fase oposta (GANDOLFI et al., 2020).

A avaliação do desempenho ou eficácia de qualquer método de purificação de proteínas envolve a consideração de dois parâmetros fundamentais: a recuperação e o fator de purificação da proteína ou atividade enzimática. Esses valores são determinados em relação à

solução inicial, estabelecendo uma relação entre a concentração do material purificado e a concentração do material inicial, ou em qualquer etapa intermediária do processo, sempre tomando como referência uma etapa anterior (WESSNER et al., 2021)).

A recuperação da atividade (*RA*) é calculada como a proporção entre a atividade total presente no material purificado e a atividade total inicial no material bruto, expressa em forma percentual pela Equação 3.2. O fator de purificação (*FP*) é um parâmetro que permite comparar a atividade enzimática específica total no material purificado com a atividade enzimática específica total no material bruto, conforme a Equação 3.3 (SHAHBAZMOHAMMADI, SARDARI e OMIDINIA, 2019).

$$R = \frac{\text{Atividade enzimática recuperada}}{\text{Atividade enzimática inicial}} \quad (3.2)$$

$$FP = \frac{\text{Atividade enzimática específica recuperada}}{\text{Atividade enzimática específica inicial}} \quad (3.3)$$

A indústria enfrenta desafios significativos na obtenção de biomoléculas, devido à complexidade dessas substâncias, o que resulta em custos elevados nos processos de extração e purificação. Como resposta a essa dificuldade, têm sido desenvolvidas técnicas mais acessíveis, como os sistemas aquosos bifásicos, que oferecem uma abordagem eficaz e economicamente vantajosa para a extração de biomoléculas. Essa inovação desempenha um papel fundamental em tornar o processo industrial mais viável em termos de custos (REIS e SANTOS, 2023).

Estudos voltados a indústria farmacêutica revelam a utilização de PEG600 e carbonato de sódio na remoção de cinco ácidos fenólicos de frutas de forma simultânea, como banana, uva, maçã, entre outras onde tais rendimentos chegaram a 84,30% à 100% (MUMCUHTTPS e BOZKURTHTPS, 2021).

O modelo mais utilizado na simulação do comportamento de misturas envolvendo SAB é o chamado modelo de coeficiente de atividade. Esses modelos normalmente respondem por três contribuições: interações de curto alcance (NRTL, NRTL estendido, Wilson, UNIFAC, UNIQUAC), de longo alcance (Debye-Huckel, Pitzer-Debye-Huckel) e interação combinatória (Florey-Hagin s). No entanto, vários problemas são encontrados na aplicação dos modelos, sendo o primeiro que um grande número de parâmetros de ajuste a serem utilizados (12 ou mais parâmetros podem ser facilmente alcançados em modelos como

o NRTL). Além disso, até o momento, os modelos de coeficiente de atividade usados para modelar SABs não consideram as interações associativas, que são críticas para a modelagem de soluções aquosas. Outra grande desvantagem de alguns dos modelos de coeficiente de atividade descritos acima é que os parâmetros usados para modelagem muitas vezes não são diretamente transferíveis para outros sistemas, reduzindo as capacidades preditivas desses modelos de coeficiente de atividade (BONIFÁCIO, 2020).

Outro estudo investigou o desempenho da enzima papaína em um sistema bifásico aquoso (ATPS) composto por polietilenoglicol (PEG) de 6000 g/mol e sulfato de sódio. Os resultados indicaram que a configuração mais eficaz do ATPS consistia em 10% de PEG 6000 e 18% de Na_2SO_4 num pH 9, o que resultou em uma alta atividade enzimática ($K-e$) de 1,43. Consequentemente, houve um notável aumento na pureza da enzima, aproximadamente 4,08 vezes (PF), com um rendimento de 26,38% (SINGLA e SIT, 2023).

No contexto apresentado, a investigação de métodos para a concentração e recuperação de enzimas emerge como uma demanda científica imprescindível. Tal necessidade se fundamenta na urgência de mitigar os custos associados a uma fase produtiva dispendiosa, com o intuito de obter um produto de aplicabilidade ampla. Estes produtos, essenciais em setores variados, como a indústria alimentícia, farmacêutica e química, desempenha um papel vital como catalisador em diversas reações.

4 METODOLOGIA

O projeto de pesquisa foi desenvolvido nos laboratórios pertencentes ao Departamento de Engenharia Química da UFPB, tais como o LPFD (Laboratório de Produtos Fermento-Destilados e o LaBio (Laboratório de Bioengenharia), que continham os equipamentos e reagentes necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Inicialmente, foi obtido o extrato bruto nas melhores condições indicadas por Santos (2021) em dissertação desenvolvida no grupo de pesquisa. A partir da obtenção do extrato, foram estudadas técnicas de concentração e purificação, como precipitação e partição em SABS. Leituras da atividade enzimática em cada etapa do processo serviu para acompanhar o rendimento de cada passo e realizar o cálculo de outros parâmetros. A caracterização enzimática apontou as condições ideais para ativar ou preservar as enzimas obtidas, além de estabelecer limites nos parâmetros do processo para evitar a desnaturação.

4.1 MICRORGANISMO E INÓCULO

O microrganismo utilizado nesse trabalho foi o *Penicillium* sp. FSDE15, isolado por Carvalho-Gonçalves (2017) e selecionado como produtor de celulasas. Foi mantido no LaBio em meio ágar-batata-dextrose (BDA), sob refrigeração e foi utilizado em estudos recentes sobre produção de enzimas por fermentação em estado sólido.

Para o preparo do inóculo foi realizado o repique do fungo já cultivado em placas de Petri contendo o meio ágar-batata-dextrose e incubadas a temperatura ambiente de 25 °C durante uma semana (sete dias). Após o desenvolvimento do fungo *Penicillium* sp. FSDE15, foi realizada a suspensão dos esporos, utilizando água-destillada esterilizada. Após obtenção, a suspensão foi acondicionada em tubos estéreis. A quantificação dos esporos ocorreu por meio de contagem em câmara de Neubauer espelhada, utilizando o microscópio.

Para se obter a concentração de 10^6 esporos por grama de substrato sólido, foram utilizadas as Equações 4.1 e 4.2 que determinou o volume de inóculo a ser utilizado no meio de fermentação (CARDOSO, SANTOS e SANTOS, 2019).

$$\text{Concentração (esporo/ml)} = \Sigma \times 10^4 \times \text{fator de diluição} / 5 \quad (4.1)$$

Σ : número de esporos na câmara de Neubauer (quatro extremidades e o centro)

$$Volume\,in\,o\,culo(mL) = \frac{concentração(esporo/grama) \times massadomeio(g)}{concentração} \quad (4.2)$$

4.2 SUBSTRATO

Foi utilizado uma combinação de dois resíduos agroindustriais, composto por farelo de trigo e sabugo de milho, ambos foram utilizados nas composições de 50% e armazenados em recipientes estéreis a temperatura ambiente 25 °C (SANTOS, 2021).

Os substratos foram adquiridos no mercado central da cidade de João Pessoa, onde foi comprado o milho e debulhado, a espiga utilizada foi deixada ao sol por 3 dias para secar e assim triturada utilizando um moinho. O trigo foi comprado já como farelo e utilizado.

4.3 CULTIVO

As proporções utilizadas para o substrato foram 50% sabugo de milho e 50% farelo de trigo, com as características em 100 gramas de meio: 60% de umidade, temperatura ambiente (30 °C) e concentração dos esporos a 10^6 por grama de substrato. Os ensaios foram realizados em triplicatas (SANTOS, 2021).

Como fonte de nitrogênio e umedecimento do substrato foi utilizado uma solução a 1% de sulfato de amônia (m/m_{H_2O}) (CARDOSO, SANTOS e SANTOS, 2019). A quantidade de água necessária para umedecer os resíduos foi calculada pela Equação 4.3:

$$m_{H_2O} = \frac{massadoresíduo \times (umidadeideal - umidadedoresíduo)}{1 - umidadeideal} \quad (4.3)$$

Após umedecer os resíduos com a solução de sulfato de amônia, estes foram transferidos para um Erlenmeyer de 1000 mL de capacidade, onde foi autoclavado por 15 min a 121 °C. Após o procedimento, permaneceu à temperatura ambiente (25 °C) até alcançar a temperatura necessária para o processo.

Então ocorreu a inoculação dos esporos em suspensão, com volume já determinado para a obtenção da concentração de 10^6 esporos por grama de substrato sólido. O cultivo durou 10 dias (SANTOS, 2021).

4.4 EXTRATO BRUTO

O extrato bruto foi obtido por meio da técnica empregada por Santos (2021). Foram adicionados 15 mL de tampão citrato de sódio para cada 1 g de substrato (amostra). Após homogeneização e repouso de 30 min em temperatura de 30° C, as amostras foram filtradas, usando papel de filtro qualitativo. O extrato enzimático foi estocado em recipientes plásticos e congelado (-20 °C) para posterior análise de atividade de CMCase (endoglicanase), FPase (celulase total), e ensaios de estabilidade, recuperação e concentração.

4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a análise da atividade enzimática, os extratos obtidos foram descongelados, até temperatura ambiente. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

A atividade CMCase foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987). O método se baseia na dosagem da concentração de *reducing sugars* (AR) liberados durante a degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC).

O valor da atividade enzimática CMCase pôde então, ser calculado através da Equação 4.4:

$$\text{CMCase (U/g)} = \frac{(A - B) \times f \times r \times k}{x \times y \times z} \quad (4.4)$$

Onde:

A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra;

f = Fator de conversão da curva de calibração (mg/ml);

r = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (ml/g).

k = Volume total do meio de reação (ml);

x = Fator de conversão de mg para μmol de glicose;

y = Tempo de reação (min);

z = Volume da enzima no meio de reação (ml).

A quantificação da atividade enzimática FPase (celulase total) foi realizada utilizando papel de filtro qualitativo como substrato de acordo com metodologia adaptada de (GHOSE, 1987).

O valor da atividade enzimática FPase foi calculada por meio da Equação 4.5:

$$\text{FPase (U/g)} = \frac{(A - B) \times f \times r \times k}{x \times y \times z} \quad (4.5)$$

Onde:

A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra;

f = Fator de conversão da curva de calibração (mg/ml);

r = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (ml/g).

k = Volume total do meio de reação (ml);

x = Fator de conversão de mg para μmol de glicose;

y = Tempo de reação (min);

z = Volume da enzima no meio de reação (ml).

O valor da atividade enzimática AVICELase foi calculada por meio da Equação 4.6, sua determinação da atividade enzimática (celulase microcristalina) foi realizada utilizando o sal de celulase microcristalina parcialmente dissolvido em tampão citrato, como substrato de acordo com metodologia adaptada de (GHOSE, 1987).

$$\text{AVICELase (U/g)} = \frac{(A - B) \times f \times r \times k}{x \times y \times z} \quad (4.6)$$

Onde:

A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra;

f = Fator de conversão da curva de calibração (mg/ml);

r = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (ml/g).

k = Volume total do meio de reação (ml);

x = Fator de conversão de mg para μmol de glicose;

y = Tempo de reação (min);

z = Volume da enzima no meio de reação (ml).

4.6 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

4.6.1 Ensaios de temperatura ótima e estabilidade

Os ensaios de temperatura ótima e termoestabilidade foram baseadas na metodologia utilizada por Akcapinar et al. (2012). Para o estudo de temperatura ótima, o extrato enzimático foi incubado nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C, sendo em seguida, determinada a atividade de CMCase e FPase. Nos ensaios de termoestabilidade, o extrato enzimático foi incubado nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C, por 2 horas e uma amostra foi retirada a cada 15 min, em pH 4,8 e analisada quanto a atividade de CMCases, FPases e AVICELases.

4.6.2 Ensaios de pH ótimo e estabilidade

Os ensaios de pH ótimo foram realizados fixando-se a temperatura no valor ótimo do item anterior e variando-se o pH. Os valores de pH testados foram obtidos por meio de misturas dos tampões (citrato de sódio e fosfato de sódio monobásico e dibásico 50×10^{-3} mol.L⁻¹) para alcançar valores de 3, 4, 5 e 6 (AKCAPINAR, 2012).

Quando da realização do estudo da estabilidade ao pH, foi utilizado amostras de 20 mL de extrato enzimático, obtidos com a solução tampão citrato 0,05 Mol.L⁻¹ pH 4,8, realizando a adição de volumes de HCL ou NaOH 1M cada, com objetivo de alcançar os valores de pH 3, 4, 5 e 6. Para valores de pH 7 e 8, foram adicionados a 10 mL de extrato enzimático ao volume de 20 mL do tampão fosfato 0,1 Mol.L⁻¹, realizando adição de NaOH para alcançar os pH 7 e 8. Permanecendo, as amostras, por 24 horas, na temperatura ambiente. Por fim, o pH das amostras foi corrigido para 4,8 e realizou-se as análises CMCase, Fpase e AVICELase, para a atividade celulolítica (GHOSE, 1987). Os resultados foram expressos em termos da atividade residual (%).

4.7 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

Uma vez obtido e caracterizado o extrato enzimático, foi centrifugado a 3600 rpm, por 5 minutos na temperatura 4°C, em seguida foi realizado, análise da concentração e purificação parcial das enzimas celulasas presentes. O estudo foi realizado em duas etapas. Inicialmente, foram testadas técnicas clássicas de precipitação de proteínas, tais como

precipitação por adição de solvente e adição de sal, conforme sugere (SOUSA, 2014). As suspensões obtidas foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos à temperatura de 4°C. O precipitado foi recolhido e ressuspendido em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8. Posteriormente, foram feitas leituras de atividade de CMCCase, FPase e AVICELase e proteínas no sobrenadante, para avaliar os processos de precipitação quanto ao rendimento, atividade específica e fator de purificação.

4.7.1 Precipitação com solventes orgânicos.

Como agente precipitante, foi utilizado o etanol 99°GL, conforme a metodologia empregada por Sousa (2014). O etanol foi previamente aclimatado em freezer (entre 15 e -25°C). Os testes foram realizados com 50 mL do extrato enzimático e foram conduzidos em banho de gelo.

O solvente foi acrescentado lentamente ao extrato enzimático sob leve agitação. As proporções de solvente testadas foram de 1:1; 1:2 e 1:3 (mL/mL). As amostras foram mantidas em geladeira (5 °C), em seguida, os tubos foram centrifugados ainda frios, (com temperatura de aproximadamente 5°C) a 3500 rpm por 15 min. Os precipitados resultantes foram lavados com água destilada, deixados à temperatura ambiente até evaporação do solvente (constatada pela ausência do odor de álcool nos precipitados) e ressuspendidos com tampão citrato 0,05M de pH 4,8.

Em seguida, a atividade de CMCCase, FPase e AVICELase foi determinada e comparada com aquela que o extrato bruto apresentava, em triplicata.

4.7.2 Precipitação com sulfato de amônio.

Inicialmente, foram adicionadas a 50 mL de extrato bruto quantidades de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) que resultem em soluções com 20, 50 e 80 % (massa/volume) da concentração de saturação do sal. A adição foi feita com agitação branda, em banho de gelo, até complete solubilização do sal. As amostras foram mantidas em geladeira (5 °C) por 12 horas, sendo em seguida, centrifugadas a 3500 rpm a cerca de 5 °C por 15 min. Após lavagem com água destilada, o precipitado foi ressuspendido em tampão citrato de sódio (pH 4,8). A atividade CMCCase, FPase e AVICELase foi determinada e comparada com a contida no extrato bruto (SOUSA, 2014).

4.8 ENSAIOS DE PARTIÇÃO EM SABS

Com o objetivo de obter extratos com índices maiores de atividade específica e purificação, o sobrenadante ou o extrato bruto foi utilizado na formação de sistemas aquosos bifásicos constituídos por polietilenoglicol e citrato de sódio para ensaios de concentração e purificação. Na construção dos SABS foram utilizadas as condições apontadas na literatura como adequadas à recuperação de celulasas (SOUSA, 2014), porém buscando-se uma otimização em relação a temperatura de operação e composição.

As fases dos SABS foram recolhidas e caracterizadas quanto a atividade de CMCase e proteínas solúveis, que serviram para calcular o rendimento, coeficiente de partição, recuperação e fator de purificação. De posse destes parâmetros, foram eleitas as condições mais adequadas para recuperação das celulasas com máximo rendimento (FARINAS et al., 2011).

Os sistemas foram construídos inicialmente com polietilenoglicol de massa molar 4000, em concentração de 20,5% e tampão citrato de sódio pH 5,0 com composição de 14,5%, adaptados das condições apontadas por Sousa (2014) como adequadas para a recuperação de celulasas produzidas por *Trichoderma reesei*.

4.8.1 Avaliação do SABS por planejamento fatorial

Foi realizado os ensaios de acordo com um planejamento experimental fatorial completo 2^2 , conformação estrela utilizando 3 repetições no ponto central, estudou-se a influência da concentração do sal e do polímero, na recuperação e partição de celulasas. Obtido através do extrato. No mais, a matriz do planejamento está na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Matriz de planejamento fatorial 2^2 + conformação estrela + 3 pc. para o SABS
continua

Ensaio	C PEG (%)	C Citrato (%)
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	$-\alpha$	0
6	$+\alpha$	0

Tabela 4.1 – Matriz de planejamento fatorial 2^2 + conformação estrela + 3 pc. para o SABs conclusão

Ensaio	C PEG (%)	C Citrato (%)
7	0	$-\alpha$
8	0	$+\alpha$
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Os valores reais adotados nos sistemas aquosos bifásicos testados encontram-se na Tabela 4.2, foi adaptado utilizado níveis baseados na literatura onde afirma-se ser a melhor combinação para extração de enzimas celulasas por Souza (2014).

Tabela 4.2 – Valores decodificados dos níveis utilizados

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentração de PEG	19,8786%	20,5%	22%	23,5%	24,1213%
Concentração de Citrato	13,2573%	14,5%	17,5%	20,5%	21,7426%

4.9 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO

Os coeficientes de partição foram determinados segundo Prodanović e Antov (2008). Sendo o Coeficiente de partição (K) definido como a concentração de proteína (Kp) ou atividade enzimática (Ke), na fase superior dividida pelo valor correspondente na fase inferior, como exibido nas Equações 4.7 e 4.8, a seguir:

$$Kp = \frac{Ct}{Cb} \quad (4.7)$$

$$Ke = \frac{At}{Ab} \quad (4.8)$$

Onde Ct e Cb são as concentrações de proteína total em mg/mL nas fases superior e inferior, respectivamente, e At e Ab são as atividades enzimáticas nas fases superior e inferior, respectivamente.

Para melhor avaliação do processo de recuperação das celulasas nos SABs foi necessário o cálculo de outros parâmetros além dos coeficientes de partição. Portanto, foi

calculada a atividade enzimática específica (*AS*), expressa em U/mg; o fator de purificação (*FP*) e a recuperação de enzimas na fase superior (*RT*) e na fase inferior (*RB*). A Equação (4.10) demonstra como foi calculada a atividade específica de cada fase.

$$AS_{fase} = \frac{Afase}{C_{fase}} \quad (4.10)$$

O fator de purificação da atividade enzimática em cada uma das fases ou etapas foi calculada de acordo com a Equação 4.11:

$$FP_{fase} = \frac{Afase \text{ (Superior)}}{Afase \text{ (Inferior)}} \quad (4.11)$$

A recuperação de atividade enzimática nas fases superior e inferior dos SABs foram obtidas através das Equações: (4.12) e (4.13).

$$Rt(\%) = 100 / \left(1 + \left(\frac{Vb}{Vt} \times \frac{1}{Ke} \right) \right) \quad (4.12)$$

$$Rb(\%) = 100 / (1 + (Ke \times Vt/Vb)) \quad (4.13)$$

Onde, *Ke* é o coeficiente da atividade enzimática, *Vt* volume da fase de topo ou superior e *Vb* volume da fase de baixo ou inferior.

4.10 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA NOS SISTEMAS DE CONCENTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO.

4.10.1 Ensaios de atividade enzimática.

Os ensaios de atividade, foi determinada a atividade de CMCase conforme descrito na seção 4.5.

4.10.2 Ensaios de proteína.

A determinação do teor de proteínas no extrato, nos precipitados ressuspendido e nas fases dos SABs foi realizada pelo método de Bradford de forma adaptada (BRADFORD, 1976); utilizando-se albumina da clara de ovo como padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

5.1.1 Temperatura ótima

Após a realização do cultivo foi iniciado os testes para determinar as melhores condições de temperatura para atividade de cada enzima. Nas Tabelas 5.1 a 5.3 contém os valores obtidos para CMCase, FPase e AVICELase, respectivamente, nas temperaturas de 40 a 90 °C. O valor da atividade residual foi adquirido adotando a maior atividade obtida sendo 100% e assim realizando a proporção das demais.

Tabela 5.1 – Atividade CMCase em diferentes faixas de temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade CMCase (U/g)	Desvio (U/g)	Atividade Residual (%)
40	2,31	± 0,11	75,83
50	3,04	± 0,03	100,00
60	2,46	± 0,05	80,70
70	2,05	± 0,27	67,18
80	2,06	± 0,08	67,63
90	1,42	± 0,15	46,62

A temperatura ótima, obtida com a máxima atividade, foi de 50°C, logo sendo adotada como 100% da atividade residual, nas demais faixas pode-se observar que há uma queda com o aumento desta temperatura, embora a enzima permaneça com uma atividade residual de 46,62 % na temperatura de 90 °C, após trinta minutos de incubação. Loc, Van e Quang (2020), relatam a temperatura ótima da atividade CMCase produzida pelo *Trichoderma asperellum*, como sendo 55 °C, o que favorece os valores encontrados, uma vez que acima de 70 °C a atividade começa a cair.

A Tabela 5.2 mostra a atividade FPase, que trata da atividade enzimática obtida sobre a capacidade da enzima degradar celulose amorfa em glicose.

Tabela 5.2 – Atividade FPase em diferentes faixas de temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade FPase (U/g)	Desvio (U/g)	Atividade Residual (%)
40	0,84	± 0,08	96,53
50	0,87	± 0,06	100,00
60	0,53	± 0,06	61,20
70	0,53	± 0,06	60,57
80	0,40	± 0,07	45,43
90	0,21	± 0,02	23,97

A atividade adotada como 100 %, novamente, foi a temperatura de 50 °C, que obteve um valor de 0,87 U/g. é notório um decaimento de 76,03 % da atividade até a temperatura de 90 °C chegando a quase 24% da atividade restante. Este mesmo comportamento é relatado por Parveem, Bishet e Tewari (2020), onde obtiveram 100 % da atividade residual em 50 °C, utilizando *Aspergillus terreus* Ppcf.

A tabela 5.3 evidencia uma leve alteração no padrão da temperatura ótima da atividade AVICELase.

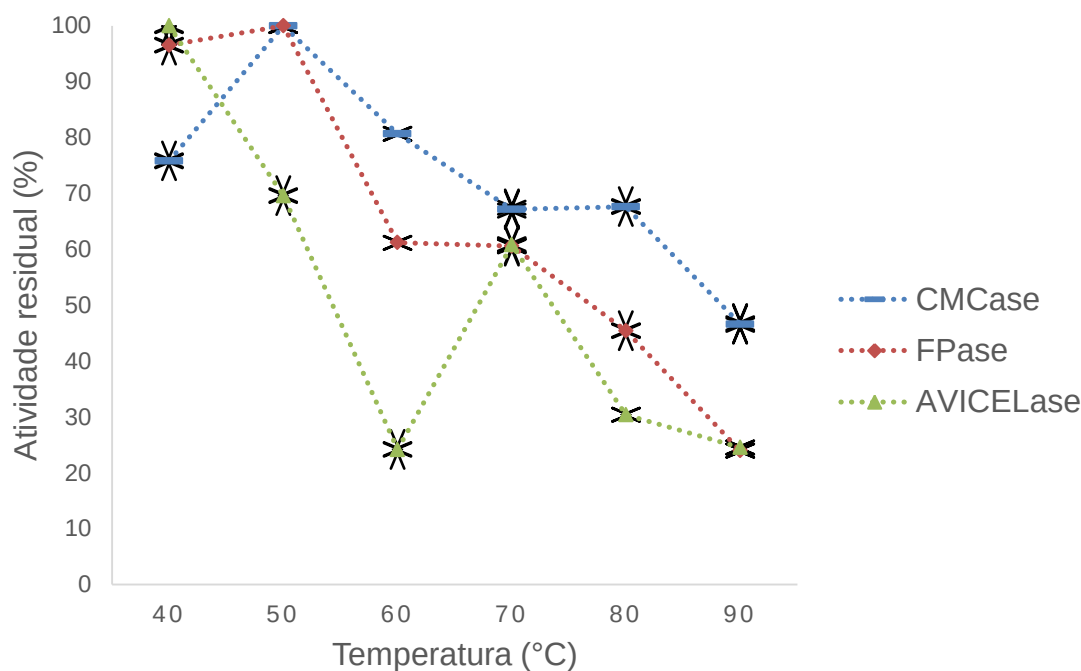
Tabela 5.3 – Atividade AVICELase em diferentes faixas de temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade AVICELase (U/g)	Desvio (U/g)	Atividade Residual (%)
40	0,75	± 0,09	100,00
50	0,52	± 0,08	69,60
60	0,18	± 0,06	24,18
70	0,46	± 0,12	60,81
80	0,23	± 0,02	30,40
90	0,18	± 0,02	24,54

Para a atividade AVICELase, que é responsável por degradar a celulose micro cristalina, Salazar et al. (2020) relataram que a temperatura ótima para AVICELase produzida à partir do *Penicillium* sp. é 30 °C, o que condiz com o seu trabalho pois a menor temperatura estudada foi de 40 °C obtendo-se a atividade máxima. Já com o aumento da temperatura ocorreu um decaimento da atividade chegando a 24,54 % em 90 °C, acreditando-se ser fruto da desnaturação a altas temperaturas.

A Figura 5.1 apresenta o comportamento das enzimas em estudo diante da alteração de temperatura.

Figura 5.1 – Efeito da temperatura na atividade enzimática.



É possível observar uma atividade enzimática máxima na temperatura de 50 °C para as enzimas CMC e FPase, entretanto para a terceira atividade AVICELase tem-se a temperatura 40 °C como a temperatura ótima. Narra et al. (2014) relataram que a temperatura ótima encontrada em seu estudo na produção de endoglucanases a partir no *Aspergillus terreus* foi de 50 °C, igualmente como, Cysneiros et al. (2013) encontraram a temperatura ótima de 50°C no seu estudo, que tinha como objetivo a caracterização de enzimas na digestão da forragem de milho, utilizando o fungo *Humicola grisea* var.

O intervalo ótimo da temperatura encontrado foi de 40 °C a 50 °C, após esses valores observou-se um decaimento das atividades celulolíticas chegando até 46 % para CMC e 24 % para as atividades FPase e AVICELase. Saroj et al. (2022) demonstraram valores que vão de acordo com o exposto na Figura -5.1, a temperatura ótima encontrada para a enzima CMCase está dentro da faixa térmica de 46 °C a 62 °C alcançada pelo *Aspergillus terreus*.

5.1.2 Valor de pH ótimo

A atividade enzimática em função da atividade residual é demonstrada nas tabelas 5.4 a 5.6, que ilustram os valores obtidos da atividade enzimática, por valores de pH que

variam de 3 a 6.

Tabela 5.4 – Atividade CMCase em diferentes faixas de pH.

pH	Atividade CMCase (U/g)	Desvio (U/g)	Atividade Residual (%)
3	3,59	$\pm 0,02$	100,00
4	3,38	$\pm 0,05$	94,04
5	3,04	$\pm 0,03$	84,79
6	1,18	$\pm 0,08$	32,87

Os valores de atividade encontrados apresentam os valores máximos em faixas de pH mais ácidos como de 3 a 5. Já com valor de pH mais próximo do neutro, 6, observa-se um decaimento significativo da atividade no complexo enzimático produzido pelo fungo. Tal característica se repete para a atividade FPase exposta na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Atividade FPase em diferentes faixas de pH.

pH	Atividade FPase (U/g)	Desvio (U/g)	Atividade Residual (%)
3	1,23	$\pm 0,06$	100,00
4	0,97	$\pm 0,10$	79,19
5	0,87	$\pm 0,06$	70,92
6	0,32	$\pm 0,02$	25,73

Com a mesma característica a atividade demonstrada na Tabela 5.5 concorda com a atividade CMCase vista na Tab. 5.4, ambas tendo um máximo de atividade no pH 3 e um declínio significativo quando comparados ao pH 6, demonstrando uma possível desativação enzimática em ambos os casos. Já na Tabela 5.6 pode-se observar uma pequena alteração demonstrada no padrão da atividade encontrada nas enzimas.

Tabela 5.6 – Atividade AVICELase em diferentes faixas de pH.

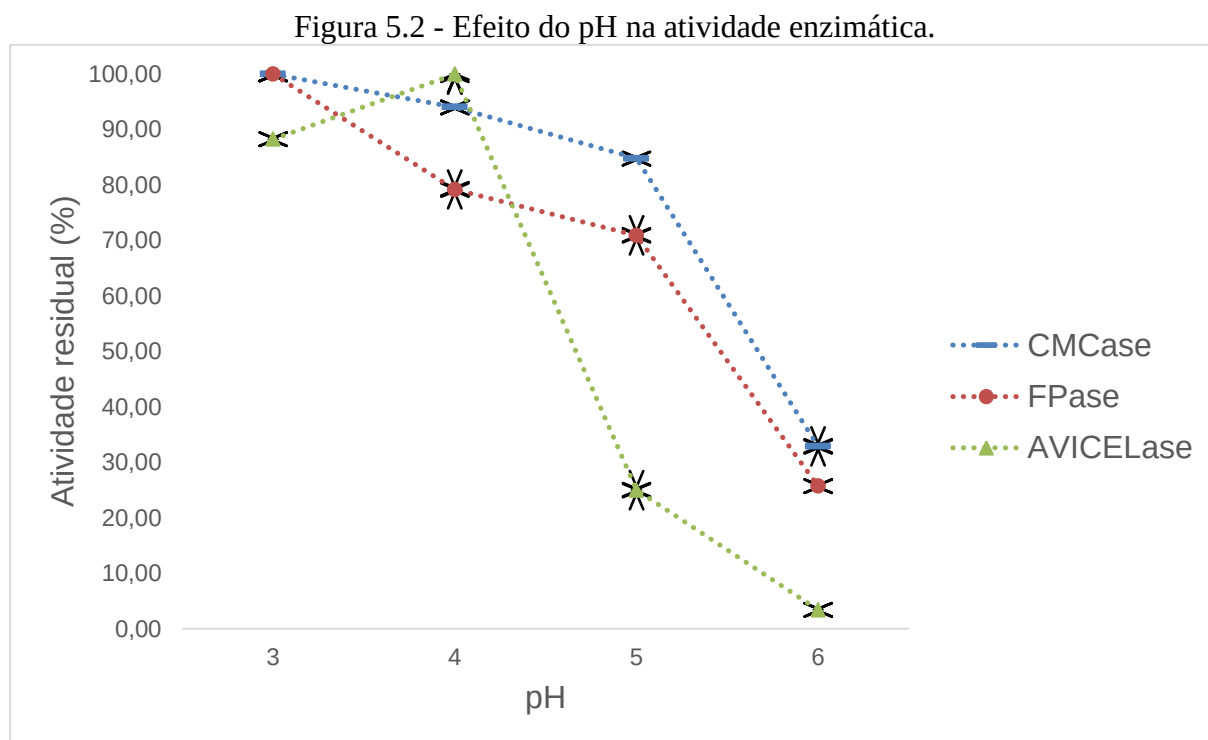
pH	Atividade	Desvio (U/g)	Atividade
	AVICELase (U/g)		Residual (%)
3	1,84	$\pm 0,03$	88,29
4	2,09	$\pm 0,21$	100,00

continua

Tabela 5.6 – Atividade AVICELase em diferentes faixas de pH.

pH	Atividade AVICELase (U/g)	Desvio (U/g)	conclusão
			Atividade Residual (%)
5	0,52	$\pm 0,08$	25,00
6	0,07	$\pm 0,01$	3,42

A Tabela 5.6 contém a atividade enzimática AVICELase que mantém as mesmas características das atividades anteriores, sendo uma faixa ideal de trabalho em pH ácido. Porém, diferente das atividades anteriores, é possível visualizar um máximo de atividade em pH correspondente a 4 e um decaimento no pH 5, chegando próximo a 0 no pH 6. A Figura 5.2 mostra o comportamento das atividades enzimáticas nos diferentes valores de pH citados.



Jung et al. (2015) observaram que para as atividades celulolíticas, a melhor faixa de pH, encontra-se entre os valores de pH 4,8 e 5,5. O que se enquadra com os resultados expostos anteriormente, onde vê-se uma maior atividade em valores de pH ácidos e ocorre uma perda de atividade em valores mais neutros.

Morais et al. (2021), demonstraram valores de atividade para cada enzima de forma individual excretadas pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080, variando seus valores um a um por planejamento fatorial. Para a atividade FPase é ressaltado que o valor de

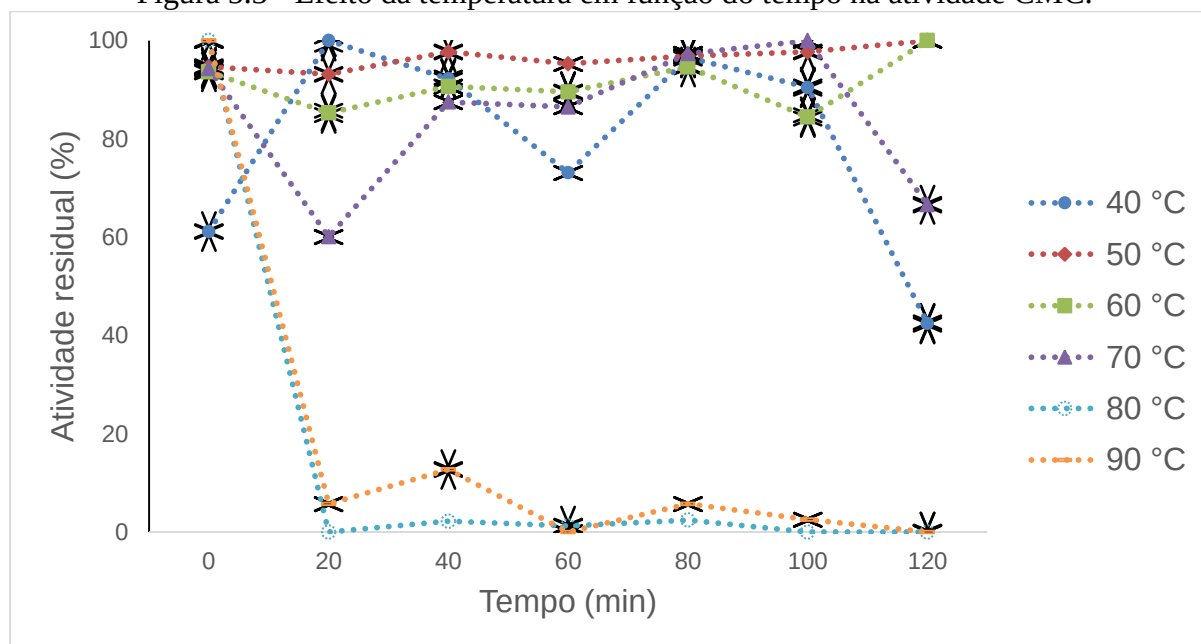
maior significância foi obtido em pH 5. Entretanto, para CMCase o maior resultado observado foi em pH 7.

Falcão (2021) utiliza o fungo *Aspergillus brasiliensis* na fermentação em estado sólido e tem resultados similares, é apontado que as enzimas endoglucanases obtidas apresentaram maior atividade celulolítica no pH correspondente a 4. Outros trabalhos, entretanto, demonstraram valores de pH próximo ao encontrado por Imran et al. (2018), que relataram pH 4,5 para endoglucanase produzidas a partir do fungo *A. niger* IMMIS1. Já Sulyman, Igunnu e Malomo (2020) informaram o valor de pH 4 para o fungo *A. niger*.

5.1.3 Estabilidade térmica

No estudo da estabilidade à temperatura, as enzimas foram colocadas a diferentes temperaturas 40 a 90 °C, em intervalos regulares 20 min até 120 minutos, assim determinando a atividade residual após o processo. A Figura 5.3 contém a estabilidade da CMCase.

Figura 5.3 - Efeito da temperatura em função do tempo na atividade CMC.



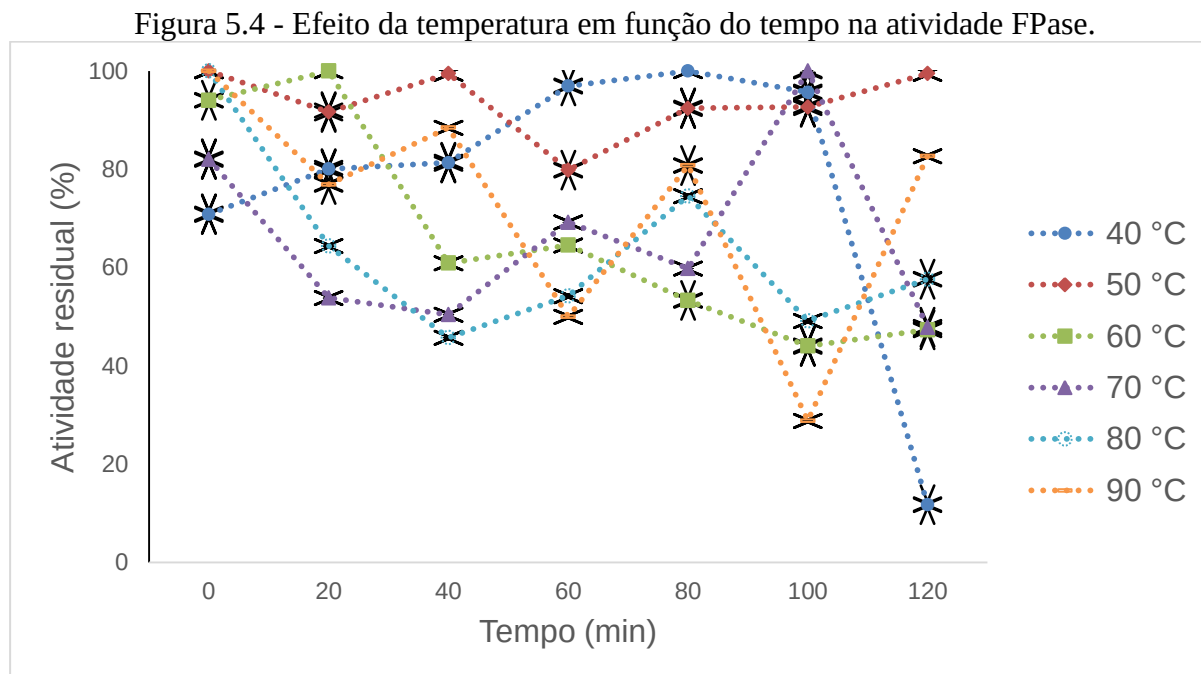
Na Figura 5.3 é possível observar que a enzima CMCase, produzida através do fungo *Penicillium* sp. FSDE15, possui resistência a faixa de temperatura 40 e 70 °C, desnaturando em temperaturas mais elevadas. Ocorrendo a desativação das enzimas nas temperaturas de 80 °C e 90 °C após 20 minutos de incubação. As demais faixas de temperaturas, 40 °C a 70 °C, mantiveram uma estabilidade com o passar do tempo, chegando a ter mais de 60 % da

atividade residual com 120 minutos de incubação em suas determinadas faixas, com exceção da temperatura de 40 °C que houve uma queda para 42,44 % em sua atividade residual.

Gu et al. (2021) determinaram que as enzimas endoglucanases produzidas a partir do *Aspergillus fungigatus*, tem uma estabilidade térmica considerável, em vista que a atividade residual caiu para 50 % após 30 minutos na temperatura 80 °C. Já Kim et al. (2022) utilizaram enzimas celulolíticas produzidas pela bactéria marinha *Pseudoalteromonas* e o fungo comercial *Aspergillus niger*, relatando que as enzimas provenientes das bactérias são desnaturadas após uma hora na temperatura de 55 °C, agora para as enzimas fúngicas a estabilidade se mantém próximo de 50 % em 75 °C até 60 minutos. O que condiz com o exposto na figura 5.3.

Yadav (2013), relatou a utilização do fungo endofítico *Bartalinia* sp., na produção de celulase para fins industriais e afirma que as enzimas estudadas mantiveram cerca de 50% da atividade inicial a 100 °C por 120 minutos, demonstrando uma forte resistência a altas temperaturas.

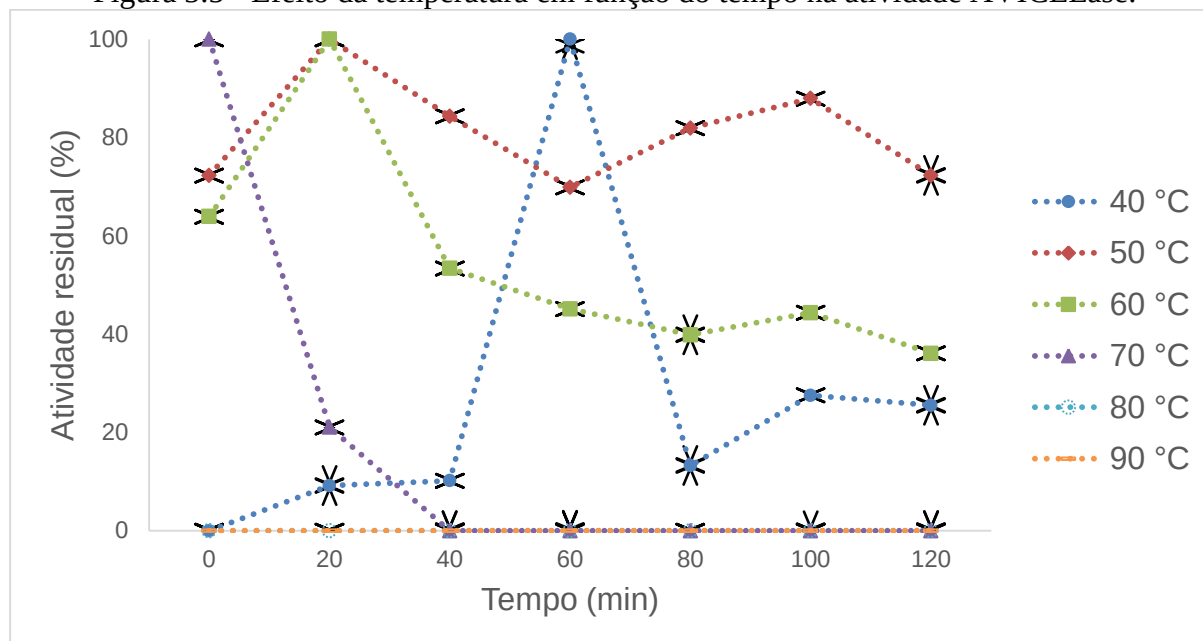
Os resultados para atividade FPase encontram-se na Figura 5.4, demonstrando uma estabilidade a altas temperaturas.



As enzimas mantiveram a estabilidade durante todo o teste, nas temperaturas iniciais entre 40 °C e 50 °C a atividade residual se manteve próximo a 100 %, entretanto, com o aumento da temperatura pôde-se observar um declínio, nesses valores, chegando próximo a

50 % da atividade inicial, com exceção de dois pontos, um a 100 e outro a 120 minutos, nas temperaturas de 90 °C e 40 °C respectivamente. Já a fFgura 5.5 demonstra o perfil de estabilidade das enzimas sobre a atividade AVICELase.

Figura 5.5 - Efeito da temperatura em função do tempo na atividade AVICELase.



A Figura 5.5 demonstra a atividade residual da enzima AVICELase, observa-se atividade em temperaturas mais brandas e uma redução da atividade quando a temperatura passa dos 70 °C, um comportamento peculiar acontece na temperatura de 40 °C onde a atividade varia de 0 a 27 % durante os 120 minutos e tendo um pico máximo de atividade em 60 minutos.

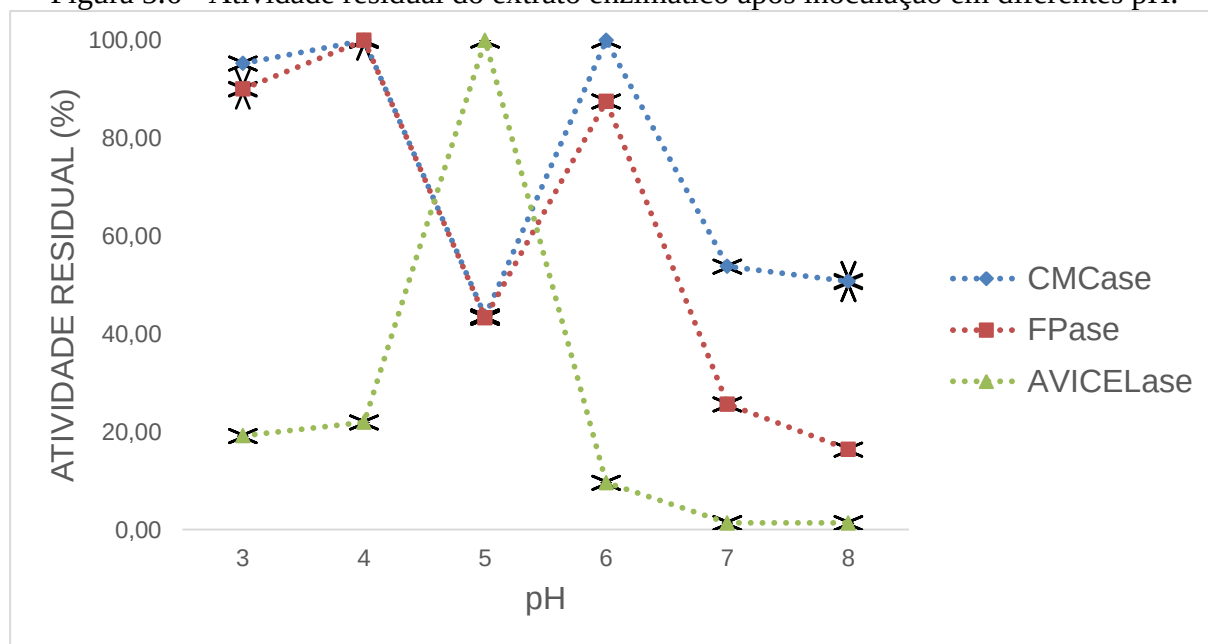
Silva et al. (2016) relataram que as enzimas Beta-Glicosidade produzidas pelo fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 obtiveram estabilidade até 60 °C, já em temperaturas superiores ocorre a redução da atividade, chegando próximo a 0 % em 70 °C. Contudo, na faixa de 40 °C a atividade é aproximadamente 90 %.

Bonfa et al. (2018) estudaram a termoestabilidade das enzimas Beta-glicosidade a partir do fungo *myceliophthora thermophila* M.7.7, nas temperaturas fixas de 30 °C a 80 °C, tendo resultados próximos de 90 % da atividade residual permanente a temperatura de 60 °C, quando observado temperaturas maiores a atividade chegou a zero, indo de acordo com os valores encontrados na figura 5.5.

5.1.4 Estabilidade ao pH

A Figura 5.6 mostra a atividade residual encontrada na inoculação das enzimas diante da alteração do pH.

Figura 5.6 - Atividade residual do extrato enzimático após inoculação em diferentes pH.



Segundo Santos (2021), o pH ótimo para a inoculação do *Penicillium* sp. FSDE15 é aproximadamente 5. Portanto, em primeiro momento foi utilizado este pH como referência e dado início ao estudo, em seguida, foi alterado a faixa de pH para 3 a 8.

O valor de referência foi obtido a partir do pH com o maior resultado para cada tipo de atividade enzimática CMCase e FPase, quando ambas tiveram o seu máximo no pH 4, já na AVICELase o resultado máximo obtido foi no pH 5.

Tais resultados levam a crê que CMCase e FPase tem uma boa faixa de atividade no pH de 3 a 6, quando valores chegam à neutralidade, ambas perdem atividade iniciando o processo de desnaturação, diminuindo para próximo de 50% e 25% a atividade.

Qu et al. (2022) relataram alta eficiência na biotransformação quando utilizam recombinações do fungo *Trametes trogii*, encontrado em madeira, com uma faixa de estabilidade ao pH indo de 5 a 10, com seu ponto máximo de atividade entre 5 e 7.

Já a atividade AVICELase teve seu rendimento próximo de 20 % comparando as melhores situações encontradas nas demais atividades, com seu máximo de 100 % no pH 5 adotado como referência, no processo de inoculação. Na indústria ter um intervalo de

estabilidade tanto térmico como de pH, é o mais interessante em vista que em processos de grande escala o controle exato de variáveis é complicado e de fácil variabilidade, no mais, as enzimas obtidas pelo *Penicillium* sp. FSDE15 demonstram uma boa estabilidade para processos industriais.

Olajuyigbe, Nlekerem e Ogunyewo (2016) realizaram a caracterização de Beta-glicosidase a partir do fungo *Fusarium oxysporum*, e obtiveram o resultado similar ao encontrado neste trabalho, onde a atividade AVICELase teve um máximo no pH correspondente a 5 e nas demais faixas ocorreu perda da atividade.

5.2 CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS POR PRECIPITAÇÃO

5.2.1 Precipitação com etanol e acetona

Os experimentos de precipitação com etanol estão apresentados na Tabela 5.7, contendo concentração do precipitante, atividade enzimática e taxa de recuperação.

Ensaio	Concentração de Etanol	CMCase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
Extrato Clarificado	-	0,21	± 0,06	-
1:1	50%	0,09	± 0,01	4,46
1:2	67%	0,12	± 0,00	5,91
1:3	75%	0,13	± 0,01	6,25

Na Tabela 5.7 tem-se a atividade enzimática CMCase do extrato bruto clarificado com valor de 0,21 U/mL, e para os demais ensaios, com a adição do precipitante etanol nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:3 (V/V). A coluna recuperação se refere ao percentual de atividade do precipitado em relação ao extrato enzimático.

Analisando os ensaios de forma pontual, é notório um pequeno aumento da atividade a partir do acréscimo de etanol adicionado nos testes, inicialmente de 0,09 U/mL correspondendo a 4,46 % da atividade inicial para a proporção de 1:1 com volume de 50 mL de extrato para etanol e chegando a 0,13 U/mL para o último ensaio sendo 6,25 % da atividade recuperada. Contudo, ao avaliar a viabilidade dessa técnica, encontrasse um

resultado desfavorável devido à perda da atividade inicial. Isso ocorre devido aos grandes volumes de reagentes necessários para sua execução, o que pode levar à desnaturação das enzimas, uma vez que o etanol tem o potencial de desnaturá-las.

Os valores referentes à atividade FPase encontram-se na Tabela 5.8, mostrando que somente com 75% de etanol no sistema ocorreu uma recuperação acima de 10%.

Tabela 5.8 – Atividade FPase recuperada por precipitação com etanol.

Ensaio	Concentração de Etanol	FPase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
Extrato Clarificado	-	0,07	± 0,02	-
1:1	50%	0,03	± 0,01	4,91
1:2	67%	0,05	± 0,02	6,91
1:3	75%	0,15	± 0,03	22,08

Para a atividade sobre o papel de filtro têm-se um resultado mais satisfatório, onde o valor da atividade do extrato enzimático era de 0,07 U/mL passou para 0,15 U/mL no ensaio 1:3, correspondendo em uma concentração e recuperação de 22,08 %. Na Tabela 5.9 encontra-se os valores para atividade enzimática AVICELase.

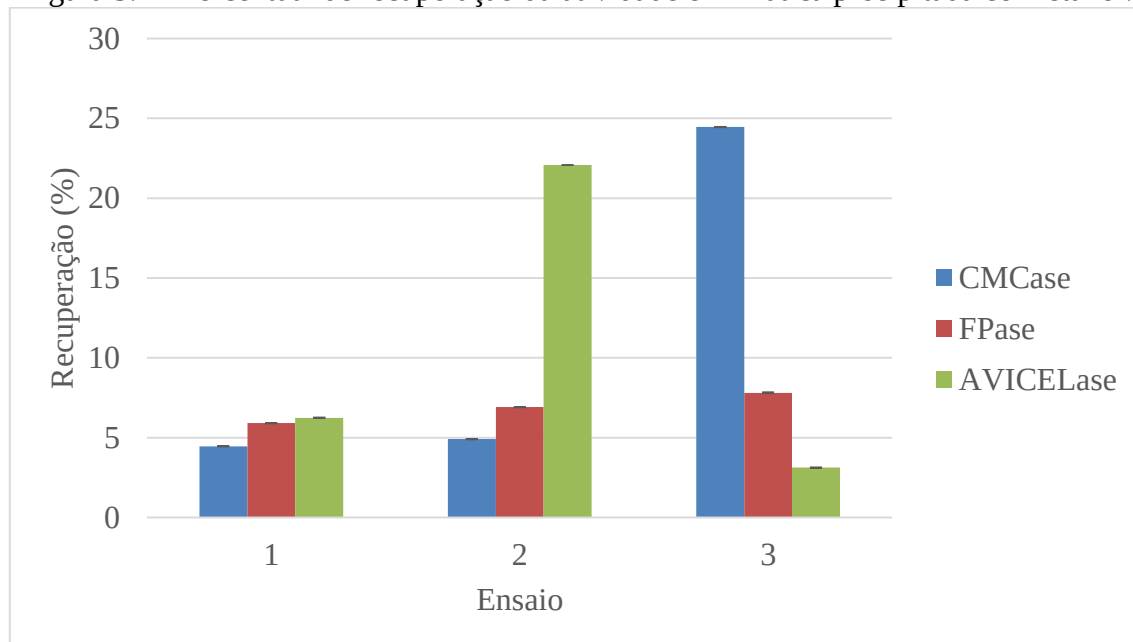
Tabela 5.9 – Atividade AVICELase recuperada por precipitação com etanol

Ensaio	Concentração de Etanol	AVICELase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
Extrato Clarificado	-	0,01	0,02	-
1:1	50%	0,02	0,01	24,46
1:2	67%	0,01	0,00	7,81
1:3	75%	0,00	0,00	3,12

Os resultados obtidos para AVICELase tem uma característica oposta aos demais, onde a maior taxa de recuperação chega a 24,46 %. Foi no primeiro ensaio onde a fração de etanol é de 50 %, que a atividade enzimática passou de 0,01 U/mL do extrato clarificado para 0,02 U/mL e decaindo com o aumento do precipitante no meio, chegando a 0,00 U/mL na proporção 1:3 extrato-precipitante.

A Figura 5.7 mostra de forma ilustrativa uma comparação de recuperação obtida para cada atividade enzimática discutida anteriormente.

Figura 5.7 - Percentual de recuperação da atividade enzimática precipitada com etanol.



A Figura 5.7 mostra o percentual de atividade recuperada para cada ensaio, comparando assim que, para cada ensaio, houve uma melhor atividade enzimática recuperada, no primeiro caso, onde a proporção de precipitante é 50%, foi obtido o melhor resultado para atividade AVICELase, no segundo ensaio embora não tenha ocorrido a precipitação de valores consideráveis têm-se um resultado maior para Fpase e no último ensaio onde a fração de etanol é de 75 % ocorreu a precipitação e concentração de 22,08 % da atividade FPase.

Almeida (2021) utilizou em seu trabalho as mesmas técnicas de precipitação e relatou que, para a obtenção de enzimas xilanases, o seu sistema com maior efetividade foi a precipitação com solventes orgânicos em específico a utilização de etanol nas proporções de 70 % (v/v), onde alcançou uma recuperação da atividade em 85% do extrato bruto.

Santos (2022) relata a utilização de 10 solventes orgânicos na proporção de extrato-solvente de 1:4, obtendo o melhor resultado de atividade lipolítica residual recuperada no etanol onde chega aos 100 % em comparação ao extrato bruto.

Os resultados para precipitação com acetona tiveram um percentual de recuperação pouco maior, na Tabela 5.10 encontra-se os valores de atividade endoglucanases.

Tabela 5.10 – Atividade CMCase recuperada por precipitação com acetona.

Ensaio	Concentração de Acetona	CMCase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
Extrato Clarificado	-	0,21	$\pm 0,06$	-
1:1	50%	0,08	$\pm 0,00$	3,92
1:2	67%	0,25	$\pm 0,01$	11,82
1:3	75%	0,23	$\pm 0,01$	11,08

Com o aumento na fração de acetona é possível visualizar uma melhora na proporção de concentração e recuperação das enzimas celulolíticas, como relatado anteriormente o extrato bruto continha uma atividade de 0,21 U/mL, obtendo uma recuperação de 3,92% na fração de 50 % de acetona e chegando a 11,08 % quando adicionado o volume de 3 vezes o extrato, contudo tendo um máximo de recuperação no segundo ensaio 11,82 %, correspondendo a 0,25 U/mL. Entretanto quando considerado os desvios padrões para os últimos ensaios observasse que não a diferença entre eles logo os ensaios contendo 67 e 75% em acetona são correspondentes.

O excesso da acetona no meio pode ocasionar a desnaturação das enzimas sendo um indicativo do motivo da estagnação de atividade recuperada com o maior volume do precipitante.

Os resultados para as enzimas exoglucanases presente na Tabela 5.11, demonstra valores de recuperação formidáveis.

Tabela 5.11 – Atividade FPase recuperada por precipitação com acetona.

Ensaio	Concentração de Acetona	FPase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
Extrato Clarificado	-	0,07	$\pm 0,02$	-
1:1	50%	0,01	$\pm 0,01$	0,89
1:2	67%	0,21	$\pm 0,01$	29,33
1:3	75%	0,46	$\pm 0,01$	65,42

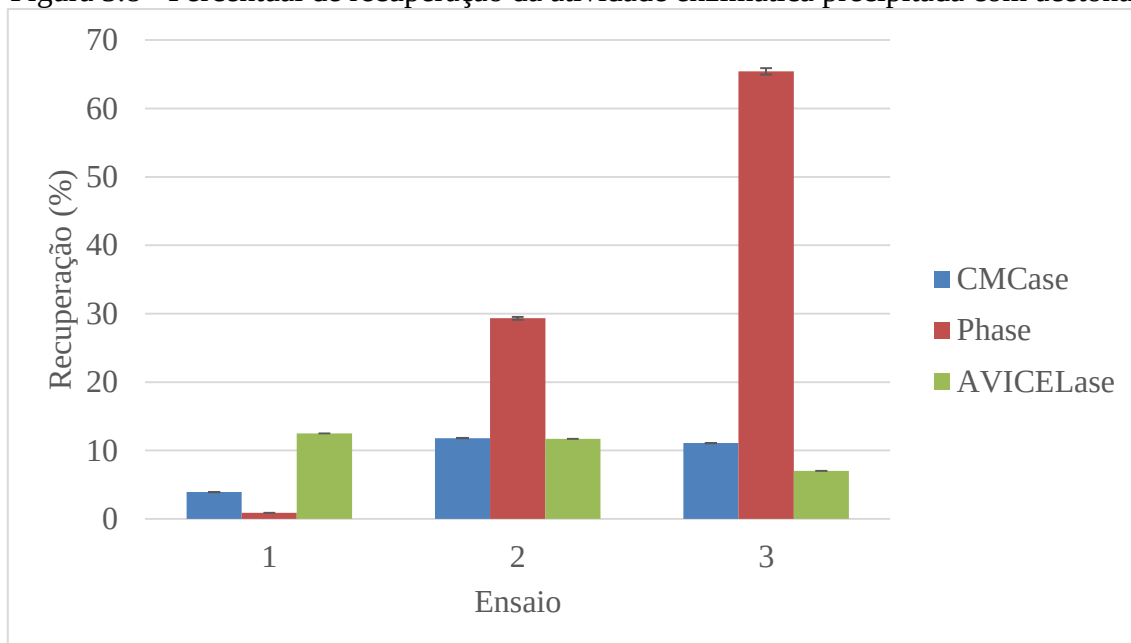
O aumento do volume de acetona nos ensaios resultou na recuperação crescente de até 65,42% da atividade enzimática que passou de 0,07 U/mL do extrato bruto para 0,46

U/mL do precipitado, contendo 3 volumes de acetona. Contudo na tabela 5.12 que demonstra os valores obtidos para as Beta-glucosidade vemos a melhor taxa de recuperação no primeiro ensaio.

Ensaio	Concentração de Acetona	AVICELase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
Extrato Clarificado	-	0,01	± 0,02	-
1	0,50	0,01	± 0,00	12,49
2	0,67	0,01	± 0,00	11,71
3	0,75	0,01	± 0,00	7,03

O melhor percentual de recuperação encontrado foi de 12,49 % para um volume de acetona, correspondendo a um pouco mais de 0,01 U/mL de atividade do extrato bruto, a Figura 5.8 demonstra a porcentagem de atividade para cada ensaio com acetona.

Figura 5.8 - Percentual de recuperação da atividade enzimática precipitada com acetona.



Com o aumento da concentração de acetona no sistema temos uma melhora na atividade FPase chegando a 65,42 % da atividade inicial, entretanto com as outras atividades essa característica não se mantém, observa-se a atividade AVICELase vem diminuindo com o avanço dos ensaios e a CMCase teve seu máximo de recuperação no ensaio número 2

chegando a 11,82 % da atividade recuperada, correspondendo a proporção de 1:2 extrato e precipitante.

Sampaio (2021), utilizou 8 tipos de solventes orgânicos diferentes e destacou que os melhores resultados foram para os sistemas utilizando álcool n-propílico e acetona, ambos nas proporções de 1:2 extrato-solvente, quando foi obtida a recuperação de 30,96 % da atividade para o precipitante álcool e 30,32 % para acetona.

Sohail, Soomro e Muhammad (2022), relataram a utilização de acetona nos volumes de 200 mL do precipitante para 50 mL do extrato, tal sistema de precipitação fez com que a atividade enzimática celulolítica passasse de 420 U/mL para 725 U/mL, obtendo uma concentração de 172,61 %

Cui e Jia (2015) relataram como funciona a precipitação por solventes, o motivo da verificação com mais de um precipitante ocorre pela forma que ele atua sobre as enzimas, seja por alteração do estado de hidratação molecular ou alterando a constante eletrostática das soluções.

5.2.2 Precipitação por sal

5.2.2.1 Precipitação com Sulfato de amônio.

Na tentativa de alcançar uma precipitação satisfatória por adição de sal, (salting-out), o sulfato de amônio é comumente mais utilizado para esses estudos, por alcançar forças iônicas consideráveis. Os ensaios de precipitação com sal de amônio foram realizados com a adição de 20%, 50% e 80% do sal em relação ao ponto de saturação sendo respectivamente 5,3; 14,55 e 25,8 g.

A Tabela 5.13 explana os resultados de atividade do precipitado e seus ensaios com suas concentrações do sal.

Tabela 5.13 – Atividade CMCase recuperada por precipitação com sulfato de amônio.
continua

Ensaio	Concentração de Sulfato de Amônio	CMCase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
Extrato Clarificado	-	0,21	± 0,06	-

Tabela 5.13 – Atividade CMCase recuperada por precipitação com sulfato de amônio.
conclusão

Ensaio	Concentração de Sulfato de Amônio	CMCase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
1:1	20%	0,08	± 0,00	3,92
1:2	50%	0,16	± 0,01	7,56
1:3	80%	0,15	± 0,01	7,19

A atividade CMCase obtida após a recuperação com sulfato de amônio não passou de 10 % em todos os ensaios, tendo um máximo de 7,56 % do valor inicial, correspondendo a 0,16 U/mL de atividade na concentração de 50 % de amônio presente no extrato.

A Tabela 5.14 expõe valores de atividade FPase para o mesmo sistema.

Tabela 5.14 – Atividade Fpase recuperada por precipitação com sulfato de amônio.

Ensaio	Concentração de Sulfato de Amônio	FPase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
Extrato	-	0,07	± 0,02	-
Clarificado				
1:1	20%	0,00	± 0,00	0,00
1:2	50%	0,07	± 0,01	9,66
1:3	80%	0,08	± 0,02	11,75

Para o caso da atividade FPase vemos um percentual de recuperação de acordo com o aumento da concentração do sal, saindo de 0 % e chegando a 1111,75 % da atividade inicial. Para a AVICELase têm-se um melhor percentual de recuperação na proporção de 50 % do sal demonstrado na Tabela 5.15.

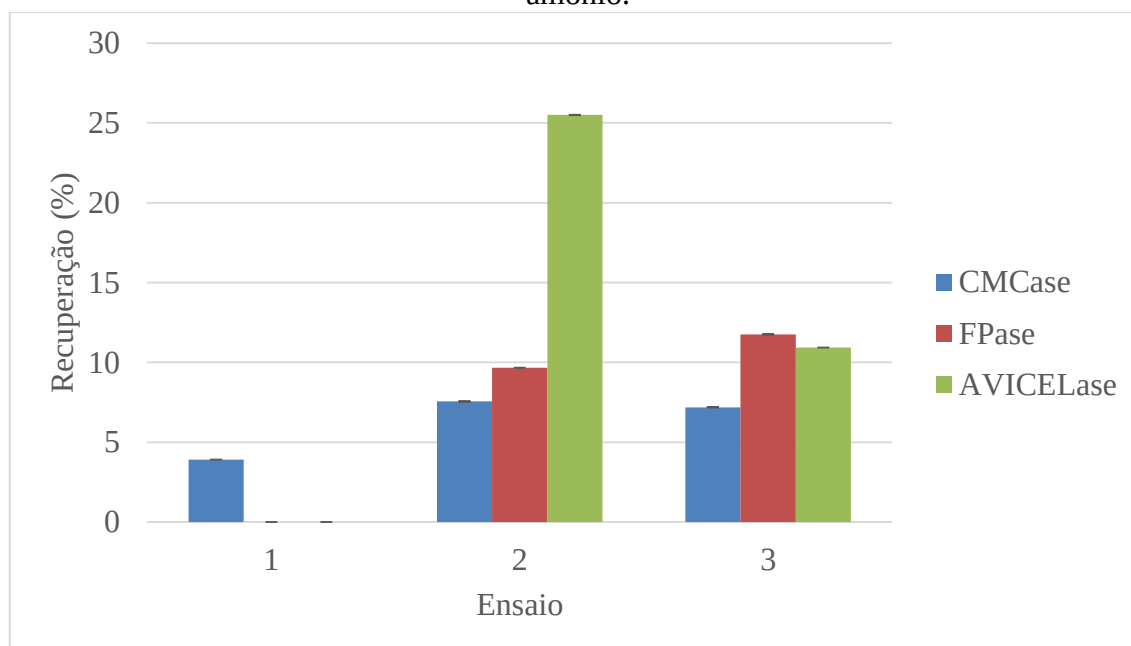
Tabela 5.15 – Atividade AVICELase recuperada por precipitação com sulfato de amônio.

Ensaio	Concentração de Sulfato de Amônio	AVICELase (U/mL)	Desvio (U/mL)	Recuperação (%)
Extrato	-	0,01	$\pm 0,02$	-
1:1	20%	0,00	$\pm 0,00$	0,00
1:2	50%	0,03	$\pm 0,00$	25,50
1:3	80%	0,01	$\pm 0,01$	10,93

A atividade enzimática do extrato bruto para AVICELase era de 0,01 U/mL com o aumento da concentração do sal ocorreu a precipitação das enzimas com exceção da concentração de 20 % do ponto de saturação, com o aumento do sal para 50 % ocorreu a recuperação de 25,50 % da atividade, entretanto quando passado deste ponto a atividade recuperada diminuiu para 10,93 %, indicando que para este caso a melhor situação é com o ponto de saturação em 50% massa/volume.

A Figura 5.9 contém os resultados de forma comparativa para os ensaios de precipitação com o sal de amônio.

Figura 5.9 - Percentual de recuperação da atividade enzimática precipitada com sulfato de amônio.



A Figura 5.9 mostra que com o aumento da concentração de sal ocorreu o aumento da precipitação das enzimas, e por sua vez o aumento da atividade enzimática por mL. A água tem afinidade tanto por proteínas quanto por íons de sal, mas preferencialmente se liga aos íons menores. Quando as moléculas de água se associam aos íons, as proteínas tendem a se agrupar, o que diminui a solubilidade e resulta na precipitação da proteína.

Esse fenômeno ocorre devido ao aumento significativo da força iônica no ambiente, conhecido como salting-out, ressaltando que o melhor ensaio de uma forma geral foi o segundo, onde houve 50% do ponto de saturação do sal de amônio e onde teve os maiores valores a atividade CMCase e AVICELase 7,56 % e 25,50 % respectivamente, o melhor ensaio para FPase foi o terceiro onde teve a recuperação de 11,75 % da atividade inicial.

Abdel-Sater et al. (2019) relataram o aumento da atividade enzimática celulolíticas em duas vezes produzida pelo fungo *Penicillium brevicompactum* AUMC 10987 com a utilização do sal de amônio como agente precipitante.

Bano et al. (2019) utilizaram o sulfato de amônio em 90% do ponto de saturação para precipitar celulasas produzidas por *Aspergillus flavus*, os autores determinaram a atividade CMCase do extrato bruto como 14,9 U/mg, após o processo de concentração e purificação a atividade do precipitado passou a 38,8 U/mg.

5.3 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, a Tabela 5.16 contém os valores das concentrações de $\mu\text{g/mL}$ e o desvio padrão para o extrato bruto clarificado e cada sistema de recuperação e concentração de enzimas, acetona, álcool e sal de amônio.

Tabela 5.16 – Concentração de proteína pelo método de Bradford.
continua

AMOSTRA	PROTEÍNA ($\mu\text{g/mL}$)	DESVIO ($\mu\text{g/mL}$)
EXTRATO	15,84	$\pm 1,22$
ACETONA 1:1	10,45	$\pm 0,27$
ACETONA 1:2	13,59	$\pm 1,13$
ACETONA 1:3	20,24	$\pm 0,93$

TABELA 5.16 – Concentração de proteína pelo método de Bradford.
conclusão

AMOSTRA	PROTEÍNA ($\mu\text{g/mL}$)	DESVIO ($\mu\text{g/mL}$)
ÁLCOOL 1:1	1,18	$\pm 0,33$
ÁLCOOL 1:2	6,96	$\pm 0,36$
ÁLCOOL 1:3	10,45	$\pm 0,80$
AMÔNIO 20 %	0,00	$\pm 0,00$
AMÔNIO 50 %	4,70	$\pm 0,89$
AMÔNIO 80 %	10,82	$\pm 0,39$

Os resultados mostram um total de 15,84 $\mu\text{g/ml}$ de proteína para o extrato bruto com um desvio padrão $\pm 1,22$, para os sistemas de concentração tem um resultado, a priori, qualitativamente favorável, onde com o aumento da concentração do precipitante obtém-se um acréscimo na quantidade obtida.

Para o sistema contendo acetona o melhor resultado foi na proporção 1:3 extrato e solvente, sendo 50 mL do clarificado com 150 mL de acetona, onde a concentração de proteína passou de 15,84 $\mu\text{g/ml}$ do extrato bruto para 20,24 $\mu\text{g/ml}$, obtendo-se o maior teor de proteína dos sistemas em estudo.

Os resultados para os sistemas de álcool e sal de amônio tiveram os resultados bem semelhantes, onde a maior taxa de recuperação foi obtida nos sistemas de 50 mL extrato e 150 mL precipitado (1:3), obtendo uma recuperação de 10,45 e 10,82 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Em destaque temos o sistema contendo sulfato de amônio a 20 %, onde não ocorreu a precipitação de proteínas.

Em primeiro momento após a ressuspensão das enzimas com tampão citrato 0,05M de pH 4,8, foi determinado o valor de cada atividade enzimática, CMCCase, FPase e AVICELase, mostrado na seção 5.2, para assim obter os valores de atividade enzimática específica (AS) e fator de purificação (FP).

Faz-se necessário a utilização destes parâmetros para determinação da eficiência dos sistemas de concentração e purificação de proteínas, uma vez que os precipitantes utilizados possuem um efeito indesejado sobre as enzimas em estudo, que é a desnaturação. A Tabela 5.17, demonstra tais fatores de forma comparativa.

TABELA 5.17 – Atividade enzimática específica (AS U/mg). e fator de purificação (FP).

AMOSTRA	AS CMCase (U/mg)	FP CMCase	AS FPase (U/mg)	FP FPase	AS AVICELase (U/mg)	FP AVICELase
EXTRATO	13,18 ± 1,21		4,31 ± 0,36		0,90 ± 0,08	
ACETONA 1:1	7,88 ± 0,41	0,60 ± 0,07	0,07 ± 1,06	0,02 ± 0,26	0,86 ± 0,70	0,92 ± 0,75
ACETONA 1:2	17,66 ± 0,17	1,39 ± 0,06	15,83 ± 1,49	3,56 ± 0,02	0,91 ± 0,31	1,00 ± 0,21
ACETONA 1:3	11,52 ± 0,99	0,88 ± 0,13	22,63 ± 0,46	5,28 ± 0,51	0,12 ± 0,40	0,10 ± 0,45
ÁLCOOL 1:1	125,90 ± 0,43	9,48 ± 1,19	27,86 ± 0,80	6,84 ± 0,26	15,35 ± 0,80	17,80 ± 2,37
ÁLCOOL 1:2	17,32 ± 0,01	1,30 ± 0,16	7,12 ± 2,73	1,22 ± 0,90	1,19 ± 0,00	1,46 ± 0,00
ÁLCOOL 1:3	12,39 ± 0,41	1,11 ± 0,21	17,21 ± 1,89	3,47 ± 0,92	0,31 ± 0,23	0,37 ± 0,30
AMÔNIO 20 %	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,11 ± 4,32	1,34 ± 0,85	6,11 ± 4,32	6,54 ± 3,96
AMÔNIO 50 %	38,86 ± 0,10	2,64 ± 0,56	14,86 ± 3,87	3,42 ± 0,70	6,33 ± 0,40	6,12 ± 0,96
AMÔNIO 80 %	13,93 ± 0,63	1,06 ± 0,08	21,04 ± 1,21	4,91 ± 0,65	1,40 ± 0,12	1,10 ± 0,67

A Tabela 5.17 mostra o valor de 13,18 U/mg como sendo atividade específica da CMCase do extrato, quando comparado com os demais sistemas, obtém-se uma melhora nos que foram utilizados acetona 1:2, onde a atividade chegou a 17,66 U/mg, quando utilizado álcool 1:1 o melhor resultado desta atividade foi 125,90 U/mg, com álcool 1:2 foi 19,39, com amônio 50% obteve-se 38,86 U/mg e com amônio 80% o valor foi de 13,93 U/mg.

A atividade específica FPase teve no extrato bruto o valor de 4,31 U/mg, entretanto teve uma melhora nesta atividade em quase todos os sistemas, com exceção da acetona 1:1, que foi utilizado a proporção de acetona e extrato, 50 mL cada. Em destaque tem o sistema utilizando álcool 1:1 com atividade específica de 27,86 U/mg.

Para a última atividade AVICELase os valores obtidos não foram tão expressivos como os anteriores onde o sistema utilizando álcool 1:1, mais uma vez, obtém o maior valor de atividade, chegando a 15,35 U/mg.

Entre todos os resultados apresentados o melhor fator de purificação ocorreu para o sistema contendo etanol 1:1, onde para cada atividade os valores alcançados foram 9,48 na atividade CMCase, 6,84 na FPase e 17,80 em AVICELase.

Ferreira et al. (2011) demonstraram sistemas de purificação e concentração utilizando PEG 4000/fosfato em diferentes valores de pH 7 a 9, obtendo valores que variaram de 1,64 a 3,34 de purificação em seu estudo com enzimas bromelinas.

Taddia et al. (2021) caracterizaram um sistema de recuperação de enzimas xilanolíticas utilizando duas etapas, a primeira composta por SABS e uma segunda utilizando cromatografia de troca iônica, é afirmado em seu trabalho que o melhor sistema obteve valores de recuperação enzimática de 79,9 % e um fator de purificação de 11.

Pessoa Júnior et al. (2020) relataram a utilização de sistema aquoso bifásico para recuperação e concentração de enzimas celulolíticas produzidas por *Aspergillus fumigatus* CCT 7873, o SABS foi formado utilizando o surfactante triton x-114 e variando temperatura e concentração do extrato. O melhor sistema determinado em seu trabalho foi a 55 °C e com 40 % do extrato, obtendo um fator de purificação para CMCase e FPase de 10,89 e 0,65, respectivamente.

Pode-se observar que para o sistema apresentado neste trabalho, quando contém etanol na proporção de 1:1 houve resultados mais elevados em relação a alguns trabalhos encontrados na literatura.

5.4 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE PARTIÇÃO POR SABS

O extrato utilizado nos sistemas aquosos bifásicos foi o clarificado, proveniente de uma nova fermentação. Na Tabela 5.18, o encontram-se algumas informações como proteína, atividade CMCase, atividade específica (AS) e fator de purificação (FP) para os SABS como o novo extrato clarificado, considerando “sup” como a fase superior e “inf” como a fase inferior de cada sistema aquoso bifásico.

Tabela 5.18 – Dados obtidos a partir dos SABS.

continua				
Fase	Proteína (µg/mL)	Atividade (U/g)	AS (U/mg)	FP
Extrato	36,10 ± 0,18	2,34 ± 0,12	4,38 ± 0,05	
1 sup	7,66 ± 0,55	0,86 ± 0,05	7,55 ± 0,03	2,27 ± 0,02
1inf	18,32 ± 0,74	0,48 ± 0,04	1,77 ± 0,02	0,43 ± 0,01
2 sup	8,84 ± 1,11	0,97 ± 0,08	7,42 ± 1,58	2,16 ± 0,04
2 inf	20,30 ± 0,18	0,61 ± 0,12	2,01 ± 0,39	0,34 ± 0,06
3 sup	4,10 ± 1,48	1,18 ± 0,15	20,04 ± 4,68	3,86 ± 0,10

Tabela 5.18 – Dados obtidos a partir dos SABS

Fase	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade (U/g)	AS (U/mg)	conclusão
				FP
3 inf	$11,87 \pm 0,18$	$0,72 \pm 0,08$	$4,08 \pm 0,42$	$1,00 \pm 0,08$
4 sup	$7,53 \pm 1,11$	$1,42 \pm 0,35$	$12,53 \pm 1,31$	$1,65 \pm 1,66$
4 inf	$10,42 \pm 1,48$	$0,79 \pm 0,29$	$4,98 \pm 1,19$	$1,22 \pm 0,27$
5 sup	$2,66 \pm 1,30$	$0,48 \pm 0,01$	$13,54 \pm 6,30$	$1,55 \pm 0,92$
5 inf	$12,79 \pm 0,74$	$0,59 \pm 0,02$	$3,03 \pm 0,24$	$0,71 \pm 0,01$
6 sup	$7,79 \pm 1,11$	$0,39 \pm 0,07$	$3,01 \pm 0,54$	$0,70 \pm 0,03$
6 inf	$5,95 \pm 0,00$	$0,71 \pm 0,01$	$8,15 \pm 0,07$	$1,62 \pm 0,48$
7 sup	$5,42 \pm 0,37$	$0,61 \pm 0,03$	$7,74 \pm 0,36$	$1,73 \pm 0,30$
7 inf	$3,45 \pm 0,55$	$0,38 \pm 0,00$	$7,53 \pm 1,22$	$1,85 \pm 0,32$
8 sup	$2,00 \pm 0,74$	$0,33 \pm 0,01$	$11,66 \pm 3,89$	$2,82 \pm 1,07$
8 inf	$17,01 \pm 0,74$	$0,89 \pm 0,00$	$3,48 \pm 0,12$	$0,77 \pm 0,09$
9 sup	$6,61 \pm 0,55$	$0,46 \pm 0,04$	$4,72 \pm 0,86$	$1,16 \pm 0,19$
9 inf	$10,60 \pm 1,18$	$0,62 \pm 0,03$	$3,95 \pm 0,39$	$0,94 \pm 0,04$
10 sup	$10,56 \pm 0,18$	$0,39 \pm 0,05$	$2,31 \pm 0,21$	$0,47 \pm 0,06$
10 inf	$15,43 \pm 0,37$	$0,52 \pm 0,04$	$2,39 \pm 0,11$	$0,52 \pm 0,03$
11 sup	$8,58 \pm 0,37$	$0,47 \pm 0,07$	$1,60 \pm 0,13$	$0,31 \pm 0,02$
11 inf	$13,10 \pm 0,37$	$0,54 \pm 0,03$	$1,35 \pm 0,11$	$0,34 \pm 0,03$

Após a separação das fases dos sistemas aquosos foi determinado o teor de proteínas solúveis e a atividade CMCase para assim calcular alguns parâmetros capazes de demonstrar a eficiência de cada SABS no qual a Tabela 4.18 contém a atividade enzimática específica que está relacionada com o teor de proteínas ativadas na fase e o fator de purificação, que é a capacidade de partição de cada fase.

O teor de proteína obtido no extrato foi de $36,10 \mu\text{g/mL}$, a Tabela 5.18 também contém os valores para o segundo SABS que teve maior concentração das proteínas preferencialmente em sua fase inferior, correspondendo ao tampão citrato de sódio, já a atividade enzimática específica (AS), desta mesma fase, foi uma das menores atingindo o valor de $2,01 \text{ U/mg}$, concluindo que a quantidade de proteína ativa capaz de degradar celulose foi baixa em contrapartida a fase superior deste mesmo SAB, que teve um teor de $7,42 \text{ U/mg}$ da atividade específica e um fator de purificação 2,16 sendo um dos maiores.

O menor valor de proteína obtido se encontra na fase superior do oitavo sistema, alcançando o valor 2,00 µg/mL, obtendo o valor de 11,66 U/mg da atividade específica, levando a uma quantidade elevada de proteínas ativas na fase com fator de purificação de 2,82.

A atividade encontrada para o extrato foi 2,34 U/g, já o maior e menor valor encontrado para as fases foram de 1,42 U/g na fase 4 sup e 0,33 U/g na fase 8 sup. Analisando a atividade específica tem-se o valor 20,04 U/mg do SAB 3, que chega a ser quase cinco vezes superior ao extrato bruto que teve o valor de 4,38 U/mg, o fator de purificação encontrado no mesmo SAB foi de 3,86, o maior valor registrado, demonstrando que este sistema tem a maior concentração de enzimas capazes de degradar celulase.

Com a análise dos dados, pode-se observar que a fase menos seletiva foi a do segundo sistema, em específico a fase inferior, que teve um teor alto de proteínas, mas um fator de purificação muito baixo, sendo o menor relatado, e como oposto tem-se a fase superior do terceiro sistema, sendo a com maior seletividade ao complexo celulolítico presente no extrato.

A Tabela 5.19 contém os coeficientes de partição da atividade enzimática (K_e) e de proteína (K_p) como também o percentual de recuperação de atividade na fase superior (RT) e inferior (RB).

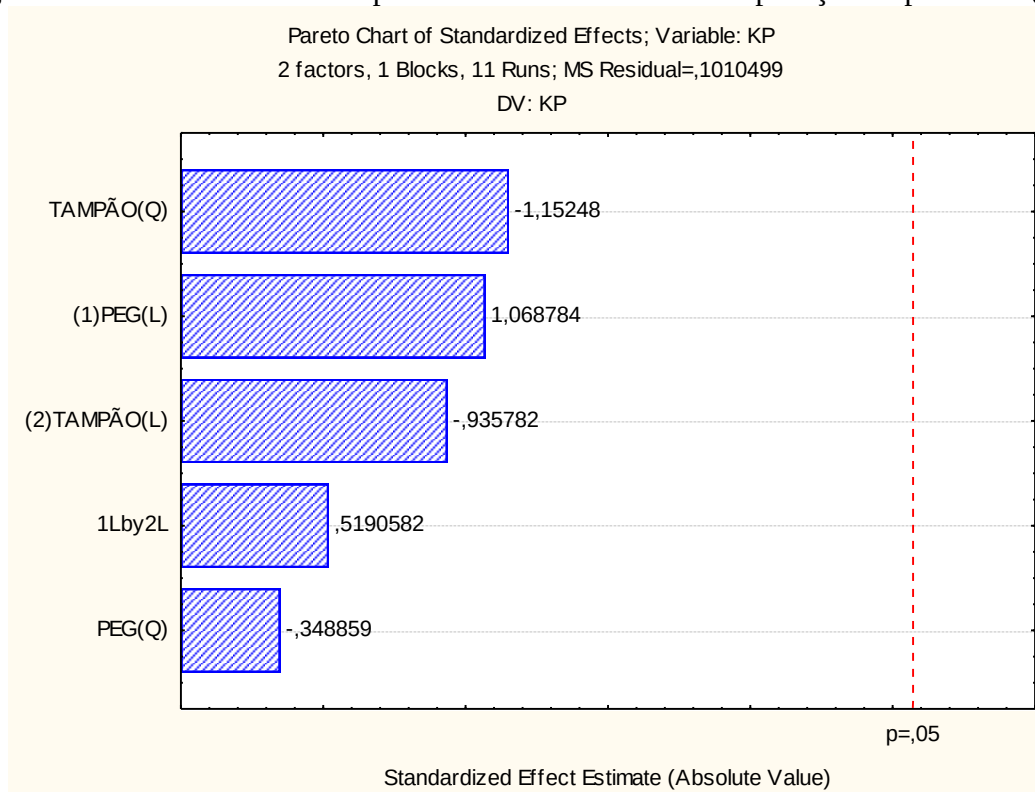
Tabela 5.19 – Coeficientes de partição obtido partir do SABS.

SABs	K_p	K_e	RT (%)	RB (%)
1	$0,36 \pm 0,09$	$1,96 \pm 0,09$	66,31	33,69
2	$0,34 \pm 0,12$	$1,60 \pm 0,13$	72,56	28,33
3	$0,54 \pm 0,09$	$1,27 \pm 0,47$	75,39	24,61
4	$0,23 \pm 0,14$	$0,96 \pm 0,29$	47,47	52,53
5	$0,41 \pm 0,36$	$0,82 \pm 0,06$	65,87	35,05
6	$1,04 \pm 0,18$	$0,47 \pm 0,02$	35,44	64,56
7	$0,91 \pm 0,60$	$1,63 \pm 0,03$	68,15	31,85
8	$0,11 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,01$	31,91	68,09
9	$0,58 \pm 0,01$	$0,84 \pm 0,05$	57,16	42,84
10	$0,64 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,06$	46,46	52,27
11	$0,86 \pm 0,08$	$0,79 \pm 0,05$	41,22	58,78

Os dados acima mostram um maior percentual de atividade recuperada no terceiro SABs, com 75% levando a uma maior seletividade das enzimas a fase superior o que vem de concordância com os dados apresentados na Tabela 5.19, o maior valor de K_p foi para o sexto sistema, embora o percentual da atividade recuperada na fase superior foi de 35%, levando a supor que as impurezas presentes no extrato tenham ficado nesta fase.

As Figuras 5.10 a 5.12 exibem os gráficos de Pareto para cada variável de resposta analisada no ensaio de Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs).

Figura 5.10 – Gráfico de Pareto para a variável coeficiente de partição de proteínas (KP).



O gráfico de Pareto Figura 5.10 mostra que para o fator de purificação nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa para o procedimento de extração, esta tendência se repete para as demais respostas coeficiente de recuperação da atividade (K_e) e percentual de recuperação na fase superior (RT%), demonstrados na imagem a seguir, mostrando que na faixa de concentrações estudadas as variáveis não se mostraram significativas.

Figura 5.11 – Gráfico de pareto para a variável coeficiente de partição da atividade enzimática (KE).

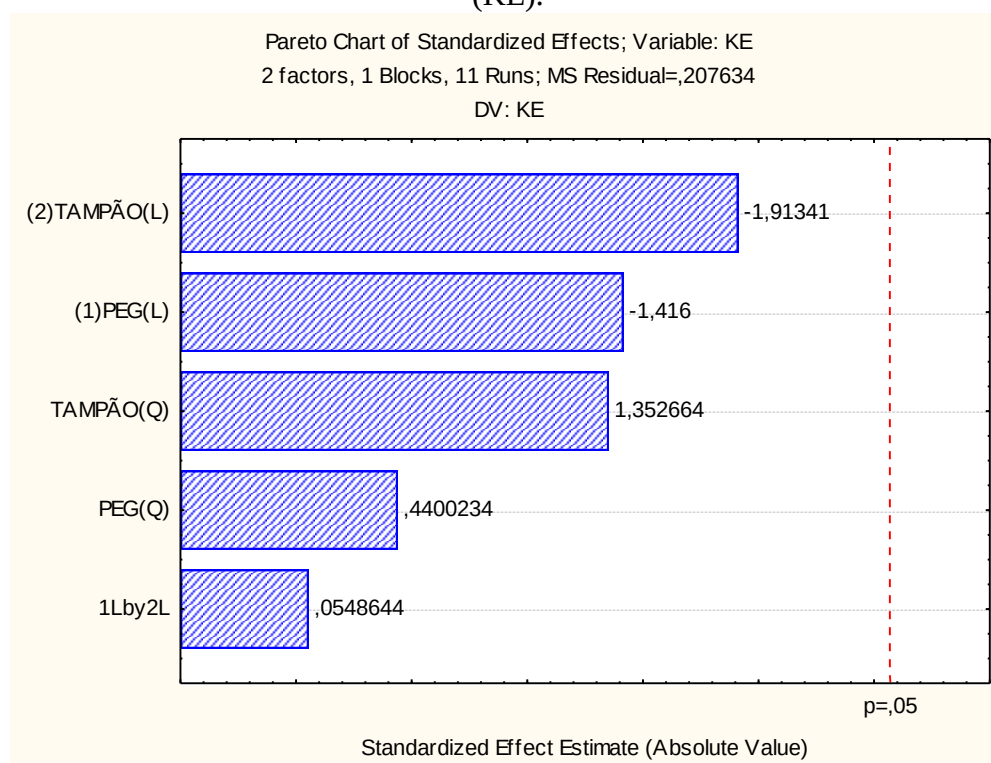
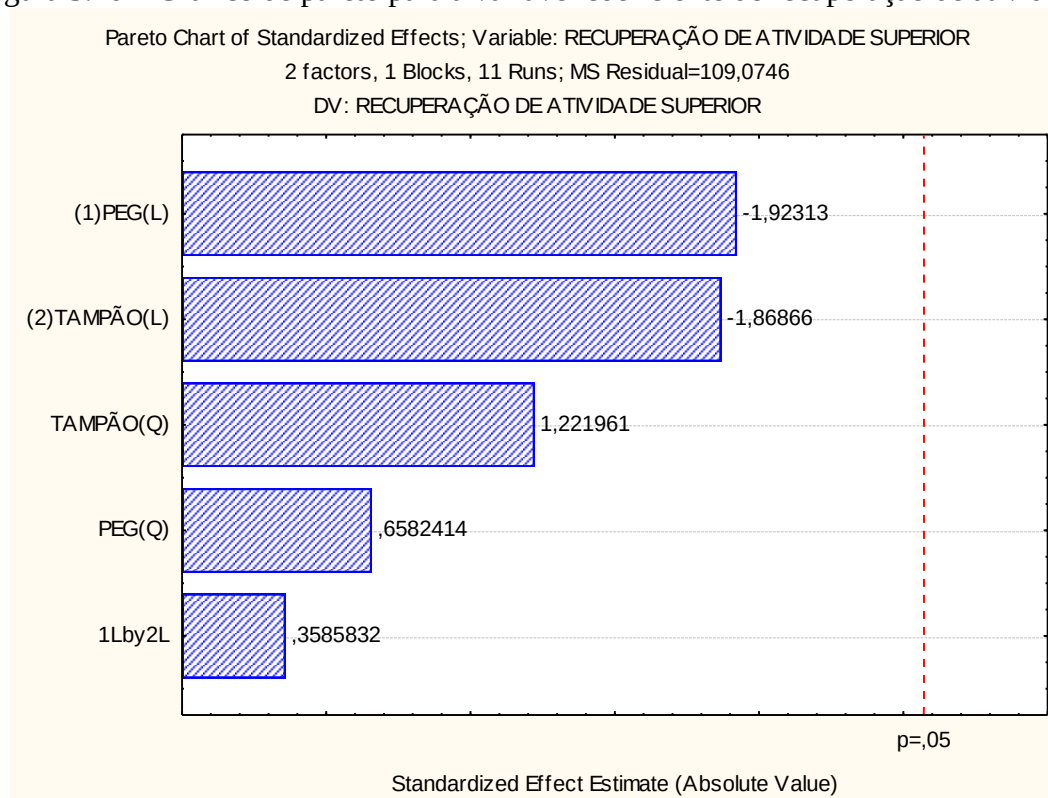


Figura 5.10 – Gráfico de pareto para a variável coeficiente de recuperação de atividade.



Essa característica demonstrada, revela que os erros associados as técnicas utilizadas são maiores que os coeficientes de regressão, desta forma não é possível obter uma equação para o modelo ou a utilização da superfície de resposta de forma significativa, pelo menos dentro do intervalo estudado.

Liu et al. (2019), estudaram a influência de 4 parâmetros na obtenção de celulase a partir da cepa *Bacillus velezensis* A4, utilizando sistema aquoso bifásico, peso molecular do polietileno glicol, concentração de PEG, pH e concentração do sal foram estudadas. O estudo mostrou que apenas a concentração do sal não era estatisticamente significativa, logo foi determinado o modelo utilizando os parâmetros de concentração do PEG, peso molecular e pH, entre os experimentos o que obteve maior resultado foi o com PEG 4000 e K_2HPO_4 nas concentrações de 20,75% e 8,5% respectivamente e pH 8,5. Chegando a taxa de recuperação enzimática de 67,8% e fator de purificação 1,14.

Contudo, Kharayat e Singh (2022), utilizaram SABs na obtenção de L-Metioninase a partir do *Pseudomonas stutzeri*, no estudo utilizam o PEG de massa molar 2000, 4000 e 6000, com diferentes sais em várias concentrações, sendo relatado que a melhor configuração encontrada foi a PEG 4000/ $MgSO_4$, nas concentrações de 40% e 20%, respectivamente, obtendo a atividade de 129 U, na fase superior.com o coeficiente de partição da atividade (K_e) no valor 1,92.

Nascimento et al. (2021) mostram em seu estudo a utilização de um sistema contendo PEG 4000 ou 2-propanol com sulfato de amônio na obtenção da enzima lipase extraída do caroço de pequi e demonstraram que a purificação para este caso foi maior utilizando o propanol no lugar do PEG obtendo os dados de 86,39% para rendimento, 0,057 como seletividade e o fator de purificação chegando a 4,48 nas melhores condições.

Gandolfi et al. (2020) observaram em seu trabalho que parâmetros como temperatura e massa molar do PEG influência na obtenção de α -amilase, onde as enzimas tiveram uma seletividade pela fase composta por PEG, também é relatado que os melhores resultados foram obtidos em sistemas produzidos com PEG 1500 mais cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio.

6. CONCLUSÕES

- O extrato bruto foi obtido seguindo as condições de cultivo para o fungo *Penicillium* sp FSDE15 por Santos (2021). Foi determinado a presença das atividades enzimáticas CMCase, FPase e AVICELase no extrato bruto.
- A temperatura ideal para a atividade enzimática de CMCase e FPase foi de 50 °C, enquanto para a AVICELase, a temperatura ótima foi de 40 °C. O pH ideal a cada atividade foi determinado como pH 3 para CMCase e FPase, e AVICELase obteve pH 4. Através da análise de termoestabilidade, foi comprovado que as enzimas produzidas pelo *Penicillium* mantêm sua estabilidade a temperaturas de até 70 °C por 120 minutos. Além disso, a estabilidade ao pH foi observada na faixa de 3 a 6 para todas as atividades enzimáticas estudadas.
- O fator de purificação com melhores resultados para as três atividades foi de 9,48 CMCase, 6,84 FPase e 17,80 AVICELase, ambos para o sistema de purificação contendo álcool na proporção 1:1 V/V.
- O primeiro sistema aquoso bifásico teve o melhor resultado quando verificado os coeficientes de partições enzimáticos. Também sendo o mais econômico por ter menor concentração de PEG e tampão citrato.

REFERÊNCIAS

Abdulaal W.H. & Almulaiky, Y.Q. Purification and Thermodynamic Characteristics of an Exo-Polygalacturonase from *Trichoderma Pseudokoningii*. **J Chem Soc Paquistão**. 42 (5).767-775, 2020. ISSN:0253-5106.

ALENCAR, S. N. V.; BATISTA, S. M. J.; NASCIMENTO, P. T.; CUNHA, C. N. M.; LEITE, L. C. A. Agro-industrial waste: a promising and sustainable alternative in the production of enzymes by microorganisms. **Congresso Internacional da Agroindústria**. 2020.

Almeida, Aline Pereira de. **Produção, purificação, caracterização e avaliação do potencial biotecnológico da endo-xilanase do fungo termófilo *Hemicella brevis* var. *thermoidea***. Dissertação, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2021.

Amin, F., Arooj, T., Nazli, Z.H. et al. Exo-polygalacturonase production from agro-waste by *Penicillium fellutanum* and insight into thermodynamic, kinetic, and fruit juice clarification. **Biomass Conv. Bioref.** 13, 11141–11151, 2023. DOI: 10.1007/s13399-021-01902-2

ÁVILA, P. F. **Utilization of lignocellulosic agroindustrial wastes for enzymatic production of oligosaccharides aiming prebiotic agent for human health: Aproveitamento de resíduos agroindustriais lignocelulósicos para produção enzimática de oligossacarídeos visando a obtenção de agente prebiótico para a saúde humana**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 2022. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/8512>. Acesso em: 12 set. 2023.

Baloch, K.A., Patil, U., Yesilsu, A.F., Benjakul, S. Characteristics and Application of Lipase from Asian Seabass Liver Fractionated Using Aqueous Two-phase Partition Technique for Defatting Fish Skin Before Collagen Extraction. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 23(12), 2023. DOI: 10.4194/TRJFAS24000

BANO, A., CHEN, X., PRASONGSUK, S., et al. Purification and Characterization of Cellulase from Obligate Halophilic *Aspergillus flavus* (TISTR 3637) and Its Prospects for Bioethanol Production. **Appl Biochem Biotechnol**, 189, 1327–1337, 2019. DOI: 10.1007/s12010-019-03086-y.

BARBIERI, G. S. **Avaliação da produção de xilanases em cultivo submerso de *Talaromyces amestolkiae* empregando resíduos agroindustriais**. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/235162>. Acesso em: 12 set. 2023.

BARROS, G. S.A. C. Agronegócio. In: Di Giovanni, G. & M.A. Nogueira. (Org.). **DICIONÁRIO DE POLÍTICAS PÚBLICAS**. 1ª. Ed. São Paulo: FUNDAP - **Imprensa Oficial de São Paulo**, v. 1, p. 76-79, 2013.

BCC Research: Market Research Reports & Industry Analysis. Global Industrial Enzymes Market, 2018. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/partners/verified-market-research/global-industrial-enzymes-market.html>. Acesso em: 10 set. 2023.

BERENJIAN, A.; EHSAN, M. Special Issue "Novel Processes for Development of Fermentation-Based Products". **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, 2021

Vega Miguel-Ruano, Ivanna Rivera, Jelena Rajkovic, Kamila Knapik, Ana Torrado, José Manuel Otero, Elisa Beneventi, Manuel Becerra, Mercedes Sánchez-Costa, Aurelio Hidalgo, José Berenguer, María-Isabel González-Siso, Jacobo Cruces, María L. Rúa, Juan A. Hermoso, Biochemical and Structural Characterization of a novel thermophilic esterase EstD11 provide catalytic insights for the HSL family, **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Volume 19, 2021. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.01.047.

BONFÁ EC, DE SOUZA MORETTI MM, GOMES E, BONILLA-RODRIGUEZ GO. Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7. **Biocatal Agric Biotechnol**, 13, 311–318, 2018. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.01.008.

BONIFÁCIO, PEDRO LÚCIO. **EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO E ESTUDOS DAS FORÇAS MOTRIZES DE PARTIÇÃO DE ÍONS EM NOVOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS BASEADOS EM LÍQUIDOS IÔNICOS**. 2020. 100 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, 72, 248–254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

BRAGA, H. F.; BAFFI, M. A.; ALVES DO PRADO, H. F. Farinha do caroço de abacate como substrato alternativo para produção de pectinases por *Gongronella butleri*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 11, n.1, p. 25–29, 2023. DOI: 10.20873/jbb.uft.cemaf.v11n1.braga.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais**. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, 1997.

Jing Zhu, Yanjing Liu, Yan Qin, Lixia Pan, Yi Li, Ge Liang, Qingyan Wang. Bsp-1 producing alkaline lipase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1043–1052, 2019. DOI: 10.4014/jmb.1903.03045.

CARDOSO, A. L., SANTOS, F. A., & SANTOS, S. F. Produção de celulasas por *Aspergillus* sp. FSDE16 utilizando farelo de trigo como substrato: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio. **Anais do IV Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências**, 1, 2019.

CASTILHO, L. **Recuperacao de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentacao semi-solida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1997.

CASTRO, Nicole Rénnio. **Afinal, quanto o agronegócio representa no pib brasileiro?** **Cepea-Esalq/USP**, 2022. Disponível em: https://www.cepea.esalq.usp.br/br/opiniao-cepea/afinal-quanto-o-agronegocio-representa-no-pib-brasileiro.aspx#_ftnref8. Acesso em: 07 set. 2023.

Chaocheng Luo, Yuedan Hu, Shuqi Xing, Wei Xie, Cuiqin Li, Laping He, Xiao Wang, Xuefeng Zeng, Adsorption–precipitation–cross-linking immobilization of GDSL-type esterase from *Aspergillus niger* GZUF36 by polydopamine-modified magnetic clarity tetroxide nanocouplings and its enzymatic characterization, **International Journal of Biological Macromolecules**, 245,2023,DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125533.

CNA - **Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil**. Panorama do Agro, 2021. Disponível em: <https://cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>. Acesso em: 07 set. 2023.

COELHO, J. D. Milho: Produção e Mercados. **Caderno Setorial ETENE**. Ano 6, n.182, 2021.

COMEX DO BRASIL. **A força do agronegócio: Brasil é líder mundial nas exportações soja, açúcar, carne bovina e de frango e suco de laranja, 2023**. Disponível em: <https://comexdobrasil.com/a-forca-do-agronegocio-brasil-e-lider-mundial-nas-exportacoes-soja-acucar-carne-bovina-e-de-frango-e-suco-de-laranja/>. Acesso em: 07 set. 2023.

Comput. Struct. Biotechnol. J., 19, pp. 1214-1232, 2021. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.01.047

CUI, J. D., & JIA, S. R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: Current development and future challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, 35(1), 15–28, 2015. DOI: 10.3109/07388551.2013.795516.

CYSNEIROS, C. dos S. S., FERREIRA, R. N., OLIVEIRA, M. A., FAVORETTO, A. O., ARNHOLD, E., ULHOA, C. J. PRODUÇÃO, Caracterização E Avaliação De Enzimas Fibrolíticas Na Digestibilidade Da Forragem De Milho. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, 14(4), 426–435, 2013. DOI: 10.5216/cab.v14i4.19491

DADWAL, A.; SHARMA, S.; SATYANARAYANA, T. Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: characteristics, recent advances and biotechnological applications. *International Journal Of Biological Macromolecules*, **Elsevier BV**, v. 188, p. 226-244, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.024.

Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. Química de alimento de Fennema. **Artmed**.(5) 2018. ISBN: 978-8582715451

DE OLIVEIRA JÚNIOR, S.D., DE ARAÚJO PADILHA, C.E., DE ASEVEDO, E.A., et al. Recovery and purification of cellulolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* CCT 7873 using an aqueous two-phase micellar system. **Ann Microbiol**, 70, 23, 2020, DOI: 10.1007/s00217-013-2037-3.

DIAZ, A. B.; BLANDINO, A.; CARO, I. Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 52–64, 2018, DOI: 10.1016/j.tifs.2017.10.016.

DORIYA, K.; JOSE, N.; GOWDA, M.; KUMAR, D. S.; Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of l-Asparaginase. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78, p. 115-135, 2016, DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.05.003.

Dumas, F., Roger, E., Rodriguez, J. et al. Aqueous Two-Phase Systems: simple one-step process formulation and phase diagram for characterisation. **Colloid Polym Sci** 298, 1629–1636, 2020, DOI: 10.1007/s00396-020-04748-8.

Falcão, L. S., et al. Purificação da enzima bromelina presente no curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith) variedade roxa, por sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato de potássio. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 13(2), 197–202, 2011, DOI: 10.15871/1517-8595/rbpa.v13n2p197-202

FARINAS, C. S., SCARPELINI, L. M., MIRANDA, E. A., & BERTUCCI NETO, V. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Braz. J. Chem. Eng.**, 28(1), 17–26, 2011, DOI: 10.1590/S0104-66322011000100003.

Ferreira, J. F., et al. Production and characterization of commercial cellulase produced through *Aspergillus niger* IMMIS1 after screening fungal species. **Pakistan Journal of Botany**, 50(4), 1563–1570, 2021, ISSN: 05563321.

GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. S.; MARTINAZO, A. P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. *Reasearch, Society and Development*, São Paulo, v. 9, n. 8, p. 1-33, 2020, DOI: 10.33448/rsd-v9i8.5785.

Gandolfi, O.R.R., Gonçalves, G.R.F., Batista, I.C. et al. Aqueous two-phase system (polyethylene glycol + ionic liquid) for extraction of α -amylase: phase diagrams, systems characterization and partition study. **Braz. J. Chem. Eng.** 37, 595–606, 2020, DOI: 10.1007/s43153-020-00043-9

GANDOLFI, O.R.R., GONÇALVES, G.R.F., BATISTA, I.C., et al. Aqueous two-phase system (polyethylene glycol + ionic liquid) for extraction of α -amylase: phase diagrams, systems characterization and partition study. **Braz. J. Chem. Eng.**, 37, 595–606, 2020, DOI: 10.1007/s43153-020-00043-9.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.**, 59, 257–268, 1987, DOI: 10.1351/pac198759020257

GONTIJO, V. L., SANTOS, L. H., RODRIGUES, G. D., & CARVALHO, P. L. MÉTODO ALTERNATIVO PARA PURIFICAÇÃO DE P2O5 DO MINÉRIO FOSFÁTICO SÍLICO-CARBONATADO DA REGIÃO DE ARAXÁ, NA RETIRADA DE ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO VIA SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB). **HOLOS**, 08, 2017, DOI: 10.15628/holos.2017.6596.

Gu, X., et al. A Thermophilic GH5 Endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and Its Synergistic Hydrolysis of Mannan-Containing Polysaccharides. **Catalysts**, 11, 862, 2021, DOI: 10.3390/catal11070862.

Hamid Shahbazmohammadi, Soroush Sardari, Eskandar Omidinia. Optimization of aqueous two-phase partitioning for purification of recombinant *Eupenicillium terrenum* fructosyl peptide oxidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 21, 2019, DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101344.

IMRAN, M., ANWAR, Z., ZAFAR, M., ALI, A., ARIF, M. Production and characterization of commercial cellulase produced through *Aspergillus niger* IMMIS1 after screening fungal species. **Pakistan Journal of Botany**, 50(4), 1563–1570, 2018, ISSN: 0556-3321.

Inês Soares de Mesquita. **REAGENTES ALTERNATIVOS À LIXIVIAÇÃO DO OURO: ESTUDO DA ADSORÇÃO DO OURO EM CARVÃO ATIVADO**. Dissertação apresentada para obtenção do grau de MESTRE EM ENGENHARIA DE MINAS E GEO-AMBIENTE, pela Faculdade de Engenharia de Universidade do Porto. 73p 2020.

Inovações Tecnológicas. **EMATER**, 2023. Disponível em: <http://biblioteca.emater.df.gov.br/jspui/bitstream/123456789/201/1/INOVA%C3%87%C3%95ES%20TEC%20AGROBRAS%C3%8DLIA%202023.pdf>. Acesso em: 21 de Outubro de 2023.

Jiménez Y. P., Freijeiro C. R., Soto A., Rodríguez O., Phase equilibrium for Polymer/ionic liquid aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, 506, 2020, DOI: 10.1016/j.fluid.2019.112387.

José Antônio de Queiroz Lafetá Junior, Matheus Furlan Pinheiro, Cariny Maria Polesca, Rita de Cássia Superbi, Jane Sélia dos Reis Coimbra. Efeito da Temperatura Sobre a Separação e Purificação de Proteínas do Soro de Leite Utilizando Sistemas Aquosos Bifásicos. **Revista Virtual de Química**, 14(2), 123-135, 2022, DOI: 10.21577/1984-6835.20210111.

JUNG, Y.R., et al. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, (76), 66–71, 2015, DOI: 10.1016/j.renene.2014.10.064.

KALRA, Rishu; CONLAN, Xavier A.; GOEL, Mayurika. Fungi as a potential source of pigments: harnessing filamentous fungi. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 369, 2020, DOI: 10.3389/fchem.2020.00369.

Keycianne da Cruz Silva, Christian Silva Abreu, Alício Wagner Vieira, Aparecida Barbosa Mageste, Guilherme Dias Rodrigues, Leandro Rodrigues de Lemos, Aqueous two-phase systems formed by different phase-forming components: Equilibrium diagrams and dye partitioning study. **Fluid Phase Equilibria**, 520, 2020, DOI: 10.1016/j.fluid.2020.112664.

Kilikian, B., & Pessoa Junior, A. **Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial**. (2), 760. 2020, ISBN: 9788521219460.

Kim, M. J., et al. Purification and characterization of a new cold-active cellulolytic enzyme produced by *Pseudoalteromonas* sp. ArcC09 from the Arctic Beaufort Sea. **BioResources**, 17(2), 3163–3177, 2022, DOI: 10.15376/biores.17.2.3163-3177.

Kübra Işık & Ercan Soydan (2023) Purification and characterisation of glutathione reductase from scorpionfish (*Scorpaena porcus*) and investigation of heavy metal ions inhibition, **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 38:1, DOI: 10.1080/14756366.2023.2167078

LOC, N.H., VAN, N.H., QUANG, H.T. Characterization of carboxymethyl cellulase produced by *Trichoderma asperellum*. **ADVANCEMENTS IN LIFE SCIENCES**, 8(1), 42–46, 2020, SSN 2310-5380.

Lohayne Ligya Barbosa Silva, Aparecida Barbosa Mageste, Beatriz de Paula Valverde, Laryssa Lorrany Ribeiro Caires, Maria do Carmo Hespanhol, Gabriel Max Dias Ferreira. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems formed by non-ionic surfactant (Triton X-165 or Triton X-305) and ionic liquid based on the choline cation (choline bitartrate or choline dihydrogen citrate). **Journal of Molecular Liquids**. 318, 2020, DOI:10.1016/j.molliq.2020.114030

LONSANE et al. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**. v. 7, p. 258-265, 1985, DOI: 10.1016/0141-0229(85)90083-3.

MAGALHÕES, N; CAVALCANTE, A. V; ANDRADE, L. S; WANDERLEY, C. R. P; MARINHO, G; PESSOA, K. A. R. Citric acid production by *Aspergillus niger* AN 400 from agroindustry waste. **Eng Sanit Ambient**, v. 24, n.1, p. 101-107, 2019, DOI: 10.1590/S1413-41522019167153.

MAHEVA, E. et al. Sporulation of *Penicillium roqueforti* in Solid Substrat Fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 97-102, 1984, DOI:10.1007/BF00127297.

Martínez M., Barrueto Y., Jumenez Y. P., Liquid-liquid extraction of molybdenum(VI) using aqueous two-phase systems (ATPS) consisting of polyethylene glycol (PEG) and sodium, ammonium and copper(II) salts: Comparison with conventional solvent extraction Hydrometallurgy, 219, 2023, DOI: 10.1016/j.hydromet.2023.106077.

Maximilian Wessner, Bettina Bommarius, Christoph Brandenbusch, Andreas S. Bommarius. Purification of chimeric amine dehydrogenase using a tailor-made aqueous two-phase system - A case study. **Journal of Molecular Liquids**. 323, 2021, DOI: 10.1016/j.molliq.2020.114991

MELO , R. N. de .; NASCIMENTO , L. H. do .; THOMAZONI , L. .; COLET , R. .; FERNANDES , I. A. .; ZENI, J.; DALLAGO , R. M. .; VALDUGA , E. . Purification of microbial exo-polylaacturonase by different techniques. Research, **Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 16, p. e253101623877, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i16.23877. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23877>.

MORAIS, M.S., et al. Production of cellulolytic complex by *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 with cassava peel and forage cactus as substrates. **Summa Phytopathologica**, 47(4), 225–227, 2021, DOI: 10.1590/0100-5405/252325.

Mubasshir Sohail, Qadeer Ahmed Soomro, Raza Muhammad, Muhammad Usman Asif and Imran Rauf. Screening, Characterization and Purification of Cellulase from Mango Mealybug *Drosicha stebbingi* Green (Homoptera: Margarodidae). **Pakistan J. Zool.**, 54, 2061–2068, 2022, DOI: 10.17582/journal.pjz/20201118071114.

Mumcuhttps, T., & Bozkurthttps, S. S. (29 de March de 2021). Simultaneous extraction of five phenolic acids in fruits using ultrasound assisted aqueous two phase system based on polyethylene glycol-ionic liquid-sodium carbonate. **Separation Science and Technology**.

Muruchi L., Lunario L. D., Jumenez Y.P., Application of central composite design to the partition of perrhenate anion in aqueous two phase system $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{PEG 4000} + \text{H}_2\text{O}$. **Journal of molecular liquids**, 279, 67-76, 2019, DOI:10.1016/j.molliq.2019.01.123.

MUSSATTO, S. I., & et al. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, 43(2), 124-129, 2008, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.11.006.

NAIDU, Y.; SIDDIQUI, Y.; IDRIS, A. S. Comprehensive studies on optimization of lignohemicellulolytic enzymes by indigenous white rot hymenomycetes under solid-state cultivation using agro-industrial wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 259, p. 110056, abr. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301479719317748>. Acesso em: 07 set. 2023.

NARRA, M., et al. Production, purification and characterization of a new endoglucanase from the GH 12 family of *Aspergillus terreus* and its application in the enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 88, 150–161, 2014, DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.12.016.

NASCIMENTO, T. P. et al. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtillissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 03, n. 03, p. 81–91, 2015, DOI: 10.4236/aer.2015.33009.

Nawaz, A., Sameer, M., Akram, F., Tahir S.F., Arshad, Y., Haq, I.U. & Mukhtar, H. Visão cinética e termodinâmica de uma poligalacturonase: um biocatalisador para clarificação de sucos de frutas industriais. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**. 20, 1029–1045, 2021, DOI: 10.33448/rsd-v10i16.23877.

NNOLIM, N. E.; OKOH, A. I.; NWODO, U. U. Proteolytic bacteria isolated from agro-waste dumpsites produced keratinolytic enzymes. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00483, set. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X20300497>. Acesso em: 07 set. 2023.

Olajuyigbe, F.M., Nlekerem, C.M., Ogunyewo, O.A. Production and characterization of highly thermostable β -glucosidase during the biodegradation of methyl cellulose by *Fusarium oxysporum*. **Biochem. Res. Int.**, 2016, ISSN: 9781216.

PARVEEN H, BISHT N, TEWARI L. Optimization and biochemical characterization of thermo-alkalotolerant cellulase enzyme from *Aspergillus terreus* Ppcf. **Cellulose Chem Technol.**, 54(9–10), 967–976, 2020, ISSN:1097-8135.

PERILLI, A. L. O.; SANTOS, J. A. A.; NICOLA, L. E. P.; MORGADO, P. A. R.; OLIVEIRA, V. P. ReActio - **Soluções Enzimáticas: produção de enzimas para catálise na indústria de biodiesel e etanol de segunda geração via fermentação submersa a partir de resíduos agroindustriais**. 2023. 260 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2023.

Qu Y, et al. Highly Efficient Biotransformation of Phenolic Glycosides Using a Recombinant β -Glucosidase From White Rot Fungus *Trametes trogii*. **Front. Microbiol.**, 13,2022, DOI: 10.3389/fmicb.2022.762502.

RAIMBAULT, M. Fermentation in milieu solid. Croissance de champignons filamenteux sur substrate amylacé. 291f. Tese (Doutorado) Université Paul Sabatier, Toulouse. 1980.

RAVINDRAN, R. et al. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 1–20, out. 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-5354/5/4/93>. Acesso em: 07 set. 2023.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: A review. **Bioengineering**, v. 3, n. 4, 2016, DOI: 10.3390/bioengineering3040030.

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. & Ashraf, M. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 7, 1-20, 2019, DOI: 10.3389/fbioe.2019.00110.

REIS, I. A. de O.; DOS SANTOS, S. B. Aplicação de sistemas aquosos bifásicos na purificação de tetraciclina. **Seven Editora**, [S. l.], 2023. Disponível em: <http://sevenpublicacoes.com.br/index.php/editora/article/view/539>. Acesso em: 9 sep. 2023.

RODRIGUES, N. A.; **Avaliação experimental de diferentes modos de operação de um biorreator de leito empacotado multicamadas para produção de celulasas por cultivo em estado sólido**. 2021. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://d-nb.info/1153327287/34>. Acesso em: 07 set. 2023.

SALAZAR, L. N., et al. Newly Isolated *Penicillium* sp. for Cellulolytic Enzyme Production in Soybean Hull Residue. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 63, 2020, DOI: 10.1590/1678-4324-2020170710.

SALES, E. H. **Análise da transferência de calor e parâmetros térmicos em leito empacotado de fermentação em estado sólido**, 2023. 107 p. Dissertação de Mestrado. (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal De São Carlos, São Carlos, SP, 2023.

SAMPAIO, C.S., et al. **Síntese de agregados reticulados para a lipase produzida de *Geotrichum candidum***. Dissertação, Universidade Federal de Alfenas 2021.

SANKARAN, R. et al. Recent advances of aqueous two-phase flotation system for the recovery of biomolecules. **Fluid Phase Equilibria**, v. 501, p. 112271, 2019, DOI: 10.1016/j.fluid.2019.112271.

Santos, C.W.V. **Serino protease e inibidor de tripsina: purificação, caracterização e aplicação biotecnológica**. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Maceió-AL, 2020.

SANTOS, M.R. **Estudo da preparação de um agregado enzimático reticulado Cleas de lipase de *Aspergillus niger***. Dissertação, Universidade Federal de Alenas 2022.

SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA JR, A. C. R.; ASSIS, F. G. V.; LEAL; P. L. LEAL. Fermentação em Estado Sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**, v. 4, n. 2, 2018, DOI: 10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188.

SAROJ, P., P. M., & NARASIMHULU, K. Biochemical Characterization of Thermostable Carboxymethyl Cellulase and β -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus* JCM 10253. **Appl Biochem Biotechnol**, 194, 2503–2527, 2022, DOI: 10.1007/s12010-022-03839-2.

SAWADA, M. M. **Estudo da viabilidade técnica da substituição de Hexano por Etanol no processo de extração de óleo de Soja: cinética de extração e índices de qualidade**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. 2012.

SILVA, A.; ANDRADE, A. De. Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 457-472, 2016, DOI: 10.35572/rsc.v7i2.129.

SILVA, L. H., LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, 29, 1345-1351, 2006, DOI: 10.1590/S0100-40422006000600033.

SILVA, V.C.T., COTO, A.L.S, SOUZA, R.C, NEVES, M.B.S, E. Gomes, G.O. Bonilla-Rodriguez. Effect of pH temperature and chemicals on the endoglucanases and β -glucosidases from the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Obtained by solid-state and submerged cultivation. **Biochem. Res. Int.**, 2016, DOI: 10.1155/2016/9781216.

Singla, M., Sit, N. Isolation of papain from ripe papaya peel using aqueous two-phase extraction. **Food Measure** 17, 1685–1692, 2023, DOI:10.1007/s11694-022-01741-3.

SULYMAN, A. O., IGUNNU, A., MALOMO, S. O. Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. **Heliyon**, 6(12), 2020, DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05668.

Taddia, A., Rito-Palomares, M., Mayolo-Deloisa, K., Tubio, G. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* NRRL3 extract by an integrated strategy based on aqueous two-phase systems followed by ion exchange chromatography. **Separation and Purification Technology**, 255, 2021, DOI: 10.1016/j.seppur.2020.117699.

Taisuke Kojima, Chu-ChiLin, Shuichi Takayama, Shih-KangFan. Determination of Aqueous Two-Phase System Binodals and Tie-Lines by **Electrowetting-on-Dielectric Droplet Manipulation**. **Chem Bio Chem**. 20, 270–275, 2019, DOI:10.1002/cbic.201800553.

Teymoornejad, G e Jabbari, M. Thermodynamic insights into phase behavior a new aqueous two-phase system at different temperatures: Experimental equilibria, data correlation and modeling. **Journal of Molecular Liquids**. 375, 2023, DOI:10.1016/j.molliq.2023.121282

TIBOLLA, H. **Produção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática**. 141 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 2014. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1622956>. Acesso em: 12 set. 2023.

V. Miguel-Ruano, I. Rivera, J. Rajkovic, K. Knapik, A. Torrado, J.M. Otero, E. Beneventi, M. Becerra, M. Sánchez-Costa, A. Hidalgo, J. Berenguer, M.-I. González-Siso, J. Cruces, M.L. Rúa, J.A. Hermoso, Biochemical and Structural Characterization of a novel thermophilic esterase EstD11 provide catalytic insights for the HSL family. **Comput Struct Biotechnol J** 19: 1214-1232, 2021, DOI: 10.1016/j.csbj.2021.01.047.

YADAV, R.. **Characterization of thermostable and alkalitolerant cellulase from endophytic fungus Bartalinia sp**. Dissertação (Mestrado), Thapar University. 2013.

YEOMAN, C. J., HAN, Y., DODD, D., SCHROEDER, C. M., MACKIE, R. I., & CANN, I. K. O. Chapter 1 - Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. In: (Ed.). **Advances in Applied Microbiology: Academic Press**, v. 70, p.1-55, 2010, ISBN: 978-3-527-32989-2.

ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, H. Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, v. 165, p. 65–73, 2017, DOI: 10.1016/j.ces.2017.02.039.

Zhu J, Liu Y, Qin Y, Pan L, Li Y, Liang G, Wang Q. Isolation and Characterization of a Novel Bacterium Burkholderia gladioli Bsp-1 Producing Alkaline Lipase. **J Microbiol Biotechnol**. Jul 28;29(7):1043-1052, 2019, DOI: 10.4014/jmb.1903.03045.