



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIAS DE ALIMENTOS**  
**CAMPUS JUVINO OLIVEIRA**

**SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS PARA PARTIÇÃO DE AMILASES  
PRODUZIDAS POR *ASPERGILLUS NIGER* ATCC 10535 USANDO  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO RESÍDUO DE MANDIOCA**

**KARINE AMARAL DOS SANTOS**

**ITAPETINGA – BA**

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

**SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS PARA PARTIÇÃO DE AMILASES**  
**PRODUZIDAS POR *ASPERGILLUS NIGER* ATCC 10535 USANDO**  
**FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO RESÍDUO DE MANDIOCA**

**KARINE AMARAL DOS SANTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia– UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de mestre.

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

**Co-Orientadores:**

Prof. DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Prof. DSc. Leandro Soares Santos

**ITAPETINGA – BA**

**2018**

660.634 Santos, Karine Amaral dos  
S235s Sistemas aquosos bifásicos para partição de amilases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 10535 usando fermentação em estado sólido do resíduo de mandioca. / Karine Amaral dos Santos. - Itapetinga: UESB, 2018. 58p.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia–UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de mestre. Sob a orientação da Profª. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e coorientação do Prof. D.Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e Prof. D.Sc. Leandro Soares Santos.

1. Enzimas - Sistemas aquosos bifásicos. 2. Mandioca – Resíduo - Dados de equilíbrio. 3. UNIFAC. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. IV. Santos, Leandro Soares. V. Título.

CDD(21): **660.634**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Enzimas - Sistemas aquosos bifásicos
2. Mandioca – Resíduo - Dados de equilíbrio
3. UNIFAC



**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**  
Recredenciada pelo decreto estadual nº 16.825 de 04.07.2016  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos  
PPG-ECAL / UESB



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

### DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS PARA PARTIÇÃO DE AMILASES PRODUZIDAS POR *ASPERGILLUS NIGER* ATCC 10535 USANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO RESÍDUO DE MANDIOCA

**Autor (a):** KARINE AMARAL DOS SANTOS

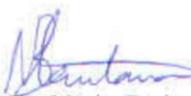
**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo

**Coorientador (a):** Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo

  
Prof. Dr. Nívio Batista Santana

  
Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña (UFRGS)

Itapetinga-BA, 05 de março de 2018.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.” Charles Chaplin*

*À minha mãe que se esforçou para que o  
meu sonho se realizasse, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por me manter firme em minha jornada;*

*À minha mãe, por não medir esforços para a realizar meus sonhos, pelos conselhos, pelo amor e orações. Obrigada por acreditar em mim.*

*À minha irmã Ramony pela torcida e alegria transmitida nos momentos difíceis, tornando as coisas mais simples;*

*À Rair, pelo amor, incentivo, companheirismo e compreensão.*

*À Izabella pela amizade, companhia e contribuição. Obrigada pela dedicação e por ter se tornado essa amiga/irmã tão querida.*

*À Renata Bonomo pela orientação, paciência maternal, pelos conhecimentos compartilhados. Obrigada por me dar a honra de ser sua orientada;*

*À Leandro Soares Santos pela coorientação.*

*À Rafael da Costa Ilhéu Fontan pelas inúmeras contribuições para compreender processos teóricos e práticos nesse trabalho;*

*Aos professores Sérgio Castro, Vanessa Sampaio, Evaldo Cardoso e Nívio por toda ajuda e sugestões.*

*Aos colegas do LEP agradeço pela amizade e carinho, em especial à Olga.*

*Aos companheiros de mestrado pelos momentos de descontrações vividos.*

*À “turma dos SAB’s” pela grande ajuda e amizade.*

*Aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite em contribuir com esse trabalho.*

*À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela oportunidade e condições de realização do experimento.*

*À CAPES pela bolsa concedida, possibilitando a dedicação exclusiva para a execução do projeto de pesquisa.*

*E a todos que não foram citados mas que, direta ou indiretamente, fizeram parte desse trabalho, meu muito obrigada!*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Fermentação Estado Sólido .....	17
2.1.1 Micro-organismos empregados na fermentação em estado sólido .....	17
2.1.2 <i>Aspergillus Niger</i> .....	18
2.2 Resíduos agroindustriais.....	19
2.2.1 Resíduo de mandioca .....	19
2.3 Enzimas amilolíticas.....	20
2.4 Extração líquido-líquido.....	22
2.5 Sistemas aquosos bifásicos.....	23
2.5.1 Diagrama de equilíbrio de fases .....	24
2.5.2 Coeficiente de partição .....	26
2.6 Modelos termodinâmicos .....	28
2.6.1. Métodos de contribuição de grupos.....	28
2.6.2 Modelo UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient model).....	29
3 OBJETIVO GERAL .....	32
3.1 Objetivos específicos.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1 Local do experimento .....	33
4.2 Material .....	33
4.3 Métodos .....	33
4.3.1 Condições de cultivo do micro-organismo .....	33
4.3.2 Preparação do substrato .....	34
4.3.3 Fermentação em estado sólido.....	34
4.3.4 Preparo do extrato e precipitado enzimático.....	34
4.3.5 Determinação da atividade enzimática .....	34
4.3.6 Teor de proteínas no extrato enzimático.....	35
4.3.7 Determinação das curvas binodais.....	35
4.3.8 Determinação das linhas de amarração.....	36
4.3.9 Partição .....	38
4.3.10 Determinação dos parâmetros da partição.....	38
4.3.11 Energia livre de Gibbs .....	39

4.3.12 Cálculo dos volumes de exclusão .....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
5.1 Diagramas de equilíbrio .....	41
5.1.1 Efeito dos cátions nos diagramas de equilíbrio.....	41
5.1.2 Efeito da massa molar do polímero nos diagramas de equilíbrio .....	43
5.1.3 Estudo do comportamento das linhas de amarração.....	44
5.1.4 Modelos das linhas de amarração .....	46
5.2 Estimativa de parâmetros .....	48
5.3 Volume de exclusão .....	49
5.4 Atividade amilolítica .....	50
5.5 Partição das enzimas amilolíticas.....	51
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	53
7 REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO 1- Curvas padrões .....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de enzimas que podem ser obtidas por fermentação em estado sólido por diferentes resíduos e fungos filamentosos .....	18
<b>Tabela 2.</b> Algumas enzimas particionadas em Sistemas Aquosos Bifásicos. ....	23
<b>Tabela 3.</b> Composições globais para os sistemas formados por PEG (6000 g.mol <sup>-1</sup> e 4000 g.mol <sup>-1</sup> ) e sais de sulfato ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), no pH 6,5 e na temperatura de 25 °C, expressas em porcentagem mássica (% m/m). ....	36
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros R <sub>k</sub> e Q <sub>k</sub> adimensionais utilizados nesse trabalho. ....	39
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros ajustados e coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) obtidos para os sistemas PEG e sais de sulfato pela equação de Hu et al. (2003) .....	41
<b>Tabela 6.</b> Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 4000 g.mol <sup>-1</sup> (W <sub>peg</sub> ), sais de sulfato (W <sub>sal</sub> ) e água (W <sub>água</sub> ), pH 6,5 a 25 °C.....	45
<b>Tabela 7.</b> Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 6000 g.mol <sup>-1</sup> (W <sub>peg</sub> ), sais de sulfato (W <sub>sal</sub> ) e água (W <sub>água</sub> ), pH 6,5 a 25 °C.....	45
<b>Tabela 8.</b> Frações mássicas (% m/m) teóricas e experimentais para os sistemas formados por PEG (W <sub>peg</sub> ), sais de sulfato (W <sub>sal</sub> ) e água (W <sub>água</sub> ), pH 6,5 a 25 °C.....	47
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 4000 e sais de sulfato (Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) pH 6,5 em temperatura de 25 °C.....	48
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 6000 e sais de sulfato (Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) pH 6,5 em temperatura de 25 °C.....	49
<b>Tabela 11.</b> Valores calculados do volume de exclusão de sistemas formados para os sistemas PEG e sais de sulfato, no pH 6,5 a 25 °C. ....	49
<b>Tabela 12.</b> Coeficiente de partição da proteína (K <sub>p</sub> ), atividade amilásica (K <sub>e</sub> ), recuperação teórica (Y%), desvios nas composições pelo modelo UNIFAC (Δw (%)) e energia livre de Gibbs de transferência (ΔG) nos sistemas aquosos formados por sal de sulfato e PEG no pH 6,5 a 25 °C. ....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da hidrólise enzimática de amido em glicose. ....	20
<b>Figura 2.</b> Esquema do diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares para um Sistema Aquoso Bifásico.....	25
<b>Figura 3.</b> Diagramas de fases formados por PEG: (a) PEG 4000, (b) PEG 6000 e (●) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (■) $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ( $\Delta$ ) $\text{Li}_2\text{SO}_4$ a 25 °C e pH 6,5.....	42
<b>Figura 4.</b> Diagramas de fases para os sistemas formados por PEG ( $\Delta$ ) 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , (●) 4000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e (a) $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , (b) $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4000. ....	43
<b>Figura 5.</b> Influência do tempo de fermentação na atividade de específica das amilases de <i>A. niger</i> . ....	50

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

SAB	Sistema Aquoso Bifásico
UNIFAC	Universal Functional Activity Coefficient model
FES	Fermentação em Estado Sólido
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
PEG	Polietilenoglicol
LA	Linha de Amarração
$P_c$	Ponto Crítico
$K_e$	Coeficiente de partição da Atividade enzimática
$K_p$	Coeficiente de partição da proteína
PDA	Potato Dextrose Agar
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
BSA	Albumina do Soro Bovino
B.O.D	Biochemical Oxygen Demand
$Y$	Recuperação Teórica
$R^2$	Coeficiente de determinação
CLA	Comprimento da Linha de Amarração
ILA	Inclinação da Linha de Amarração
$W$	Massa
AE	Atividade Específica
$T_{ij}$	Energia de Interação
$V_{213}^*$	Volume de Exclusão
$\Delta w$	Desvios nas composições pelo modelo UNIFAC
$R$	Constante Universal dos Gases

## RESUMO

SANTOS, K. A. **Sistemas aquosos bifásicos para partição de amilases produzidas por *Aspergillus niger* usando fermentação em estado sólido.** Itapetinga – BA: UESB, 2018. 58 p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). \*

As amilases são biomoléculas com expressiva importância industrial aplicadas à processamento de alimentos, produção de detergentes, biocombustíveis, papel, produtos farmacêuticos, etc. Para a produção dessas enzimas, os fungos filamentosos como *A. niger* são amplamente utilizados. Para a extração desses compostos de relevância biotecnológica, várias pesquisas são feitas com sistemas aquosos bifásicos (SAB's) por possibilitar a separação de biomoléculas como enzimas sensíveis à variações térmicas e à solventes orgânicos. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo obter de dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos constituídos por polietilenoglicol (4000 g.mol<sup>-1</sup> ou 6000 g.mol<sup>-1</sup>) e sais de sulfato no valor de pH 6,5 a 25°C e suas respectivas aplicações para a partição de amilases de *A. niger*. As curvas binodais dos sistemas aquosos bifásicos contendo PEG (4000 ou 6000) e sais de sulfatos ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) nas condições pré-estabelecidas foram obtidas mediante a técnica turbidimétrica e as linhas de amarração foram determinadas por meio da regra da alavanca. Os resultados obtidos indicam que a massa molar do polímero não exerceu influência relevante no tamanho da região bifásica. Entretanto os cátions em estudo apresentaram diferença quanto a indução à formação de fases. Verificou-se que os sistemas formados com o cátion Na<sup>+</sup> apresentou maior região bifásica. Utilizou-se os dados experimentais das curvas binodais e linhas de amarração para estimar os parâmetros de interação de grupo para o modelo UNIFAC. Observou-se que com o aumento da massa molar dos sais e do polímero ocorreu o aumento do volume de exclusão que foi de 3970,7322 g.mol<sup>-1</sup> a 5700,8732 g.mol<sup>-1</sup>. Esses valores foram comprovados com base nos resultados da energia de interação. Também foram obtidas por meio deste modelo linhas de amarração de mesmo comprimento para todos os sistemas avaliados e em seguida, os resultados obtidos foram aplicados de forma experimental. Foi possível observar que os resultados experimentais obtidos para os comprimentos das linhas de amarração se aproximaram dos resultados teóricos. Posteriormente foi realizada a partição das amilases obtidas pela fermentação do resíduo de mandioca e constatou-se que para todos os sistemas em estudo ocorreu uma maior migração de moléculas de proteínas para a fase superior. Foi verificado que os sistemas formados por (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e PEG 4000 apresentaram melhores resultados de  $K_e$  e recuperação teórica elevada de 80,352 % quando comparado aos demais sistemas. Foi observado que a energia livre de Gibbs de transferência das enzimas foi espontânea para todos os sistemas estudados. Assim sendo, conclui-se que os SAB's em estudo pode ser uma alternativa para a pré-concentração das enzimas estudadas principalmente o sistema formado por (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e PEG 4000, por proporcionar eficiência no processo separação das amilases.

**Palavras-chave:** Enzimas, dados de equilíbrio, UNIFAC.

## ABSTRACT

SANTOS, K. A. **Aqueous two-phase systems for the partitioning of amylases produced by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation.** Itapetinga – BA: UESB, 2017. 58 p.

(Dissertation – Master's in Engineering and Food Science).\*

Amylases are biomolecules with important industrial expression for the processing of food, detergents, biofuels, paper, pharmaceuticals, etc. For the production of these enzymes, filamentous fungi like *A. niger* are widely used. For the extraction of these compounds of biotechnological relevance, several researches are done with aqueous two-phase systems (ATPS) because it allows the separation of biomolecules as enzymes sensitive to thermal variations and organic solvents. In this sense, the presente research had the objective of analyzing equilibrium data obtained from aqueous two-phase systems consisting of polyethylene glycol (4000 g.mol<sup>-1</sup> ou 6000 g.mol<sup>-1</sup>) and sulphate salts at pH 6.5 at 25 ° C and their respective applications for amylases partition. The binodal curves of the aqueous two-phase systems containing PEG (4000 or 6000) and sulfate salts ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) under the pre-established conditions were obtained by the turbidimetric technique and the mooring lines were determined by means of the lever rule. The results indicate that the molar mass of the polymer did not influence the size of the biphasic region. However, the cations under study presented differences in induction to phase formation. It was verified that the systems formed with the Na<sup>+</sup> cation presented greater biphasic region. The experimental data from the binodal curves and tie line were used to estimate the group interaction parameters for the UNIFAC model. It was observed that with the increase of the molar mass of the salts and the polymer the increase of the exclusion volume occurred which was 3970.7322 g.mol<sup>-1</sup> to 5700.8732 g.mol<sup>-1</sup>, these values were proved based on the results of the interaction energy. It was also obtained by means of these model tie lines of the same length for all evaluated systems and then, the obtained results were applied experimentally. It was possible to observe that the experimental results obtained for the lengths of the tie lines approximated the theoretical results. Subsequently, the amylases obtained by the fermentation of the cassava residue were partitioned and it was found that for all the systems under study there was a greater migration of protein molecules to the upper phase. It was verified that the systems formed by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and PEG 4000 showed better results for Ke values and theoretical high recovery of 80.352% when compared to the other systems. It was observed that Gibbs free energy of transfer of the enzymes was spontaneous for all systems studied. Thus, it is concluded that the ATPS under study may be an alternative for the preconcentration of the enzymes studied, mainly the system formed by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and PEG 4000, since it provides efficiency in the separation process of the amylases.

**Keywords:** enzymes, equilibrium data, UNIFAC.

## 1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento tecnológico e a concomitante preocupação ambiental, é crescente a busca e desenvolvimento de técnicas brandas que possibilitem a obtenção de biomoléculas onerosas e oriundas de resíduos. Nos últimos anos a utilização de sistemas aquosos bifásicos (SAB's), frente aos métodos de extração líquido-líquido convencionais, tem adquirido grande importância e sucesso progressivo na extração e purificação de compostos de relevância biotecnológica por se tratar de um processo que apresenta como vantagens baixo custo, separação relativamente rápida, possibilidade de aplicação em grande escala e por possuir amplo apelo ambiental (DA SILVA e LOH, 2006).

Esses sistemas são formados através da mistura de três ou mais espécies químicas que, em condições controladas de composição, pH, temperatura e pressão separam-se em duas fases distintas, cujo componente majoritário é a água. Os SAB's mais utilizados na extração líquido-líquido são formados sobretudo por polímero-polímero-água ou polímero-sal-água, sendo que o último possui maiores vantagens como baixo custo, menor viscosidade e, portanto, menor tempo de separação das fases (WU *et al.*, 1996; SALABAT, 2001).

Para a utilização de SAB, é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isso, são obtidos os diagramas de fases para os componentes do sistema em condições de temperatura e pressão pré-estabelecidas. Os diagramas de fases, representam graficamente a composição dos constituintes do sistema, presentes em certas concentrações, na qual ocorre a separação de fases.

Diversos fatores como: constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza e tamanho da partícula alvo; pH e natureza do eletrólito do sistema bifásico interferem no equilíbrio termodinâmico das fases e, conseqüentemente, na eficiência do processo extrativo de um determinado biocomposto (ALBERTSSON, 1986). Dessa forma, para otimizar o emprego dos sistemas aquosos bifásicos na separação e purificação de biocompostos é de fundamental importância ter conhecimento das variáveis do sistema.

Além disso, baseando-se na influência das propriedades físico-químicas, é possível prever o comportamento desses diagramas através de modelos termodinâmicos. O método de contribuição de grupo denominado modelo UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient model) é utilizado para prever dados de equilíbrio líquido-líquido. Nesse modelo as interações intersticiais são estudadas através da interação de grupos funcionais, ou seja, ele não admite que uma substância consista de moléculas. Com esse modelo é possível assimilar dados experimentais para obter parâmetros que caracterizam interações entre pares de grupos estruturais nos sistemas, sendo possível prever o comportamento do equilíbrio químico em

outros sistemas que não foram estudados experimentalmente mas que contêm os mesmos grupos funcionais (OISID e PRAUSNITZ, 1978).

A utilização do modelo UNIFAC garante também a redução de consumo de reagentes, contribuindo com a premissa da química verde, em que compostos são obtidos mantendo a máxima segurança ambiental. Outra vertente é a obtenção de biocompostos por meio da fermentação de resíduos, cuja a aplicação contribui para a redução dos impactos ambientais.

Diante dos vários de métodos de fermentação para a obtenção das enzimas industriais a fermentação em estado sólido (FES) se destaca por apresentar eficiência significativa quando comparada à fermentação submersa (MEGHAVARNAM e JANAKIRAMAN, 2017). Além disso, a FES é um método que requer baixa tecnologia, e se baseia no crescimento de micro-organismos nos poros de partículas suficientemente úmidas para suportar o crescimento e a atividade metabólica do micro-organismo. A matriz sólida deve conter nutrientes suficientes para que o micro-organismo se desenvolva e produza a biomolécula de interesse. Os resíduos agroindustriais geralmente são ricos em compostos nutricionais, e excelentes substratos para FES, contribuindo para a redução do custo de produtos biotecnológicos como as enzimas (THOMAS *et al.*, 2013).

Os fungos são promissores na FES, pois seu metabolismo resulta numa variedade de produtos e a baixa umidade do meio apresenta condições em que as colônias desses micro-organismos crescem naturalmente. O desenvolvimento das hifas dos fungos permite aos mesmos maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima (SILVEIRA, 2007).

*Aspergillus niger* é uma espécie fúngica que se destaca no FES, pois é responsável por uma ampla variedade de bioprodutos e é considerado um micro-organismo GRAS (*Generally Recognized as Safe* - reconhecido como de uso seguro) na produção de alimentos (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Diante dos diversos bioprodutos obtidos por meio do *Aspergillus niger*, as amilases se destacam devido a expressiva importância industrial. Tais enzimas são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas do amido em moléculas de glicose, maltose e dextrina (GUPTA *et al.*, 2003). Elas são aplicadas à processamento de alimentos, produção de detergentes, biocombustíveis, papel, produtos farmacêuticos, etc. Assim, esse trabalho teve como objetivo a obtenção amilases produzidas por *Aspergillus niger*, particionadas em sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG, sais de sulfato e água.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Fermentação Estado Sólido**

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo pelo qual um substrato, geralmente resíduos agroindustriais insolúveis é fermentado com umidade suficiente, mas sem água livre. Sua importância histórica para a humanidade data de séculos atrás, principalmente para processamento de alimentos como pães e queijos (SOCCOL, 2017).

A conscientização sobre a importância da utilização dos materiais biológicos como recursos renováveis para a produção de energia e alimentos para animais e como uma importante fonte de matéria-prima para a produção de produtos bioquímicos é fundamental, e ressalta o valor desta forma de fermentação mais antiga. O interesse pela FES é resultado da sua simplicidade e da proximidade com o modo de vida natural para muitos micro-organismos (TENGERDY, 1985).

Os micro-organismos, geralmente adicionados, no substrato se desenvolvem nos poros entre as partículas, utilizando os micronutrientes presentes no substrato para a proliferação e a produção de metabólitos como enzimas extracelulares (RAHARDJO, *et al.*, 2005).

#### **2.1.1 Micro-organismos empregados na fermentação em estado sólido**

Fundamentando-se no baixo conteúdo de água utilizada na FES, fungos filamentosos são os micro-organismos mais adequados. Estes micro-organismos possuem características ideais para sistemas de FES, pois possuem a capacidade de se desenvolver e de produzir enzimas extracelulares em altas concentrações em ambientes com umidade suficiente apenas para o metabolismo e a manutenção do crescimento (FARINAS, 2015). Fungos filamentosos ainda são capazes de crescer em locais de baixo pH e têm elevada capacidade de produzir esporos, o que facilita tanto a estocagem das células em sua forma vegetativa, como o preparo de inóculos (MITCHELL *et al.*, 2000).

Na FES, os micro-organismos podem ser qualificados em dois grupos principais: os naturalmente presentes na matéria-prima (selvagens) e os de cultura pura (individuais ou consorciados). Exemplos de fermentação com culturas selvagens são a compostagem e a ensilagem. As culturas puras são utilizadas nos processos industriais para propiciar o controle da utilização do substrato e a formação do produto final (SOCCOL, 1994).

É fundamental a seleção adequada do tipo de micro-organismo quando se trabalha com fermentação sólida. Os fungos filamentosos secretam naturalmente grandes quantidades de

enzimas (Tabela 1) para o meio extracelular, facilitando a recuperação dessas enzimas nas etapas de *downstream*.

**Tabela 1.** Exemplos de enzimas que podem ser obtidas por fermentação em estado sólido por diferentes resíduos e fungos filamentosos

Enzimas	Micro-organismos principais	Substratos
Pectinases	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Polpa de café
	<i>Lentinus enodes</i>	Resíduos de frutas
Hemicelulases	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus tamaritii</i>	Farelo de trigo/sabugo de milho/bagaço de cana
Celulases	<i>Aspergillus niger</i>	Casca de maracujá
	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de chá
	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz
Proteases	<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Casca de maracujá
Lipases	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu
Fitase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo/Farinha de soja
Tanase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
Invertases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz

Fonte: Adaptado de Rocha (2010).

### 2.1.2 *Aspergillus Niger*

*Aspergillus niger* é um fungo filamentososo do gênero *Aspergillus*, produtor proeminente para muitas enzimas comerciais e ácidos orgânicos, sendo um dos mais empregados para a produção de enzimas utilizadas na indústria de alimentos (IYYAPPAN *et al.*, 2018). Além disso, *A. niger* apresenta vantagens como facilidade de manipulação, habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (PEREIRA, 2015).

PANDEY *et al.* (1992) relataram que *A. niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, poligalacturonase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -amilase, glucoamilase,  $\beta$ -

glucosidase, protease ácida entre outras. O genoma deste fungo codifica um grande conjunto de enzimas para a degradação de diversos compostos, permitindo a digestão extracelular que resulta em moléculas de menor complexidade que depois são absorvidas pelo fungo. Portanto esses genes são expressos em resposta ao cultivo em substratos ricos nesses compostos (VAN MUNSTER *et al.*, 2017).

## **2.2 Resíduos agroindustriais**

Atualmente a busca por métodos de reaproveitamento de resíduos agroindustriais tem sido pauta para várias pesquisas. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (FERREIRA *et al.*, 2017).

### **2.2.1 Resíduo de mandioca**

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) pertence à família Euphorbiaceae e é uma cultura de arbustos perenes com longas raízes adelgadas, capaz de resistir a longos períodos de estiagem (NASSAR e ORTIZ, 2010). A cultura dessa raiz tuberosa é a sexta maior do mundo (BURNS *et al.*, 2010), sendo um componente básico da alimentação de mais de 800 milhões pessoas (FAO, 2013).

Os resíduos da cultura da mandioca são gerados na colheita, comercialização e em maior quantidade no processamento. Para cada tonelada de raiz de mandioca processada, em peso seco, obtém-se cerca de 731 a 796 kg de farinha, com 89% de amido e 14% de umidade, gerando, também, em torno de 102 a 153 kg de resíduos sólidos, com cerca de 67% de amido e resíduos líquidos, como a água da lavagem das raízes e a manipueira. Esse grande volume de resíduo gerado no processamento é resultado de pouca tecnologia aplicado na produção de farinha, fécula e polvilho (BRINGHENTI e CABELLO, 2005).

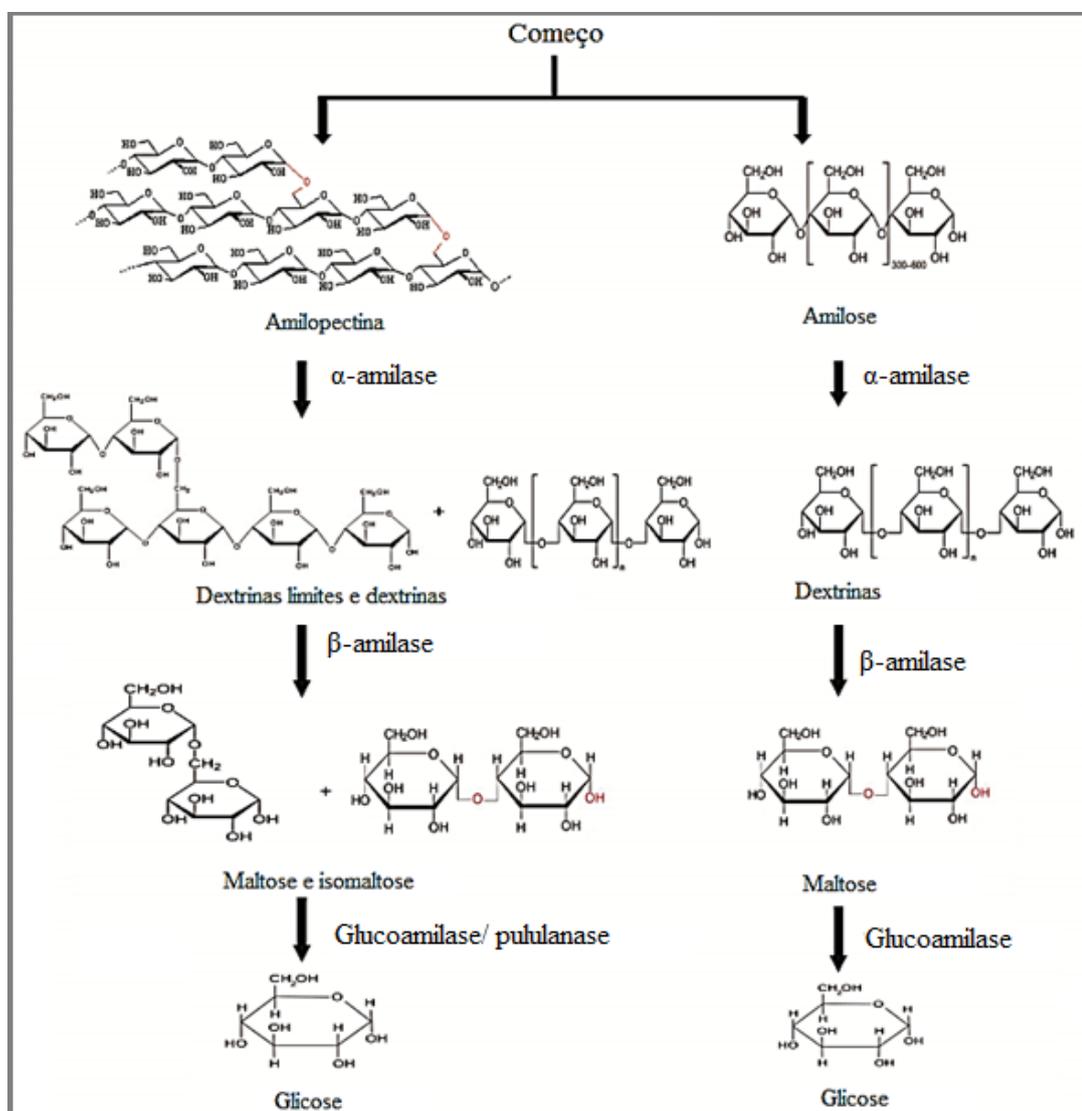
A composição química dos resíduos da mandioca não é homogênea, pois são diversos os fatores envolvidos, como: o solo do cultivo, variedade, metodologia de análise e origem do resíduo (colheita, comercialização e processamento). O resíduo desse tubérculo pode ser obtido na comercialização e durante o início da fabricação da farinha, sendo constituído de casca, entrecasca e pontas de mandioca, apresentando elevado teor de umidade (85%). A casca de mandioca desidratada apresenta 58,1% de amido, 3,4% de proteína bruta e 28,6% de fibra em detergente neutro (SANTOS *et al.*, 2009). Por ter uma composição com elevada quantidade de amido e outros polissacarídeos complexos, tal resíduo pode ser transformado em um importante

substrato para o processo de fermentação no estado sólido, visando a produção dos mais diversificados bioprodutos, principalmente enzimas amilolíticas (PEREIRA, 2015).

### 2.3 Enzimas amilolíticas

As enzimas amilolíticas também denominadas amilases, abrangem um grupo de enzimas que atuam sobre amido e outros oligo e polissacarídeos relacionados. Essas enzimas hidrolisam ligações exo e endoglucosídicas (Figura 1). Gupta *et al.* (2003) e Pandey *et al.* (2000) citam que as amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose.

**Figura 1.** Representação da hidrólise enzimática de amido em glicose.



Fonte: Husain (2017).

As enzimas amilolíticas podem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos. Quanto às ligações hidrolisadas, são principalmente agrupadas

em  $\alpha$ -amilases (endoamilases),  $\beta$ -amilases (exoamilases), glucoamilases (amiloglicosidases), isoamilases, pululanases e ciclodextrina-glicosiltransferases (CORNELIS, 1987).

As  $\alpha$ -amilases (1,4- $\alpha$ -D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) também denominada enzima dextrinizante pode ser definida como uma enzima que hidrolisa as ligações de polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose em união  $\alpha$ -1,4. O ataque ocorre na forma não seletiva sobre vários pontos da cadeia concomitantemente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de cinco a sete unidades de glicose, apresentando a configuração  $\alpha$  no carbono C1 na unidade de glicose redutora produzida. A maior parte das  $\alpha$ -amilases tem capacidade de contornar as ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 encontradas nos pontos de ramificação sem, no entanto, clivá-las (SPIER, 2005).

A  $\beta$ -amilase (1,4- $\alpha$ -glucano maltohidrolase, EC 3.2.1.2) é considerada uma enzima sacarificante responsável pela hidrólise na penúltima ligação  $\alpha$ -1,4 nas extremidades não redutoras da cadeia de amido, resultando em moléculas de  $\beta$ -maltose. A amilose é completamente convertida em maltose, no entanto o índice de conversão de amilopectina em maltose gira em torno de 50 a 60%, dependendo do grau de ramificação (SPIER, 2005).

As amiloglicosidases ou glucoamilases (1,4- $\alpha$ -glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.3) são enzimas extracelulares capazes de romper as ligações  $\alpha$ -1,4 partir da extremidade não redutora da amilose e da amilopectina, liberando  $\beta$ -D-glicose como produto. Algumas glicoamilases são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,6. Porém é verificado que a clivagem das ligações  $\alpha$ -1,6 é lenta quando comparada com a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4. Além das frações amilose e amilopectina do amido, essa enzima pode hidrolisar polissacarídeos de baixo peso molecular como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisados por esta enzima, a qual pode atuar também sobre as ligações  $\alpha$ -1,3 (SPIER, 2005). Apesar de várias culturas de micro-organismos também produzirem esta enzima, a amiloglicosidase produzida por *Aspergillus* é preferida por sua maior termoestabilidade, além de se encontrar no produto final baixa atividade de transglicosidase (STROPARO, 2011).

As isoamilases (glicogênio 6-glucanohidrolase, EC 3.2.1.68) são aplicadas na indústria combinadas a outras amilases para a obtenção de maltose e glicose a partir de amido. Tais enzimas hidrolisam as ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 de amilopectina, glicogênio, dextrinas ramificantes e alguns oligossacarídeos. Entretanto, tais enzimas não hidrolisam as ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 da pululana e de  $\beta$ -dextrinalimite (ARA e ITO, 1993).

Para a hidrólise das ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 nos pontos de ramificação do amido e da amilopectina são utilizadas as enzimas pululanases ( $\alpha$ -dextrinas 6-glucohidrolase, EC 3.2.1.41). Também são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 da pululana, gerando

moléculas de maltotriose. São industrialmente importantes e geralmente são usadas em combinação com amilases sacarificantes, como: a glucoamilase,  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -amilases para a produção de xaropes (BHAT, 1998).

Ciclodextrinases (EC 2.4.1.19 – ciclodextrina glicotransferase) são enzimas responsáveis pela clivagem do amido em moléculas de estruturas circulares denominadas de ciclodextrinas unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4. Estes anéis possuem de 6 a 8 unidades de glicose, sendo chamadas de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas, respectivamente. São enzimas extracelulares encontradas principalmente em bactérias do gênero *Bacillus*, mas também foi descrita em *Klebsiella pneumoniae* M5al e *Micrococcus* sp. (FOGARTY e KELLY, 1990).

## 2.4 Extração líquido-líquido

Diversas misturas possuem a capacidade de formar uma única fase e quando variada a concentração de cada espécie presente separam-se em duas fases ou mais. Há fatores que governam o equilíbrio dessas fases, como a temperatura, a pressão, a natureza química e a concentração inicial das substâncias na mistura (MADURO, 2005).

Santos (1999) relata que os sistemas sempre tendem a buscar o estado de equilíbrio termodinâmico, não havendo variações no balanço macroscópico. Portanto, o equilíbrio líquido-líquido pode ser definido conforme a segunda lei da termodinâmica, em que a sua estabilidade se mantém quando a energia livre de Gibbs total, à temperatura e pressão constante, atinge seu valor mínimo. Logo, ao misturar duas ou mais substâncias, a diferença entre a energia livre de Gibbs da solução e a dos compostos puros define a formação ou não de fases. Se essa diferença for menor que zero é obtida uma solução homogênea monofásica estável e se for maior que zero a solução é instável, possibilitando a formação de fases.

Assim, o processo de extração líquido-líquido se fundamenta na distribuição do composto de interesse entre as duas ou somente em uma das fases. Por meio dele é possível separar componentes sensíveis ao calor e aos métodos convencionais de purificação com solventes orgânicos como: corantes, insulinas, proteínas, organelas e fragmentos celulares, ácidos nucleicos, células inteiras, etc (MJALLI, 2005).

As técnicas tradicionais de separação líquido-líquido utilizam solventes orgânicos potencialmente tóxicos que afetam as funções das biomoléculas (WU *et al.*, 2017). Para solucionar tal limitação, em 1956, Albertsson estudou um processo de separação/purificação de materiais de origem biológica usando SAB's compostos por soluções aquosas de polietilenoglicol e dextrana, compatível com os processos de biosseparações. O SAB possui fases cujo ambiente é rico em água, oferecendo condições propícias à partição de proteínas e

outras biomoléculas nas fases, sem que ocorram mudanças na sua conformação e consequente perda de atividade biológica (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

## 2.5 Sistemas aquosos bifásicos

No final do século XIX Martinus Beijerinck observou que quando misturados gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel em certas concentrações e temperaturas apresentavam turbidez, e posterior formação de fases aquosas (MURARI, 2017). Tal descoberta possibilitou os estudos de Albertson na aplicação desse tipo de sistema para partição e extração de biomoléculas nos anos 1950. A partir de então a utilização de SAB's, frente aos métodos de extração líquido-líquido convencionais, tem adquirido grande importância e sucesso progressivo na extração e purificação de compostos de relevância biotecnológica por se tratar de um processo que apresenta como vantagens baixo custo, separação relativamente rápida, possibilidade aplicação em grande escala e possuir grande apelo ambiental (DA SILVA e LOH, 2006).

Atualmente, vários pesquisadores relatam a utilização de SAB para a purificação de enzimas, pois tais biomoléculas são sensíveis à variações térmicas e à solventes orgânicos. A Tabela 2 apresentam alguns destes estudos, é observado que além da água, vários elementos são combinados na constituição das fases.

**Tabela 2.** Algumas enzimas particionadas em Sistemas Aquosos Bifásicos.

Bioproduto	SAB's	Referência
Enzima fibrinolítica	PEG 1000, 1450, 3350, 8000 g.mol <sup>-1</sup> fosfato de potássio	Ali <i>et al.</i> , 2014
Queratinase	PEG 1500 g.mol <sup>-1</sup> , Fosfato de potássio	Sala <i>et al.</i> , 2014
Invertase	PEG 1500, 4000, 6000 g.mol <sup>-1</sup> e sulfato de magnésio e o co-soluto sulfato de magnésio hidratado	Padilha <i>et al.</i> , 2016
β-mananase	PEG 2000, 4000 and 6000 g.mol <sup>-1</sup> e fosfato de potássio, citrate de potássio, e acetate de sódio	Aziz <i>et al.</i> , 2017
Lipase	PEG 1500 g.mol <sup>-1</sup> e fosfato de potássio	Carvalho <i>et al.</i> , 2017
Xilanase	PEG 6000 g.mol <sup>-1</sup> e sulfato de sódio	Fakhari <i>et al.</i> , 2017
Peroxidase	PEG 600, 1000, 1500, 3350 e 8000 g.mol <sup>-1</sup> e fosfato de potássio	Jong <i>et al.</i> , 2017
Protease	PEG 400, 3350, 8000 g.mol <sup>-1</sup> e citrato de sódio	Silva <i>et al.</i> , 2017

Os SAB's formados por polímero e sal apresentam vantagens em relação aos compostos por polímero e polímero como baixo custo, menor viscosidade e menor tempo de separação de fases. Estes sistemas podem ser formados a temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal. A separação de fases é atingida mais rapidamente devido à menor densidade de uma das fases, o que facilita o uso de sistemas polímero-sal em aplicações industriais (SALABAT, 2001).

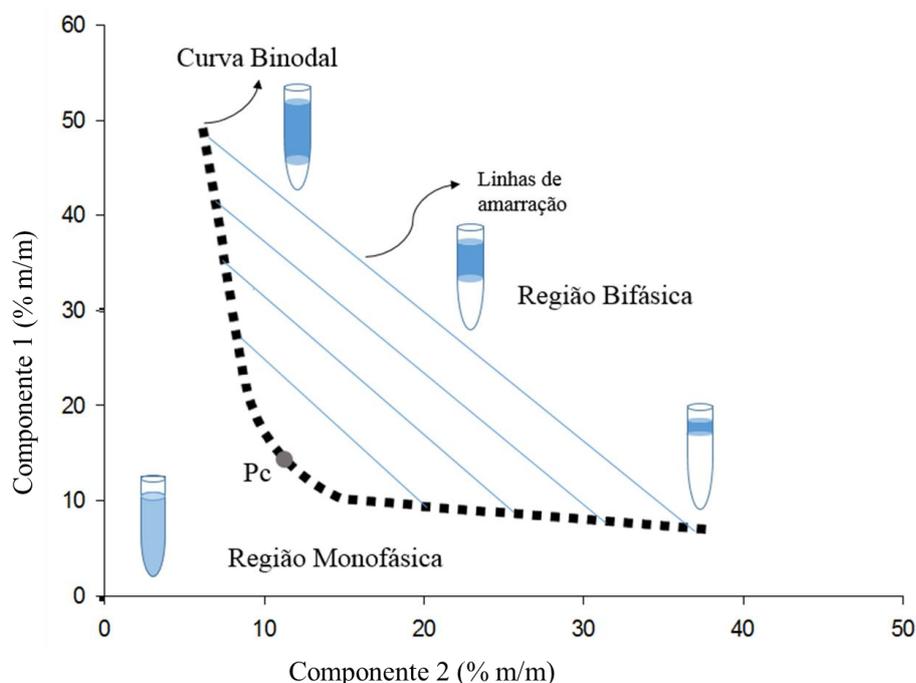
A formação de duas fases em sistemas constituídos por polímero, sal e água se deve à agregação dos íons do sal de forma a liberar as moléculas de água das camadas de solvatação e aumentar a entropia do sistema (MACHADO, 1999). A representação dessas fases ocorre por meio de diagrama de fases, que indica as concentrações necessárias de cada constituinte do sistema para que haja formação da região bifásica.

Assim, os SAB's ocasionam a separação de compostos (biomoléculas) em determinadas condições em que há o equilíbrio termodinâmico de suas fases imiscíveis ou parcialmente miscíveis, que afetem de forma ínfima suas principais características, pois seu meio aquoso proporciona condições amenas para tais compostos. Segundo Carvalho (2004) cada fase possui propriedades termodinâmicas intensivas (densidade, composição, condutividade e índice de refração) diferentes, além de uma região onde os valores dessas propriedades variam, tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio.

### 2.5.1 Diagrama de equilíbrio de fases

A compreensão do diagrama de fases para os SAB's é extremamente importante, pois ele é o principal componente para o início dos processos de extração. Na representação gráfica (Figura 2) a composição dos componentes do sistema é expressa em porcentagem mássica em pressão e temperatura constante. O limite entre as regiões monofásica e bifásica nesse diagrama é denominado curva binodal ou curva de equilíbrio e determina em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo. As retas que ligam dois pontos na curva binodal são chamadas de *tie-lines* ou linhas de amarração (LA), cujos valores das propriedades termodinâmicas intensivas (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), para quaisquer pontos que estejam nessa linha específica, não variam (DA SILVA e LOH, 2006).

**Figura 2.** Esquema do diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares para um Sistema Aquoso Bifásico.



As variáveis, tais como temperatura do sistema, pH do meio, massa molar do polímero e concentração dos constituintes do sistema, afetam a formação de fases e influenciam, por conseguinte, a formação dos diagramas. Portanto é imprescindível o estudo desses fatores quando se deseja entender o mecanismo de partição de um composto por um determinado SAB. Salienta-se que a preferência da molécula depende da composição e propriedades de cada fase, pois o processo de partição é fundamentado na distribuição seletiva da molécula, tornando assim essencial o conhecimento do comportamento dos dados de equilíbrio em condições pré-definidas (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Tais dados podem ser representados por sistema de coordenadas retangulares (Figura 2) onde a concentração percentual da água ocorre pela subtração simples com a composição total dos solutos (PEG e sal).

Outro componente relevante no diagrama de fases é o ponto crítico, no qual localiza-se na região mediana da curva binodal, dividindo, portanto, as fases ricas em componente 1 das fases ricas em componente 2. É no ponto crítico que as propriedades extensivas (composição, volume, entre outras) das duas fases são teoricamente iguais. Nos pontos globais próximos ao

ponto crítico pequenas alterações na composição dos sistemas podem provocar mudanças drásticas, como levar o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

Alguns trabalhos mostram a relevância do estudo dos diagramas de fases. Com o objetivo de verificar a influência da massa molar do polímero e temperatura, Murari *et al.* (2017) construíram novos dados de equilíbrio de SAB's compostos de PEG e sulfato de amônio. Eles observaram que o aumento da temperatura modificou o equilíbrio e promoveu um ligeiro aumento na região bifásica, indicando o caráter endotérmico do processo de separação de fases. Além disso, as inclinações das linhas de ligação tenderam a aumentar com o aumento da temperatura. Tais constatações permitem determinar as condições de partição de dada biomolécula sensível à alguma faixa de temperatura, além de possibilitar reduzir gastos de reagentes potencializando a partição e otimizado tal processo.

He *et al.* (2017) desenvolveram dados de equilíbrio à base de líquidos iônicos de n-alquil-tropinium, n-alquil-quinolínio e sal em um gradiente de temperaturas. Com base nesses novos diagramas, foi obtido um novo método de extração de ginsenosídeos a partir de extratos brutos de *Panax Ginseng C. A. Mey* usando SAB's formados por líquidos iônicos.

### **2.5.2 Coeficiente de partição**

A partição desigual de dada biomolécula entre duas fases ocorre devido às interações químicas entre esta e os outros componentes (polímeros, água e sais inorgânicos) do sistema. A distribuição desses materiais biológicos nas fases do SAB é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição (K), sendo a razão entre a concentração da molécula a ser purificada na fase superior e inferior do SAB (ALBERTSSON, 1986).

Segundo Oliveira *et al.* (2010) para que ocorra a purificação parcial expressiva, a biomolécula de interesse deve ser preferencialmente particionada para uma das fases, enquanto que os demais contaminantes migrem para a outra fase do SAB. Tal distribuição entre as fases ocorre devido inúmeras interações entre o composto a ser purificado e os componentes do sistema (polímeros, H<sub>2</sub>O e/ou sais inorgânicos) coexistindo em equilíbrio nas duas fases (FARRUGGIA *et al.*, 2003). As interações intermoleculares como as ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e iônicas, interações estas que incidem entre as biomoléculas e a fase geralmente são precípuas para que ocorra o particionamento da biomolécula. Nesse sentido, o valor de K varia de acordo a condição submetida diante de fatores como: tamanho, carga, hidrofobicidade da molécula, concentração e massa molar do polímero, tipo e concentração do sal utilizado e o pH (NAGARAJA e IYYASWAMI, 2014).

Outros fatores também influenciam para o valor de  $K$ , como as propriedades físico-químicas do sistema e do polímero, principalmente quando se trata da partição de moléculas complexas como proteínas, uma vez que a purificação não deve inativar suas funções (a atividade catalítica no caso de enzimas). O tamanho, a conformação (estrutura secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura primária), presença de carga elétrica e hidrofobicidade da proteína influenciará de forma direta nesse processo. Portanto, proteínas com diferentes composições e sequências de aminoácidos possuem diferentes características de carga e hidrofobicidade. As propriedades superficiais dessas moléculas, então, sofrerão a influência da posição dos aminoácidos em sua cadeia, determinando os tipos de interações que ocorrerão, definindo assim, por qual fase a molécula terá mais afinidade. As interações que podem governar a partição dessa biomolécula são interações de cargas, interações entre as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (FORCINITI *et al.*, 1991).

A natureza química dos elementos formadores do SAB, a massa molar e concentração dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína, o pH, a temperatura e a adição de sais inorgânicos também são fatores que podem influenciar na distribuição do composto de interesse nas fases (CHAIWUT *et al.*, 2010).

Fakhari *et al.*, 2017 observaram que o pH do sistema teve efeito nas interações eletroquímicas do SAB formado por PEG 6000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e sulfato de sódio. Nesse estudo o aumento do pH modificou a composição iônica das fases, a proporção das espécies carregadas presentes no extrato fermentado, em que a carga líquida da xilanase passou a ser negativa. Além disso, relataram que em pH mais alto, a biomolécula carregada negativamente particionou para a fase superior, pois houve o aumento do  $K$ . Isso ocorreu devido a um momento de dipolo positivo ocasionado pela presença de grupos hidroxilas terminais do PEG à medida que a fase rica em sal (fase inferior) consistia de maior quantidade de cargas negativas devido à presença de sulfato. Tais mudanças de cargas ocasionaram a repulsão da enzima para a fase rica em sal.

Além da influência de natureza química, a fase rica em grandes moléculas (fase superior) no sistema pode acarretar a partição de biomoléculas através do efeito entrópico da repulsão estérica, uma vez que duas macromoléculas não podem ocupar o mesmo espaço em um mesmo momento. Esses espaços intersticiais ocupados na fase superior acarreta a diminuição da solubilidade das proteínas na fase polimérica (RAWDKUEN *et al.*, 2010).

Wanderley *et al.* (2017) verificaram que os polímeros com grande massa molar criam um efeito repulsivo na partição de colagenase em SAB constituído por PEG 8000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e fosfato de sódio, o que leva a uma diminuição do coeficiente de partição. Segundo os autores,

essa diminuição pode estar associada à maior hidrofobicidade da fase superior, além do efeito de exclusão de volume resultante de valores elevados da massa molar de PEG.

Outro efeito na partição de biomoléculas é o *salting out*, que ocorre em virtude da migração de água para fase superior e conseqüentemente o aumento da concentração do sal, resultando na diminuição da solubilidade das biomoléculas na fase inferior promovendo a partição para a fase superior. Sistemas compostos por elevadas concentrações de polímero ou alto peso molar do mesmo e com a fase inferior simultaneamente concentrada em sal resultam na distribuição das biomoléculas para a interfase, devido à influência dos efeitos citados, volume de exclusão e *salting out*.

Em estudo sobre a purificação de queratinase por SAB's constituído por PEG 1500 e fosfato de potássio, pH 7,0 Sala *et al.* (2014) observaram o efeito *salting out*, onde a solubilidade da biomolécula na fase rica em sal (fase inferior) foi reduzida com o aumento da concentração de sal, uma vez que as interações entre a biomolécula e a água foram limitadas pela maior interação sal-água, resultando na partição da biomolécula para a fase superior, pois havia espaço suficiente para acomodar as moléculas, ou seja, não ocorreu a repulsão estérica. Carvalho *et al.* (2017) também observaram que a protease fermentada por *Yarrowia lipolytica* em meio YPD (p/v: extrato de levedura a 1%; peptona a 2%; glicose a 2%) foi preferencialmente particionada para a fase superior rica em PEG. Tal comportamento é justificado com o fato de que quanto maior a concentração de sal, menor a solubilidade da proteína na fase inferior rica em sal, orientando a sua partição para a fase superior rica em polímero.

A separação das fases do SAB ocorre em função do equilíbrio químico e termodinâmico, assim como a partição de biomoléculas entre essas fases pode ser resultado de interações como forças de van de Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, interações entre cargas e interações iônicas (GÜNDÜZ e KORKMAZ, 2000).

## **2.6 Modelos termodinâmicos**

### **2.6.1. Métodos de contribuição de grupos**

O conceito da contribuição de grupos foi introduzido por Langmuir (1925) e trata uma substância como um conjunto de grupos funcionais, podendo-se determinar as propriedades da substância somando-se as contribuições individuais de cada um dos grupos que a constituem. Por exemplo, a molécula de PEG não deve ser estudada apenas como uma molécula de PEG e sim pelos grupos funcionais que formam essa molécula, os quais são CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>O e OH. Dentre esses métodos tem-se o UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient model), que nesse

trabalho foi utilizado para as estimativas dos coeficientes de atividade. A vantagem do UNIFAC é que ele permite representar uma quantidade muito grande de substâncias partindo de uma pequena quantidade de grupos (TESTER e MODELL, 1996).

O cálculo do coeficiente de atividade através desse método é expresso por duas partes: combinatorial e residual. A parte combinatorial leva em consideração diferenças na forma e tamanho entre as moléculas na mistura e pode ser identificada como uma contribuição entrópica. Já a parte residual considera as interações energéticas entre os grupos que compõem as moléculas e pode ser identificada como uma contribuição entálpica (OLIVEIRA, 2010).

### 2.6.2 Modelo UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient model)

O modelo UNIFAC desenvolvido por Prausnitz e colaboradores (FREDENSLUND *et al.*, 1975) utiliza o conceito de contribuição de grupos para o cálculo dos coeficientes de atividade. Sendo assim, o coeficiente de atividade de cada componente é a soma de todas as interações binárias entre os grupos funcionais desse componente com todos os outros grupos dos componentes que compreendem a mistura (TESTER e MODELL, 1996).

Para que o modelo UNIFAC possa ser implementado, é necessário que seja efetuada correlações satisfatórias de dados de atividade obtidos experimentalmente para obter parâmetros que caracterizam interações entre pares de grupos estruturais nos sistemas. Posteriormente, estes parâmetros podem ser utilizados para prever atividades em outros sistemas que não foram estudados experimentalmente mas que contêm os mesmos grupos funcionais (OISID e PRAUSNITZ, 1978).

O modelo apresenta o coeficiente de atividade como a soma de uma parte combinatorial e uma residual. Conforme pode ser observado na equação 1.

$$\ln\gamma_i = \ln\gamma_i^{com} + \ln\gamma_i^{res} \quad (1)$$

A parte combinatorial do método UNIFAC é dada pela equação 2 (REID *et al.*, 1987).

$$\ln\gamma_i^{com} = \left( \ln \frac{\varphi_i}{x_i} + 1 - \frac{\varphi_i}{x_i} \right) - \frac{z}{2} q \left( \ln \frac{\varphi_i}{\theta_i} + 1 - \frac{\varphi_i}{\theta_i} \right) \quad (2)$$

Onde:

$$\varphi_i^* = \frac{r_i x_i}{\sum_j r_j x_j} \quad (2.1)$$

$$\theta_i = \frac{q_i x_i}{\sum_j q_j x_j} \quad (2.2)$$

$$r_i = \sum_k V_k^{(i)} R_k \quad (2.3)$$

$$q_i = \sum_k V_k^{(i)} Q_k \quad (2.4)$$

As nomenclaturas dos parâmetros da parte combinatorial, relacionados à equação 2 são:

$r_i$  é o parâmetro de volume para o componente  $i$ ;

$Z$  é o número de coordenação;

$q_i$  é o parâmetro de área superficial para o componente  $i$ ;

$\varphi_i^*$  é a fração volumétrica do componente em termos de  $r_i$  ;

$\theta_i$  é a fração de área superficial do componente;

$V_k$  é o número de grupos do tipo  $k$  na molécula  $i$ .

Os valores dos parâmetros de volume e área de grupo  $R_k$  e  $Q_k$ , respectivamente, estão tabelados na literatura (REID *et al.*, 1987).

Os parâmetros dos componentes puros,  $r_i$  e  $q_i$  (ou  $r_j$  e  $q_j$ ), são, respectivamente, medidas moleculares de volumes de Van der Waals e áreas superficiais.

A parte residual é composta pelas contribuições individuais de cada grupo presente na solução, menos a soma das contribuições individuais dos mesmos grupos no componente puro. Por exemplo, em um sistema formado por polietilenoglicol (PEG), sulfato de de sódio e água, teremos os seguintes grupos funcionais,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . O  $\text{CH}_2$ , por exemplo, faz parte da estrutura do PEG, então a parte residual deste componente será a contribuição que ele tem com todas as moléculas menos a contribuição que ele tem com as moléculas do PEG ( $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ). Este termo constitui a chamada "solução por grupos", onde as contribuições individuais de cada grupo são funções da concentração e da temperatura (WILSON e DEAL, 1962), como apresentado na equação 3.

$$\ln y_i^r = \sum_k^{\text{grupos}} v_k^{(i)} (\ln \Gamma_k - \ln \Gamma_k^{(i)}) \quad (3)$$

Os coeficientes de atividade residual dos grupos são dados pela equação 4.

$$\ln \Gamma_k = Q_k \left[ 1 - \ln(\sum_m \theta_m \Psi_{mk}) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{km}}{\sum_n \theta_n \Psi_{nm}} \right] \quad (4)$$

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n \theta_n X_n} \quad (4.1)$$

$$X_m = \frac{\sum_i^M V_m^{(i)} X_i}{\sum_i^M \sum_j^N V_j^{(i)} X_i} \quad (4.2)$$

Sendo que  $\theta$  e  $X_m$  são a fração de área do grupo  $m$  e a fração molar do grupo  $m$ , respectivamente. O coeficiente de atividade residual é definido como função da fração de grupo  $X_m$ .

Na contribuição residual, as interações entre os grupos são expressas em termos de parâmetros, dados pela equação 4.3.

$$\Psi_{mn} = \exp \left[ -\frac{U_{mn} - U_{nm}}{RT} \right] = \exp \left( -\frac{U_{mn}}{T} \right) \quad (4.3)$$

Parâmetros de interação de grupos,  $U_{mn}$ , podem ser avaliados a partir de dados experimentais de equilíbrio de fases. Notar que  $U_{mn}$  tem unidade de Kelvin e  $U_{mn} \neq U_{nm}$ . Os parâmetros  $U_{mn}$  e  $U_{nm}$  são obtidos a partir de um banco de dados utilizando uma grande quantidade de resultados experimentais.

Parâmetros de interação de grupo  $a_{mn}$  para uma grande quantidade de grupos foram sistematicamente reportados por vários autores, como Zarkarian *et al.* (1979), Herskowitz e Gottlieb (1981), Gmehling *et al.* (1982), Macedo *et al.* (1983), Tiegs *et al.* (1987) e Hansen *et al.* (1991). A aplicação do modelo UNIFAC a sistemas contendo sais foi feita por Kikic *et al.* (1991) e Dahl e Macedo (1992). A diferença entre as duas abordagens é que Kikic e colaboradores consideraram um sal como composto de dois grupos, cátion e ânion, enquanto Dahl e Macedo consideraram um sal como sendo um grupo funcional diferenciado. Em 1996, Aznar utilizou a abordagem de Dahl e Macedo para representar o equilíbrio líquido-vapor de sistemas binários e ternários contendo sais.

A modelagem termodinâmica de sistemas aquosos bifásicos constituídos por polímeros apresenta inúmeras dificuldades relacionadas ao comportamento das soluções poliméricas no que se refere à caracterização das fases, tamanho da cadeia e interação entre as moléculas do polímero e do solvente (HUANG *et al.*, 2001).

### 3 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo geral a obtenção de dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG, sais de sulfato e água e aplicação na partição de amilases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 10535 utilizando fermentação em estado sólido.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Obter dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 4000 ou 6000, sais de sulfato e água no valor de pH de 6,5 à temperatura de 25 °C;
- Estudar a influência da massa molar do polímero e dos cátions sobre as curvas binodais, comprimento das linhas de amarração obtidas;
- Utilizar os dados de equilíbrio obtidos pela regra da alavanca para estimar parâmetros de interação de grupo para o modelo de contribuição de grupo UNIFAC;
- Obter linhas de amarração de mesmo comprimento para todos sistemas pelo modelo UNIFAC e aplicar os resultados obtidos de forma experimental;
- Obter amilases produzidas por *Aspergillus niger* por meio da fermentação em estado sólido de resíduo de mandioca;
- Avaliar a partição da amilase nos sistemas aquosos bifásicos estudados com base no coeficiente de partição da proteína ( $K_p$ ), atividade enzimática ( $K_e$ ), recuperação teórica ( $Y$  %) e energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta G$ ).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local do experimento**

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Itapetinga.

### **4.2 Material**

Foram utilizados os reagentes Potato Dextrose Agar, Himedia (MUNBAI, Índia); os polímeros polietilenoglicol 4000 g.mol<sup>-1</sup> (CAS No. 25322-68-3) foi obtido da Neon (São Paulo, Brasil) e polietilenoglicol 6000 g.mol<sup>-1</sup> (CAS No. 25322-68-3) utilizado nesse trabalho foi obtido da Synth (São Paulo, Brasil); os sais inorgânicos sulfato de amônio (CAS No. 7783-20-2) e sulfato de sódio (CAS No. 7757-82-6) foram adquiridos da Fmaia (Minas Gerais, Brasil) e o sulfato de lítio (CAS No. 10377-48-7) foi adquirido da VETEC BRASIL. A pureza dos materiais utilizados estão disponíveis na Tabela 1. Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados sem purificação adicional. O resíduo de mandioca utilizado foi obtido no comércio local da cidade de Itapetinga – BA, a partir da remoção de partes secas e indesejadas (casca, entrecasca e pontas) para a venda do tubérculo.

### **4.3 Métodos**

#### **4.3.1 Condições de cultivo do micro-organismo**

Neste estudo foi utilizado o fungo filamentosso *Aspergillus niger* ATCC 10535 cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro - RJ), sendo esta cepa isolada, caracterizada e depositada no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS. Rio de Janeiro, RJ), sob o registro de número: 40018 e lote: 068840018. Este fungo vem sendo periodicamente preservado em sílica e glicerol e mantido sob refrigeração à 2 °C. A inoculação deste fungo foi realizada em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e sua incubação conduzida a 30 °C em estufa bacteriológica (SL 222; Solab) durante 7 dias. Após o período de incubação, a cultura esporulada foi submetida a uma raspagem com auxílio de pérolas de vidro e suspensa em água destilada, ambos previamente esterilizados em autoclave vertical a 121 °C por 15 min. A suspensão foi coletada em frasco Erlenmeyer e uma alíquota de 0,1 mL foi tomada e diluída em tubo de ensaio para a contagem do número de esporos em microscópio binocular (L1000; Bioval) utilizando câmara de Neubauer.

### **4.3.2 Preparação do substrato**

O resíduo de mandioca (casca, entrecasca e pontas) utilizado no experimento foi obtido no comércio local de Itapetinga-Ba. Após serem lavados e higienizados, estes foram secos em estufa com circulação de ar a 65 °C em estufa (SL 102; Solab) até atingir uma de umidade de 8% b.s. Após a secagem, o resíduo foi triturado em moinho de facas tipo Willey (EDB-5; DeLeo, POA) para a obtenção de partículas com 2 mm. Posteriormente, estes foram armazenados em sacos de polietileno de baixa densidade até o momento de serem utilizados.

### **4.3.3 Fermentação em estado sólido**

Dez gramas do resíduo previamente seco foram acondicionados em erlenmeyer de 250 mL e logo após autoclavados a 121°C por 15 minutos. Foi inoculado o volume de solução de esporos necessário para se atingir uma concentração de  $10^7$  esporos por grama de resíduo (TUNG *et al.*, 2004). Foi adicionada água destilada estéril ao resíduo até a umidade ótima de 45% (CRUZ *et al.*, 2011; PEREIRA, 2015). Foram utilizados 15 biorreatores, incubados a 30 °C em estufa bacteriológica, sendo utilizado 3 biorreatores para cada período de tempo testado: 36h, 42h, 48h, 54h e 60h. Nas primeiras 24 horas o micro-organismo se encontra no processo de adaptação e multiplicação, portanto nesse período de fermentação com intervalos de 6 horas é possível a quantificação da atividade das enzimas amilolíticas produzidas pelo fungo.

### **4.3.4 Preparo do extrato e precipitado enzimático**

Após cada período de fermentação, em cada biorreator foi adicionado 20 mL de água destilada e deixado sob agitação em shaker de bancada Quimis, por 30 minutos a 30 °C e centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos a 4 °C (Centrifuga CentriBio 310). Para que ocorresse a precipitação das enzimas, ao sobrenadante de cada período foi adicionado sulfato de amônio até a saturação (50% da massa total do sobrenadante) à 4 °C (PURWANTO, 2016).

### **4.3.5 Determinação da atividade enzimática**

A atividade amilolítica foi determinada utilizando metodologia adaptada de Okolo *et al.* (1995). A solução reativa consistiu de 0,5 mL de solução 5mg/mol de amido de milho em tampão acetato (pH 5,6) e 0,5 mL de solução 3,5% de precipitado enzimático em água destilada. Essa mistura foi submetida à incubação por 30 minutos a 50 °C. Os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), sendo a solução de glicose o padrão (ANEXO 1) conforme Miller (1959), cujo comprimento de onda de 540 nm utilizando espectrofotômetro (BIOCHROM, modelo 570 Libra). Nas condições de ensaio descritas, uma

unidade de atividade enzimática libera 1µmol de açúcar redutor por mL de extrato por minuto (GHOSE, 1987).

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{AR_T \times V_T}{0,18 \times V_C \times T_H} \quad (5)$$

Onde:

U: Unidade de atividade enzimática

AR<sub>T</sub>: Açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg/mL);

V<sub>T</sub>: Volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume do caldo) (mL); V<sub>C</sub>: Volume do caldo utilizado na hidrólise (mL);

T<sub>H</sub>: Tempo de hidrólise (min.);

0,18: Massa de 1µmol de glicose.

Os ensaios foram conduzidos em triplicatas, havendo ainda o preparo de uma reação controle, que consistiu na solução reativa submetida à análise pelo método DNS sem a fase de incubação para formação de açúcares redutores.

#### **4.3.6 Teor de proteínas no extrato enzimático**

A quantificação de proteínas totais no extrato enzimático foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando espectrofotômetro (BIOCHROM, modelo 570 Libra), com comprimento de onda fixado em 595 nm. A curva analítica (ANEXO 1) foi construída utilizando como padrão a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA).

#### **4.3.7 Determinação das curvas binodais**

Foram realizados estudos prévios para a seleção dos sais, devido à elevada influência dos íons na precipitação das enzimas. Soluções concentradas dos polímeros PEG 6000 (60% m/m), PEG 4000 (60% m/m) e dos sais (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40% m/m), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18% m/m), Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25% m/m) foram preparadas. As soluções estoque dos sais (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram corrigidas com as bases correspondentes NH<sub>4</sub>OH e NaOH até a obtenção do pH 6,5. A solução estoque do sal Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> possui pH básico (≅ 9,0), portanto foi corrigida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até a obtenção do pH 6,5. As soluções foram mantidas em banho termostático (Tecnal, Te- 184, Piracicaba, Brasil) com precisão ±0,1 °C para que permanecessem na temperatura de 25 °C.

O método para estabelecer as curvas binodais foi segundo descrito por Albertsson (1971), mediante a turbidez, onde é observado diretamente a formação de uma segunda fase. O procedimento consistiu em pesar 1,00 g da solução estoque de PEG (60% m/m) em tubos de ensaio, em uma balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil). Os tubos

contendo solução de cada PEG foram levados ao banho termostático (Tecnal, Te- 184, Piracicaba, Brasil) com precisão  $\pm 0,1$  °C, até atingir o equilíbrio térmico em 25 °C. Foram adicionadas alíquotas da solução estoque do sal até a turvação do sistema (solução bifásica) e o volume de sal foi registrado. O sistema foi titulado com água destilada até o desaparecimento da turvação, registrando o valor de água adicionada. Esse procedimento foi repetido continuamente até a obtenção dos pontos necessários para construir a curva. A equação empírica sugerida por Hu *et al.* (2003) foi utilizada para ajuste das curvas binodais:

$$W_{SAL} = \exp(a + b(W_{PEG})^{0,5} + cW_{PEG} + d(W_{PEG})^2) \quad (6)$$

Em que  $W_{SAL}$  e  $W_{PEG}$  são as composições em fração mássica dos sais de sulfato ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e PEG, respectivamente, e  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  são parâmetros de ajuste da equação obtidos com o auxílio do software SIGMAPLOT®. A massa de água dos SAB's foram obtidas pela diferença do percentual de PEG e Sal.

#### 4.3.8 Determinação das linhas de amarração

As linhas de amarração utilizadas como base para a determinação do comprimento das linhas teóricas desenvolvidas pelo modelo UNIFAC, foram obtidas utilizando o método gravimétrico descrito por Merchuk *et al.* (1998), que consiste em selecionar um ponto acima da região bifásica, através do qual a linha de amarração vai passar. Foram utilizados dois pontos globais para cada sistema (Tabela 3), sendo os mesmos pontos para todos os sistemas. Os pontos que deram origem as linhas de amarração foram selecionados para que em todos os sistemas ocorresse a formação de fases mantendo a mesma concentração de sais e PEG nos diferentes diagramas desenvolvidos. Tais pontos foram selecionados de forma que as linhas de amarração geradas não tocassem na curva binodal de cada sistema nem excedessem o limite dessa curva, permitindo a formação de fases bem definidas.

**Tabela 3.** Composições globais para os sistemas formados por PEG (6000 g.mol<sup>-1</sup> e 4000 g.mol<sup>-1</sup>) e sais de sulfato ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), no pH 6,5 e na temperatura de 25 °C, expressas em porcentagem mássica (% m/m).

Ponto Global	PEG (%)	Sal (%)	Água (%)
1	17	10	73
2	24	9	67

As composições conhecidas dos solutos foram adicionados em tubos de centrífuga graduados de fundo cônico, a partir da massa das soluções estoques dos sais, PEG e água para uma massa total do sistema de 40 g. A mistura foi agitada vigorosamente e então centrifugada (SP LABOR, modelo Sp-701, Presidente Prudente, Brasil) a uma força centrífuga de 2000 g por 15 minutos, para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso, durante 12 horas em estufa B.O.D a 25° C para alcançar o equilíbrio das fases. Todas as soluções e diluições foram preparadas, usando balança analítica M254A (Bel Engineering, 80 Piracicaba, Brasil) com precisão de  $\pm 0,0001$  g. Alcançado o equilíbrio, utilizando seringa de 10 mL com agulhas longas, coletou-se a fase superior até que restasse uma camada de aproximadamente 3 mm desta fase acima da interface. Este procedimento visou garantir que a interface não fosse perturbada. Em seguida, após a coleta da fase superior, uma seringa foi introduzida cuidadosamente na célula de equilíbrio para a retirada da fase inferior, evitando que a interface fosse perturbada.

Após separadas, as fases foram pesadas. A concentração de cada componente nas fases coletadas foi estimada pela aplicação da regra da alavanca, na relação entre a composição em massa da fase superior e a composição total do sistema. Para determinação dos componentes da linha de amarração o seguinte sistema de quatro equações (Equações 7-10) e quatro incógnitas ( $W_{SAL}^s$ ,  $W_{SAL}^i$ ,  $W_{PEG}^s$ ,  $W_{PEG}^i$ ) foi resolvido (HU *et al.*, 2003) com o auxílio do comando solver do software Microsoft Excel:

$$W_{SAL}^s = \exp(a + b(W_{PEG}^s)^{0,5}) + cW_{PEG}^s + d(W_{PEG}^s)^2 \quad (7)$$

$$W_{SAL}^i = \exp(a + b(W_{PEG}^i)^{0,5}) + cW_{PEG}^i + d(W_{PEG}^i)^2 \quad (8)$$

$$\frac{W_{SAL}^s - W_{SAL}^M}{W_{SAL}^M - W_{SAL}^i} = \frac{m_i}{m_s} \quad (9)$$

$$\frac{W_{PEG}^M - W_{PEG}^s}{W_{PEG}^i - W_{PEG}^M} = \frac{m_i}{m_s} \quad (10)$$

Onde  $W_{SAL}^s$ ,  $W_{PEG}^s$ ,  $W_{SAL}^i$ ,  $W_{PEG}^i$ ,  $W_{SAL}^M$ ,  $W_{PEG}^M$  são as composições em fração mássica do sal e do PEG na fase superior, inferior e na mistura, respectivamente. E  $m_i$  e  $m_s$  é a massa da fase inferior e superior, respectivamente.

O comprimento da linha de amarração foi obtido utilizando a seguinte equação:

$$CLA = \sqrt{[\Delta C_1]^2 + [\Delta C_2]^2} \quad (11)$$

A inclinação da linha de amarração foi determinada pela equação:

$$ILA = \Delta C_1 / \Delta C_2 \quad (12)$$

Onde:  $\Delta C_1$  e  $\Delta C_2$  correspondem a diferença de concentração de componente 1 ( $C_1$ ) e componente 2 ( $C_2$ ) nas fases superior e inferior respectivamente expressa em % m/m.

Após, para os experimentos de partição da enzima, pontos globais teóricos foram estimados, utilizando parâmetros das linhas de amarração empregadas como base, sendo fixados os comprimentos de 37 CLA para os sistemas compostos por PEG e de 30 para os sistemas compostos por PEG 4000. Além desses, foram consideradas as propriedades: temperatura 25 °C e pH 6,5. Todos esses dados foram assimilados no modelo UNIFAC e foram selecionados pontos globais centrais de cada linha, onde o volume das fases possuem valores próximos.

#### 4.3.9 Partição

As LA experimentais baseadas nas LA teóricas foram utilizadas para a construção dos sistemas aquosos bifásicos utilizados para a partição das enzimas em estudo. Os sistemas foram formados com quantidades adequadas de solução estoque de PEG, sais de sulfato e água e 0,07g da enzima precipitada, para uma massa total de 5 g, em tubos de centrífuga cônico, misturados e mantidos em repouso por 12 horas em estufa B.O.D na condição de pH e temperatura determinada. Após os sistemas atingirem o equilíbrio, as fases foram coletadas com seringas de agulhas finas, para posterior determinação do teor de proteína da atividade enzimática.

#### 4.3.10 Determinação dos parâmetros da partição

O coeficiente de partição para atividade enzimática ( $K_e$ ) definido como a atividade enzimática (U/mL) nas fases Superior ( $U_{sup}$ ) e Inferior ( $U_{inf}$ ) do sistema foi determinada conforme descrito pela Equação 13.

$$K_e = \frac{[U]_{sup}}{[U]_{inf}} \quad (13)$$

O coeficiente de partição da proteína ( $K_p$ ), o qual é a relação entre a concentração de equilíbrio (mg / mL) da proteína total na fase superior ( $C_{sup}$ ) e inferior ( $C_{inf}$ ) foi determinado como descrito na equação 14.

$$K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (14)$$

Para selecionar o SAB com melhor capacidade de extração das proteínas estudadas, foi calculada a recuperação teórica (Y %) do sistema, utilizando-se a equação 15 (PICÓ *et al.*, 2006):

$$Y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_e)} \quad (15)$$

Onde R corresponde a razão entre os volumes da fase superior e inferior e Ke corresponde ao coeficiente de partição de atividade das amilases.

O cálculo dos coeficientes de atividade foi realizado utilizando-se o modelo UNIFAC, descrito no item 2.6.2. Para o modelo de contribuição de grupos, os valores dos parâmetros foram utilizados nos cálculos de cada grupo estão dispostos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros  $R_k$  e  $Q_k$  adimensionais utilizados nesse trabalho.

Grupo k	$R_k$	$Q_k$	Referências
CH <sub>2</sub>	0,6744	0,5400	Hansen <i>et al.</i> , 1991
CH <sub>2</sub> O	0,9183	0,7800	Magnussen, 1981
OH <sup>-</sup>	1,0000	1,2000	Hansen <i>et al.</i> , 1991
C	0,2195	0,0000	Magnussen, 1981
COO <sup>-</sup>	1,0020	0,8800	Pinto, 2015
Na <sup>+</sup>	3,0000	3,0000	Bondi, 1968
H <sub>2</sub> O	0,9200	1,4000	Hansen <i>et al.</i> , 1991

#### 4.3.11 Energia livre de Gibbs

A energia de Gibbs é composta de uma parcela entrópica e uma parcela entálpica. A parcela entrópica é responsável pelas interações dos grupos funcionais e consequentemente pela contribuição configuracional (número de interações), sendo diretamente relacionada com o tamanho de partícula do soluto, já que quanto maior o seu tamanho, maior será a variação correspondente a essa propriedade, uma vez que a inserção desta molécula no meio perturba a ordem já estabelecida de seus constituintes. A parcela entálpica está relacionada com dois efeitos: a formação de uma cavidade no meio composto por solvente (MELANDER e HORVATH, 1977) e a variação da energia quando há a inserção de uma molécula nesta

cavidade formada. Os parâmetros de interação no primeiro somatório dizem respeito à inserção, ao passo que os parâmetros de interação do segundo somatório representam as interações entre todos os componentes do sistema que devem ser rompidas para que a cavidade seja formada.

A partição destes entre as fases do SAB pode ser melhor compreendida em termos de interações intermoleculares na mistura, descritas pelo parâmetro termodinâmico chamado de energia livre de Gibbs,  $\Delta G$  e calculada pela relação clássica da termodinâmica.

$$\Delta G = -RT \ln K_p \quad (16)$$

Que relaciona diretamente o coeficiente de partição  $K_p$ , com a variação da energia. Este parâmetro informa a energia total envolvida no processo de transferência do soluto de uma fase para a outra do SAB (BRITO, 2007).

O processo de partição é dito espontâneo, quando o valor do parâmetro termodinâmico  $\Delta G$  for negativo, ou seja, a partição do composto ocorrerá com o objetivo de minimizar a energia livre de Gibbs do sistema em temperatura e pressão constantes. Portanto, um SAB será formado se a sua configuração possuir a menor energia de Gibbs (DA SILVA, 2001).

A energia livre de Gibbs, entropia e entalpia são as propriedades termodinâmicas que tem maior contribuição em relação a separação de compostos em Sistemas Aquosos Bifásicos.

#### 4.3.12 Cálculo dos volumes de exclusão

O volume de exclusão foi determinado utilizando as massas e concentrações experimentais obtidos na confecção das curvas binodais. Esses dados foram inseridos no programa Origin 6 que utiliza o método numérico Levenberg-Marquadt para que o ajuste acontecesse e se determinasse o volume de exclusão pela Equação 17.

$$\ln \left( V_{213}^* \frac{w_2}{M_2} + f_{213} \right) + \left( V_{213}^* \frac{w_1}{M_1} \right) = 0 \quad (17)$$

Onde o  $V_{213}^*$  e  $f_{213}$  indicam o volume de exclusão do sal e a fração volumétrica efetiva do sal na fase polimérica,  $M$  e  $w$  representam a massa molecular e a fração de massa, os índices "1" e "2" mostram referência à quantidade de PEG e sal respectivamente, nas fases.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Diagramas de equilíbrio

Os dados de equilíbrio termodinâmico são representados graficamente em diagramas de fases e expressam as concentrações do sistema bifásico em condições fixas de temperatura e pressão para que haja formação da região bifásica. Essa separação gráfica é fundamental para os estudos de separação da molécula de interesse, já que consistem no ponto de partida para o processo de extração.

Os valores obtidos experimentalmente para os parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) no delineamento das curvas binodais dos sistemas compostos por PEG, sais de sulfato e água, onde foi variada a massa molar do PEG (4000 ou 6000) e os cátions dos sais de sulfato ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{Li}^+$ ) na temperatura de 25 °C, foram ajustados a equação não linear (Equação 6) proposta por Hu *et al.* (2003). Os valores obtidos para os parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$ , bem como  $R^2$  da equação ajustadas para os sistemas estudados estão apresentados na Tabela 5. Com base nos valores de  $R^2$  pode-se observar que a equação se ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais.

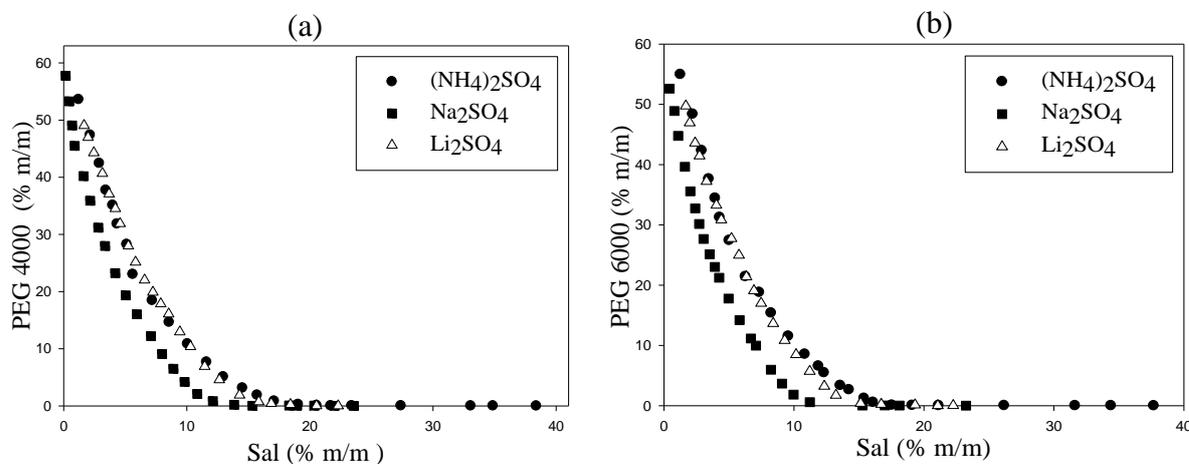
**Tabela 5.** Parâmetros ajustados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos para os sistemas PEG e sais de sulfato pela equação de Hu *et al.* (2003)

Sal	$A$	$b$	$c$	$d$	$R^2$
PEG 4000					
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-0,2164	-2,9682	-4,0614	-70,6392	0,9966
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-0,337	-5,1034	6,6267	-186,2909	0,9983
$\text{Li}_2\text{SO}_4$	-0,0907	-5,8064	10,6834	-138,2108	0,9983
PEG 6000					
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,275	-9,438	18,858	-147,914	0,995
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-0,256	-6,098	9,180	-230,267	0,998
$\text{Li}_2\text{SO}_4$	0,562	-14,255	39,601	-247,603	0,9993

#### 5.1.1 Efeito dos cátions nos diagramas de equilíbrio

Nesse estudo os cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Li}^+$  são monovalentes e a influência desses estão dispostos nos diagramas na Figura 3.

**Figura 3.** Diagramas de fases formados por PEG: (a) PEG 4000, (b) PEG 6000 e (●)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (■)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ( $\Delta$ )  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  a 25 °C e pH 6,5.



Os dados de equilíbrio para os sistemas PEG 4000 e PEG 6000 tiveram o mesmo comportamento (Figura 3), ou seja, em ambos foi observado que as curvas binodais compostas por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  ( $\Delta$ ) se sobrepõem e divergem da composta por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , onde a curva binodal com maior região bifásica foi composta por PEG e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e, por conseguinte, menores concentrações dos compostos foram necessárias para a formação da curva.

Para compreender esse comportamento, o volume de exclusão foi calculado com base nos dados experimentais das curvas binodais e os resultados estão apresentados na Tabela 11 no item 5.3.

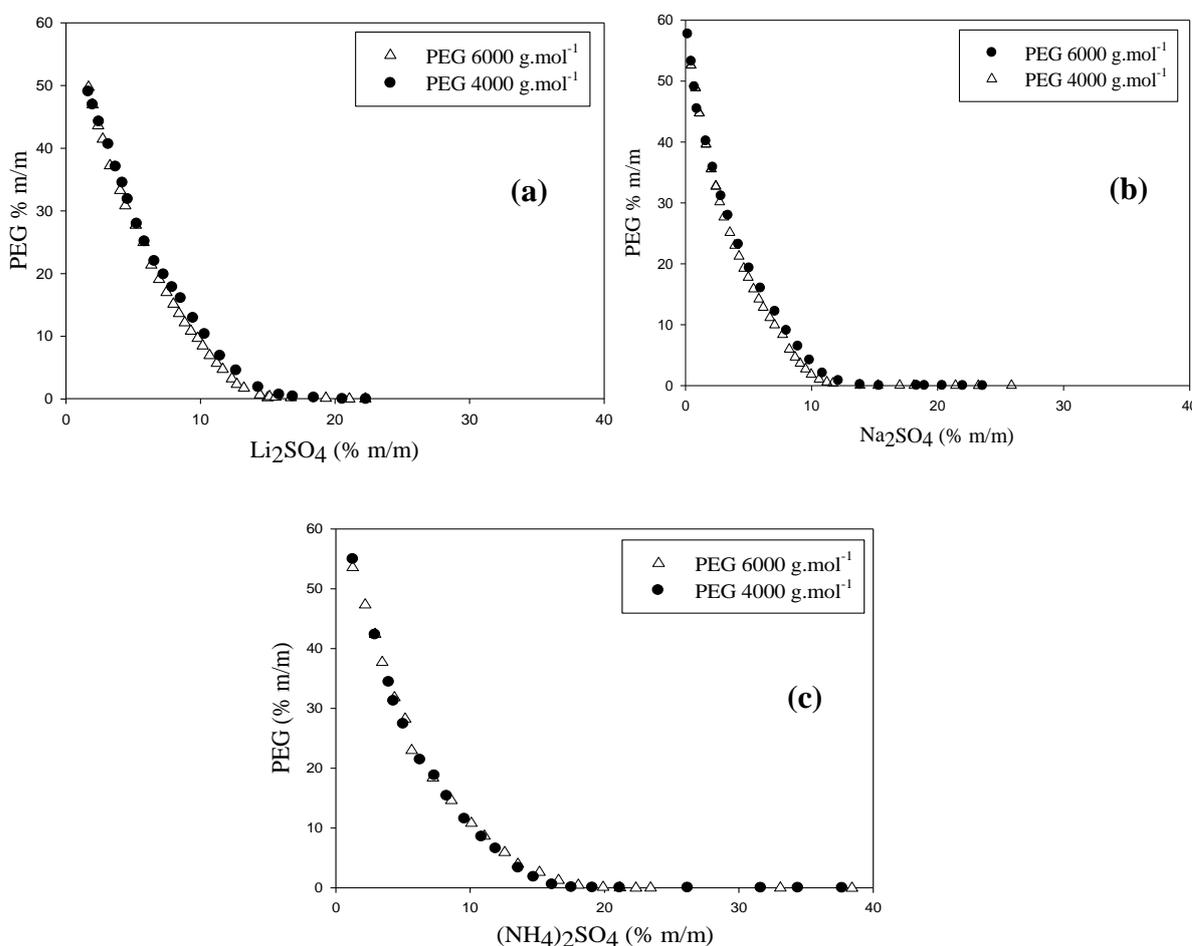
Pôde-se observar que com o aumento da massa molar dos sais e do polímero ocorreu o aumento do volume de exclusão, isto é, os espaços vazios disponíveis para interações moleculares teve uma tendência a aumentar. Assim, o aumento do volume de exclusão segue a sequência  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e PEG 6000 >  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e PEG 4000 >  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e PEG 6000 >  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e PEG 4000 >  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  e PEG 6000 >  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  e PEG 4000.

O efeito de volume de exclusão é ocasionado pelo aumento da massa molar ou concentração do composto, que ocupa os espaços intersticiais da fase ocasionando o aumento da solvatação das moléculas (PEREIRA, 2015; NASCIMENTO, 2016). Nesse sentido, por possuir mais espaços vazios entre as moléculas, o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  interage com uma quantidade maior de água que os demais sais, sendo necessária uma quantidade menor de sal para ocasionar saturação no sistema e consequentemente a formação de fases, promovendo a ampliação da área bifásica.

### 5.1.2 Efeito da massa molar do polímero nos diagramas de equilíbrio

Os diagramas formados por  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  e PEG, por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e PEG e por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e PEG estão dispostos na Figura 4.

**Figura 4.** Diagramas de fases para os sistemas formados por PEG ( $\Delta$ ) 6000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , ( $\bullet$ ) 4000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e (a)  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , (b)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , (c)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4000.



Os resultados encontrados no presente estudo mostram que a massa molar do polímero não influenciou no tamanho da região bifásica em todos os sistemas. Wysoczanska e Macedo (2016) encontraram resultados similares em sistemas compostos por PEG 4000 e PEG 6000 com tartarato de potássio e de sódio a 25 °C. No entanto tais constatações divergem dos encontrados por Silva (2014) que observou um pequeno acréscimo na separação das fases de acordo o aumento da massa de polietilenoglicol em sistemas compostos por PEG 2000, 4000 e 6000 e Sulfato de amônio a 25 °C.

Carvalho (2004) descreve que conforme aumenta a massa do polímero ocorre o aumento considerável da entropia configuracional, reduzindo assim a entropia do sistema. A entropia conformacional da molécula de PEG aumenta com a rotação das ligações de carbono da forma

TRANS para a CIS, ficando mais energéticas. Nesse processo de envelhecimento ocorre a redução dos sítios de ligações, reduzindo simultaneamente a solubilidade, provocando a transferência das moléculas de água da fase superior para a fase inferior.

### **5.1.3 Estudo do comportamento das linhas de amarração**

As composições globais e de equilíbrio, da fase superior e da fase inferior, os CLA e as ILA dos SAB's testados estão dispostas nas Tabelas 7 e 8. Para cada diagrama, foram determinados dados para duas linhas de amarração, com as mesmas concentrações dos constituintes no ponto global.

**Tabela 6.** Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 4000 g.mol<sup>-1</sup> (W<sub>peg</sub>), sais de sulfato (W<sub>sal</sub>) e água (W<sub>água</sub>), pH 6,5 a 25 °C.

Linhas de amarração	CLA	ILA	Composição global			Fase superior			Fase inferior		
			W <sub>peg</sub>	W <sub>sal</sub>	W <sub>água</sub>	W <sub>peg</sub>	W <sub>sal</sub>	W <sub>água</sub>	W <sub>peg</sub>	W <sub>sal</sub>	W <sub>água</sub>
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>											
1	30,52	-2,61	17	10	73	29,96	5,03	65,01	1,46	15,96	82,58
2	38,42	-2,26	24	9	67	35,44	3,94	60,62	0,3	19,48	80,22
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>											
1	40,87	-2,59	17	10	73	38,3	1,78	59,92	0,17	16,49	83,34
2	45,08	-2,27	24	9	67	41,28	1,4	57,32	0,02	19,55	80,43
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>											
1	28,98	-2,24	17	10	73	28,06	5,06	66,87	1,61	16,87	81,52
2	36,72	-1,48	24	9	67	30,53	4,58	64,89	0,08	25,10	74,82

**Tabela 7.** Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 6000 g.mol<sup>-1</sup> (W<sub>peg</sub>), sais de sulfato (W<sub>sal</sub>) e água (W<sub>água</sub>), pH 6,5 a 25 °C.

Linhas de amarração	CLA	ILA	Composição global			Fase superior			Fase inferior		
			W <sub>peg</sub>	W <sub>sal</sub>	W <sub>água</sub>	W <sub>peg</sub>	W <sub>sal</sub>	W <sub>água</sub>	W <sub>peg</sub>	W <sub>sal</sub>	W <sub>água</sub>
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>											
1	34,15	-2,64	17	10	73	32,45	4,15	63,4	0,51	16,24	83,25
2	40,76	-2,35	24	9	67	37,59	3,23	59,18	0,08	19,17	80,75
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>											
1	41,02	-2,61	17	10	73	38,47	1,76	59,77	0,17	16,46	83,37
2	44,75	-2,23	24	9	67	40,86	1,45	57,69	0,02	19,74	80,24
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>											
1	31,29	-2,44	17	10	73	30,11	4,64	65,25	1,15	16,49	82,37
2	37,10	-1,65	24	9	67	31,77	4,32	63,91	0,04	23,54	76,42

Diante dos resultados expostos nas Tabelas 6 e 7, pode ser observado que a fração do PEG é maior na fase superior, independente do cátion e da massa do polímero. As frações mássicas da água nos sistemas possuem valores próximos, no entanto é observado que a fase inferior possui um valor maior desse componente em relação a fase superior. A disponibilidade da água na fase superior pode ocorrer devido a camada de solvatação formada por moléculas de água ao redor do PEG. Essas interações PEG-água em que a entropia translacional das moléculas de água é reduzida pode justificar a elevada concentração dos sais nas fases inferiores interagindo com maior fração mássica de água em todas as LA's onde provavelmente há maior número de moléculas para que ocorra solvatação.

Os sistemas formados por PEG e sulfato de sódio apresentaram valores superiores de CLA em relação aos demais, ou seja, os sistemas compostos com os cátions  $\text{Na}^+$  estão associados à maior seletividade na partição de biomoléculas. Portanto, quanto menor o comprimento da linha de amarração, associada a uma dada composição global do sistema, mais próximo a 1 será o valor do coeficiente de partição da biomolécula de interesse (SILVA e LOH, 2006).

A ILA não apresentou com comportamento com a variação da dos cátions e da massa do polímero. Todavia, Sampaio (2012) e Carvalho (2004) observaram que o aumento da ILA ocorreu quando a havia na fase superior maior quantidade de PEG.

#### **5.1.4 Modelos das linhas de amarração**

As linhas de amarração experimentais foram obtidas do mesmo ponto global e tendo como base esses comprimentos resultantes, foi estimado novos comprimentos de linhas de amarração para os sistemas, sendo 30 para os sistemas compostos por PEG 4000 e sal de sulfato ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) e 37 para os sistemas compostos por PEG 6000 e sal de sulfato ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Utilizando o modelo UNIFAC, os parâmetros *a*, *b*, *c* e *d* e os dados das curvas de equilíbrio foram correlacionados gerando os dados das linhas e amarração teóricas dispostos na tabela 8. A partir dos pontos globais que resultaram nas linhas de amarração teóricas, os sistemas foram feitos de forma experimental, sendo verificado o desvio do estudo teórico e experimental.

**Tabela 8.** Frações mássicas (% m/m) teóricas e experimentais para os sistemas formados por PEG ( $W_{\text{peg}}$ ), sais de sulfato ( $W_{\text{sal}}$ ) e água ( $W_{\text{água}}$ ), pH 6,5 a 25 °C.

Linhas de amarração	CLA	ILA	Composição global (%)			Fase superior (%)			Fase inferior (%)		
			$W_{\text{peg}}$	$W_{\text{sal}}$	$W_{\text{água}}$	$W_{\text{peg}}$	$W_{\text{sal}}$	$W_{\text{água}}$	$W_{\text{peg}}$	$W_{\text{sal}}$	$W_{\text{água}}$
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e PEG 4000											
Teórica	27,36	-1,758	16	14	70	32,75	4,47	62,78	0,04	23,08	76,88
Experimental	23,67	-2,392	16	14	70	23,56	6,42	70,02	1,72	15,55	82,73
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e PEG 6000											
Teórica	36,34	-2,235	21	11	68	38,81	3,03	58,16	0,03	20,38	79,59
Experimental	32,74	-2,374	21	11	68	30,45	4,55	65,00	0,27	17,26	82,47
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e PEG 4000											
Teórica	29,92	-2,291	15	11	74	29,04	4,87	66,09	1,62	16,84	81,54
Experimental	28,35	-2,079	15	11	74	26,82	5,31	67,87	1,27	17,60	81,13
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e PEG 6000											
Teórica	35,99	-1,036	14	17	69	25,90	5,52	68,58	2,4E <sup>-06</sup>	30,51	69,49
Experimental	36,86	-1,379	14	17	69	29,85	4,69	65,46	0,01	26,32	73,67
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e PEG 4000											
Teórica	25,70	-2,325	14	9	77	26,20	3,75	70,05	0,44	14,83	84,73
Experimental	31,51	-2,730	14	9	77	30,34	3,02	66,64	0,75	13,86	85,39
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e PEG 6000											
Teórica	39,34	-2,876	20	8	72	37,61	1,88	60,51	0,45	14,80	84,75
Experimental	36,98	-2,590	20	8	72	34,79	2,29	62,92	0,29	15,61	84,10

Com base nos valores dos comprimentos das linhas de amarração (CLA) na Tabela 8, pode-se verificar que os resultados experimentais se aproximaram dos resultados teóricos, principalmente para os sistemas compostos por PEG e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . No entanto, por se tratar de um modelo para descrever os sistemas experimentais, mais estudos são necessários para aprimorar o método e aumentar a precisão do modelo.

## 5.2 Estimativa de parâmetros

Nesse estudo os dados experimentais das linhas de amarração foram utilizados para estimar novos parâmetros de interação de grupo para o modelo UNIFAC original. Utilizando o modelo UNIFAC, os dados das linhas de amarração obtidos experimentalmente nesse trabalho para sistemas formados por PEG (4000 ou 6000), sais de sulfato ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) e água, no pH 6,5 a 25 °C, foram correlacionados.

Para essa estimativa foram necessários parâmetros de volume e área de grupo  $R_k$  e  $Q_k$ . Na Tabela 9 e 10 podem ser visualizados os parâmetros estimados e os valores da energia de interação ( $T_{ij}$ ) dos ajustes obtidos.

**Tabela 9.** Parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 4000 e sais de sulfato ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) pH 6,5 em temperatura de 25 °C.

Grupo i	Grupo j	$A_{ij}$	$A_{ji}$	$T_{ij}$
CH <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub>	1,839	-4,578	0,993851
CH <sub>2</sub>	Li <sub>2</sub>	1230	692,73	0,016156
CH <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub>	1084,1	1462,5	0,026355
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Li <sub>2</sub>	-96,683	698,23	1,383029
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Na	-118,11	228,11	1,486082
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	NH <sub>4</sub>	-119,94	154,57	1,495231
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	SO <sub>4</sub>	-1333,4	-322,273	87,55310
Li <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	204,91	21,15	0,502946
NH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	223,23	24,308	0,472973
Na	H <sub>2</sub> O	-165	22,38	1,723840
OH	Li <sub>2</sub>	2766,9	865,7	9,325E <sup>-05</sup>
OH	NH <sub>4</sub>	1982,4	748,61	0,001295
SO <sub>4</sub>	Li <sub>2</sub>	-1270,3	-2089,2	70,85298
SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub>	-1308,5	-2687,9	80,53811

**Tabela 10.** Parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 6000 e sais de sulfato ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) pH 6,5 em temperatura de 25 °C.

Grupo i	Grupo j	A <sub>ij</sub>	A <sub>ji</sub>	T <sub>ij</sub>
CH <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub>	2,121	-4,603	0,992911
CH <sub>2</sub>	Li <sub>2</sub>	1679,3	947,86	0,003580
CH <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub>	-379,18	2707,9	3,567182
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Li <sub>2</sub>	-143,64	620,37	1,618939
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Na	-102,26	220,89	1,409143
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	NH <sub>4</sub>	-106,05	228,4	1,427170
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	SO <sub>4</sub>	-1463,133	-305,918	135,283439
Li <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	189,36	27,819	0,529874
NH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	206,79	22,858	0,499785
Na	H <sub>2</sub> O	-165	22,38	1,723840
OH	Li <sub>2</sub>	2995,1	991,91	4,337E <sup>-05</sup>
OH	NH <sub>4</sub>	3000	1712,4	4,267E <sup>-05</sup>
SO <sub>4</sub>	Li <sub>2</sub>	-1238,7	-1840,2	63,72775
SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub>	-1610,8	-2108,8	221,9938

### 5.3 Volume de exclusão

O volume de exclusão foi determinado com auxílio do modelo UNIFAC com base nos parâmetros estimados e com base nos dados experimentais das binodais e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Valores calculados do volume de exclusão de sistemas formados para os sistemas PEG e sais de sulfato, no pH 6,5 a 25 °C.

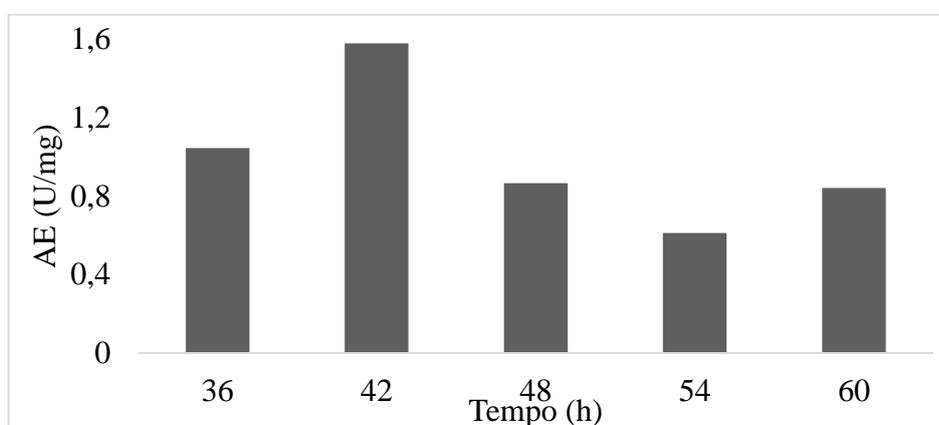
Sal	PEG	$V_{213}^*$ (g.mol <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4000	5189,1692	0,93643
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6000	5700,8732	0,92007
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4000	4004,2543	0,94846
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6000	4237,1202	0,88573
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4000	3970,7322	0,95988
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6000	4180,3168	0,94014

Pode-se observar que com o aumento da massa molar dos sais e do polímero ocorreu o aumento do volume de exclusão, isto é, os espaços vazios disponíveis para interações moleculares tenderam a aumentar. Assim, o aumento do volume de exclusão segue a sequência  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e PEG 6000 >  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e PEG 4000 >  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e PEG 6000 >  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e PEG 4000 >  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  e PEG 6000 >  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  e PEG 4000.

O valor do volume de exclusão superior para o diagrama de equilíbrio do  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e PEG 6000 pode ser resultado de uma maior interação sal-água e polímero-água, favorecendo a exclusão do polímero na fase do sal (fase inferior) e vice-versa. Nos parâmetros da energia verificados nas tabelas 9 e 10 pode ser observado que a interação do grupo  $\text{Na}^+$  com a água foi maior do que os grupos  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Li}^+$ . Esse comportamento contribui para justificar o efeito de volume de exclusão comprovando os resultados obtidos na Tabela 11.

#### 5.4 Atividade amilolítica

A partir dos estudos da cinética enzimática (Figura 5), foi observada uma baixa produção de amilases nas primeiras 36 horas de fermentação, isso pode ser explicado pela possível disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima, necessários para o desenvolvimento do micro-organismo. Após o consumo dos açúcares disponíveis é ativado o mecanismo de expressão da enzima atingindo a atividade específica máxima (70,2 AE) em 42 horas. Após esse período ocorre o declínio da produção enzimática, voltando a crescer em 60 horas. As enzimas geralmente apresentam mecanismo de controle da expressão que podem ser estimulados ou inibidos por produtos do meio. Os produtos finais de cada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Esse mecanismo é conhecido como *Feedback* negativo ou retroalimentação (SANTANA, *et al.* 2012).



**Figura 5.** Influência do tempo de fermentação na atividade de específica das amilases de *A. niger*.

Pereira (2015) analisando a produção de  $\alpha$ -amilase com resíduos de mandioca observou que a produção de enzimas no início é pequena, aumentando depois até atingir o seu valor máximo em 36 horas, tal divergência com o presente estudo pode estar relacionado a diferença na composição centesimal do resíduo em relação a amido e açúcares redutores. No entanto, Cruz *et al.* (2011) não observou influência do tempo na produção enzimática em estudos com a mesma espécie de fungo e resíduos de mandioca.

## 5.5 Partição das enzimas amilolíticas

Foram realizados os estudos de partição das enzimas amilolíticas obtidas através da FES utilizando os sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) e sais de sulfato ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Na Tabela 12 estão apresentados os valores para o coeficiente de partição da proteína ( $K_p$ ), da atividade enzimática ( $K_e$ ) e da recuperação teórica (Y%) das amilases em pH 6,5 e 25 °C. Luechau *et al.* (2010) afirmam que a distribuição desigual de proteínas entre as duas fases aquosas ocorre devido a um delicado balanço de interações entre as proteínas e as outras espécies presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio. Algumas propriedades das fases como natureza química dos componentes, massa molar, pH, temperatura, concentrações de sal e do polímero e, comprimento das linhas de amarração influenciam nas interações moleculares e conseqüentemente são determinantes para o valor de  $K_p$  (DA SILVA e LOH, 2006).

**Tabela 12.** Coeficiente de partição da proteína ( $K_p$ ), atividade amilásica ( $K_e$ ), recuperação teórica (Y%), desvios nas composições pelo modelo UNIFAC ( $\Delta w$  (%)) e energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta G$ ) nos sistemas aquosos formados por sal de sulfato e PEG no pH 6,5 a 25 °C.

Sal	CLA	$\Delta w$ (%)	$K_p$	$K_e$	Y (%)	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
PEG 4000						
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	28,35	1,11	1,687	3,421	80,352	-1296,303
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	31,51	4,11	2,703	0,525	31,313	-2464,844
$\text{Li}_2\text{SO}_4$	23,67	2,61	1,707	0,649	45,490	-1325,517
PEG 6000						
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	36,86	0,61	3,180	0,849	32,976	-2867,699
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	36,98	1,67	1,877	0,530	29,787	-1560,850
$\text{Li}_2\text{SO}_4$	32,74	2,54	2,157	0,552	32,976	-1905,514

Na Tabela 12 pode-se verificar que o valor de  $K_p$  foi maior que 1,0, ou seja, ocorreu uma maior migração de moléculas de proteínas para a fase superior. Como na amostra existiam outras proteínas além das enzimas amilolíticas, o coeficiente de atividade ( $K_e$ ) foi determinado. O melhor resultado observado de  $K_e$  foi para os sistemas formados por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e PEG 4000.

Esse sistema também resultou elevada recuperação teórica (Y%) quando comparado ao demais sistemas. Tais resultados eram esperados devido a aplicação desse sal para a precipitação de proteínas e a elevada solubilidade dele em água. Logo, os íons do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  interagem preferencialmente com a água provocando a exclusão molecular das enzimas para a fase rica em PEG. Li *et al.* (2002) estudaram a partição da  $\alpha$ -amilase nos sistemas formados por PEG/sulfato de amônio e verificou que a amilase migrou preferencialmente para fase rica em PEG.

No entanto, tal efeito não foi observado quando esse sal foi utilizado no sistema com o PEG 6000, onde o coeficiente de atividade ( $K_e$ ) se aproximou da unidade, sendo justificado pela redução significativa da recuperação teórica (Y%). Segundo Albertsson (1986) a massa molar exerce grande influência sobre o coeficiente de partição de biomoléculas, pois o aumento da mesma em um sistema de duas fases aquosas para uma determinada composição de fases, ocasiona uma redução da concentração necessária do polímero para que ocorra separação. Isto implica em uma redução do volume de solvente disponível, acarretando um decréscimo da solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição.

A energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta G$ ) é o parâmetro termodinâmico utilizado para relacionar as contribuições entálpicas e entrópicas da partição das moléculas alvo. Para a partição, esta variável termodinâmica é a variação na energia livre molar associada com o processo de transferência das enzimas ( $K_p$ ) da fase salina para a fase polimérica. A partição das biomoléculas para a fase polimérica ocorreu para minimizar a energia livre de Gibbs do sistema. Segundo Da Silva (2006) quanto maior  $\Delta G$  em sua forma negativa mais espontâneo é o processo de partição como foi observado no presente estudo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de sistemas compostos por PEG e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  demonstra vantagens diante dos sistemas formados por PEG e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e por PEG e  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  uma vez que para a formação de fases em pH 6,5 à 25° C é necessário menores concentrações de reagentes.

Verificou-se ainda que com o aumento da massa molar dos sais e do polímero ocorreu o aumento do volume de exclusão.

Foi possível observar que os resultados experimentais obtidos para os comprimentos das linhas de amarração se aproximaram dos resultados teóricos, principalmente para os sistemas compostos por PEG e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Estudou-se a partição das enzimas amilolíticas obtidas através da FES utilizando os sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) e sais de sulfato ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Foi observado que os sistemas formados por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e PEG 4000 apresentaram melhores resultados para valores de  $K_e$  e elevada recuperação teórica (Y%) quando comparado ao demais sistemas. Também foi observado com base na energia livre de Gibbs de transferência que a partição das enzimas foi espontânea em todos os sistemas estudados.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1971.
- ALBERTSSON, P.A. Aqueous Polymer-phase Systems Partition of Cell Particles and Macromolecules, 3rd edition, Wiley, New York, 1986.
- ALI, S. M.; LING, T. C.; MUNIANDYA, S.; TANA, Y. S., SABARATNAM, J. R. V. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, v. 122, p. 359–366, 2014.
- ARA, K.S.K.; ITO, S. Purification and characterization of an alkaline isoamilase from alkalophilic strain of *Bacillus*. *J. Gen. Micro.*, v.139, p. 781- 786, 1993.
- AZIZ, N. F. H.; ABBASILIASIB, S.; NG H. S.; PHAPUGRANGKULD, P.; BAKARA, M. H. A.; TAME, Y. J.; TAN, J. S. Purification of  $\beta$ -mannanase derived from *Bacillus subtilis* ATCC 11774 using ionic liquid as adjuvant in aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.029>
- AZNAR, M. Equilíbrio líquido-vapor de sistemas com eletrólitos via contribuição de grupo, PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1996.
- BHAT, M. K. Enzymatic processing of starch: presents and potential benefits. *Sug. J.*, v. 100, p. 372-376, 1998.
- BRADFORD, M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248- 254, 1976.
- BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. *Revista Energia na Agricultura – FCA/UNESP*, v. 20, n. 4, p. 36-52, 2005.
- BRITO, G. M.; Desenvolvimento de novos sistemas aquosos bifásicos compostos por acetonitrila para a extração de vanilina. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2007.
- BURNS, A.; GLEADOW; R.; CLIFF, J.; ZACARIAS, A.; CAVAGNARO, T. Cassava: the drought, war and famine crop in a changing world. *Sustainability*, v. 2, 3572 –3607, 2010.
- CARVALHO, C. Estudo de Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietilenoglicol, Sais e Água. Viçosa, 2004. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV). 2004.
- CARVALHO, T.; FINOTELLI, P. V.; BONOMO, R. C. F. B., FRANCO, M.; AMARAL, P. F. F. Evaluating Aqueous Two-Phase Systems for *Yarrowia lipolytica* Extracellular Lipase Purification. *Process Biochemistry*, v. 53, p.259-266, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.019>

- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from calotropis procera latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1148-1155, 2010.
- COIMBRA, J.S. R.; TEIXEIRA, J. *Engineering Aspects of Milk and Dairy Products*. Boca-Raton, CRC Press, 2009.
- CORNELIS, P. Microbial amylases. *Microbiological Sciences*, v. 4, n. 11, p. 342-343, 1987.
- COSTA, J. A.V. Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 203 p. 1996.
- CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. N.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca Alpha-Amylase. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, n.13, v.4, p. 245-249, 2011.
- DA SILVA, Luiza H. M.; MEIRELLES, Antonio J. A. Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous mixtures of maltodextrin with polypropylene glycol. *Carbohydrate polymers*, v. 46, n. 3, p. 267-274, 2001.
- DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*. v. 29, p.1345-1351, 2006.
- DAHL, S. e MACEDO, E. A. The MHV2 Model: A UNIFAC-Based Equation of State Model for Vapor-Liquid and Liquid-Liquid Equilibria of mixtures with Strong Electrolytes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v.31, p.1195-1201, 1992.
- FAKHARI, M. A.; RAHIMPOUR, F.; TARAN, M. Response Surface Methodology Optimization of Partitioning of Xylanase from *Aspergillus Niger* by Metal Affinity Polymer-Salt Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chromatography B*, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jchromb.2017.08.007> CHROMB 20740
- FAO. *Save and Grow: Cassava A Guide to Sustainable Production Intensification*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 2013.
- FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 52, p. 179-188, 2015.
- FARRUGGIA, B.; NERLI, B.; PICÓ, G. Study of the serum albumin-polyethyleneglycol interaction to predict the protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v., 798, p. 25-33, 2003.
- FERREIRA, L. A.; SILVA, D. P.; SOARES, D. R.; SCHEIDT, G. N. A utilização de resíduos das agroindústrias de suco de abacaxi para a produção de bromelina. *Revista Sítio Novo*, v. 1, p. 247-257, 2017.
- FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. Glucoses isomerases. *Microbial Enzymes and Biotechnology*, v.2, p.199-220, 1990.
- FORCINITI, D., HALL, C. K. AND KULA, M. R., Temperature dependence of the partition coefficient of proteins in aqueous two-phase systems. *Bioseparation* ., 2, 115-128. 1991.

- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. In: Pure and Applied Chemistry, v. 59, p. 257-268, 1987. Disponível em: < <http://pt.scribd.com/doc/16574469/Measurement-of-Cellulase-Activity>>. Acessado em 20 jul. 2017.
- GMEHLING, J., RASMUSSEN, P. e FREDENSLUND, AA. Vapor-Liquid Equilibria by UNIFAC Group Contribution. Revision and Extension. 2. Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev., v. 21, p. 118-127, 1982.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN B. "Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective". Process Biochemistry, v. 38. p. 1599-616, 2003.
- HANSEN, H.K., RASMUSSEN, P., FREDENSLUND, AA., SCHILLER, M., GMEHLING, J., Vapor-Liquid Equilibria by UNIFAC Group Contribution. Revision and Extension. 5. Ind. Eng. Chem. Res., v. 30, p. 2355-2358, 1991.
- HE, A.; DONG, B.; FENG, X.; YAO, S. Extraction of bioactive ginseng saponins using aqueous two-phase systems of ionic liquids and salts. Separation and Purification Technology, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.05.041>
- HERSKOWITZ, M. e GOTTLIEB, M. UNIFAC Group Contribution Method for Silicone Compounds. Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev., v.20, p.407-409, 1981.
- HUANG, Y.; WHITTAKER, A.D.; LACEY, R.E. Automation for food engineering: Food quality quantization and process control. CRC Press, 2001.
- HUSAIN, Q. Nanomaterials as novel supports for the immobilization of amylolytic enzymes and their applications: A review. Biocatalysis, v. 3, p. 37–53, ISSN (Online) 2353-1746, DOI: <https://doi.org/10.1515/boca-2017-0004>. 2017.
- IYYAPPAN, J.; BHARATHIRAJA, B.; BASKAR, G.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; BARATHKUMAR, S.; ANNASHINY, R. Malic acid production by chemically induced *Aspergillus niger* MTCC 281 mutant from crude glycerol. Bioresource Technology, v. 251, p. 264-267, 2018.
- JONG, W. Y. L.; SHOW, P. L., LING, T. C.; TAN, Y. S. Recovery of lignin peroxidase from submerged liquid fermentation of *Amauroderma rugosum* (Blume & T. Nees) Torrend using polyethylene glycol/salt aqueous two-phase system. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 124, p. 91-98, 2017.
- KIKIC, I., FERMEGLIA, M. UNIFAC prediction of vapor-liquid equilibria in mixed solventsalt systems. Chemical Engineering Science, v. 2, n. 11, p. 2775-2780, 1991.
- LANGMUIR I. M. COILOID. SYMP. Monograph 3, 48. Panling L. (1960) Z%e Nature of Chemical Bond, p. 260. Cornell University Press, New York. 1925.
- LI, M.; KIM, J.W.; PEEPLES, T. L. Amylase partition and extractive bioconversion of starch using thermos separating aqueous two-phase systems. Journal of Biotechnology, v. 93, p.15- 26, 2002.
- MACEDO, E.A., WEIDLICH, U., GMEHLING, J., RASMUSSEN, P., Vapor-Liquid Equilibria by UNIFAC Group Contribution. Revision and Extension. 3, Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev., v. 22, p. 676-678, 1983.

- MACHADO, F. L. C. Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietileno glicol-maltodextrina-água. 1999. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- MADURO, R. M. Equilíbrio líquido-líquido em sistemas nicotina+água+Extratante. 99 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2005.
- MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 11, p. 124–130, 2017.
- MELANDER, H.; HORVATH, C. Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. *Arch. Biochem. Biophys.* n.183, p.200-215, 1977.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v. 35, p.1211–1225, 2000.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428, 1959.
- MJALLI, F. S. Neural network model-based predictive control of liquid-liquid extraction contactors. *Chemical Engineering Science*, v. 60, n. 1, p. 239–253, 2005.
- MURARI, G. F.; PENIDO J. A.; SILVA, H. M.; BAËTA, B. E. L.; AQUINO, S. F.; LEMOS, L. R.; RODRIGUES, G. D.; MAGESTE, A. B. Use of aqueous two-phase PEG-salt systems for the removal of anionic surfactant from effluents. *Journal of Environmental Management*. 198, p. 43–49, 2017.
- NAGARAJA V. H; IYYASWAMI R. Aqueous two phase partitioning of fish proteins: partitioning studies and ATPS evaluation. *Journal Food Science Technology*, v. 52 n. 6, p.3539–3548, 2014.
- NASCIMENTO, D. J. S.; BARRETO, M. B.; BATISTA, I. C.; GANDOLFI, O. R. R.; FONTAN, R. C. I.; BONOMO, R. C. F. Estudo da Influência do pH na Formação de Sistemas Aquosos Bifásicos Constituído Por Polietilenoglicol, Citrato de Sódio e Água. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química ENBEQ 2016 - XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química. Fortaleza-CE, 2016.
- NASSAR, N.; Ortiz, R. Breeding cassava. *Sci. Am.* v. 302 (5), p. 78–84, 2010.
- OISID, T.; PRAUSNITZ, J.M. "Estimation of Solvent Activities in Polymer Solutions using a Group Contribution Method", *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, v. 17, p. 333- 339, 1978.
- OLIVEIRA, A. C. Modelo de contribuições de grupos aplicado a reações para a formação do biodiesel. Dissertação (Mestrado). UFSCar. p. 106, 2010.

- OLIVEIRA, A. C. Modelo de contribuições de grupos aplicado a reações para a formação do biodiesel. Dissertação (Mestrado). UFSCar. p. 106, 2010.
- OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. N. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. **Journal of Science of Food and Agriculture**, 69, 109-115, 1995.
- PADILHA, C. E. A.; DOMINGOS, S. D. O. J.; SOUZA, F. S.; OLIVEIRA, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Baker's yeast invertase purification using Aqueous Two Phase System – Modeling and optimization with PCA/LS-SVM. *Food and Bioproducts Processing*, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fbp.2016.11.004>
- PANDEY, A. Recent Process Development in Solid State Fermentation. *Process Biochemistry*, v.27, p. 109-117, 1992.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues.1: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, n. 74, v. 1, p. 69-80, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potencial of agro-industrial residue II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*, V. 74, p. 81-87, 2000.
- PEREIRA, A. S. Produção de Alfa-amilase Por Fermentação No Estado Sólido: Separação Por Sistemas Aquosos Bifásicos. 2015. 89 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Departamento de Tecnologia Rural e Animal, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga. 2015.
- PICÓ, A.; COLAVIZZA, D.; BENAÏSSA, M.; MAES, P.; TARTAR, A.; MONTREUIL, J.; SPIK, G. Poly (ethylene glycol) molar mass and polydispersivity effect on protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 830, p. 286-292, 2006.
- PURWANTO, M. G. M. The role and efficiency of ammonium sulfate precipitation in purification process of papain crude extract. *Procedia Chemistry*, n. 18, p. 127-131, 2016.
- RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Journal of Biotechnology*, v. 24, p. 161–179, 2005.
- RAWDKUEN, S.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P.e BENJAKUL, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. *Food and Bioproducts Processing*. doi: 10.1016. 2010.
- ROCHA, C. P. Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido. UBERLÂNDIA, 2010. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos, Universidade Federal de Uberlândia (UFU).
- RODRIGUES, A. B. C.; ALMEIDA, C. A. V.; ROCHA, C. P.; COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L. Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus niger*, 2009. Disponível em:< [https://www.researchgate.net/profile/Ubirajara\\_Coutinho\\_Filho/publication/266175121](https://www.researchgate.net/profile/Ubirajara_Coutinho_Filho/publication/266175121)

\_FERMENTACAO\_DE\_RESIDUOS\_DE\_ARROZ\_E\_MARACUJA\_NA\_PRODUCAO\_DE\_INVERTASE\_E\_AMILASE\_POR ASPERGILLUS\_NIGER/links/56dda17d08aed4e2a99c551d/FERMENTACAO-DE-RESIDUOS-DE-ARROZ-E-MARACUJA-NA-PRODUCAO-DE-INVERTASE-E-AMILASE-POR-ASPERGILLUS-NIGER.pdf>. Acesso em 02 de ago. de 2017.

SALA, L., GAUTÉRIOA, G. V.; YOUNANA, F. F.; BRANDELLIB, A.; MORAESC, C. C.; KALIL, S. J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. *Process Biochem.* 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.013>

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems : experiments and predictions. *Fluid Phase Equilibria*, v. 188, p. 489–498, 2001.

SAMPAIO, V. S.; BONOMO, R. C. F.; FILHO, E. S. M.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Physical Properties and Liquid–Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene glycol) + Potassium Chloride + Sodium Polyacrylate. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 57, p.3651-3657, 2012.

SANTANA, R. M., GONÇALVES, Z. S., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, v.25, p.188–193, 2012.

SANTOS, E. F.; CARVALHO, F. S. SILVA, J. C. G. Agroindústria da mandioca: o caminho para a sustentabilidade econômica dos beneficiadores do bairro campinhos em Vitória da Conquista-BA. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47, 2009, Porto Alegre.

SANTOS, G. R. dos. Equilíbrio Líquido-Líquido em Sistema Eletrolíticos Aquosos. 1999. 150 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SILVA, A. R. G. Estudos Termodinâmicos em Sistemas de Duas Fases Aquosas Para a Purificação de Bromelina de Resíduos Agroindustriais. 2014. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2014.

SILVA, O. S.; GOMES, M. H. G.; OLIVEIRA, R. L.; PORTO, A. L. F.; PORTO, A. C. T. S. Partitioning And Extraction Protease From *Aspergillus tamaris* URM4634 Using PEG-Citrate Aqueous Two-Phase Systems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.9, p. 168-173, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.12.012>

SILVEIRA, G. G. Resíduos Agroindustriais Como Potenciais Substratos Para a Produção de Renina Microbiana Por *Mucor Miehei* Utilizando Fermentação em Estado Sólido. 2007. 108 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Rio Claro. 2007.

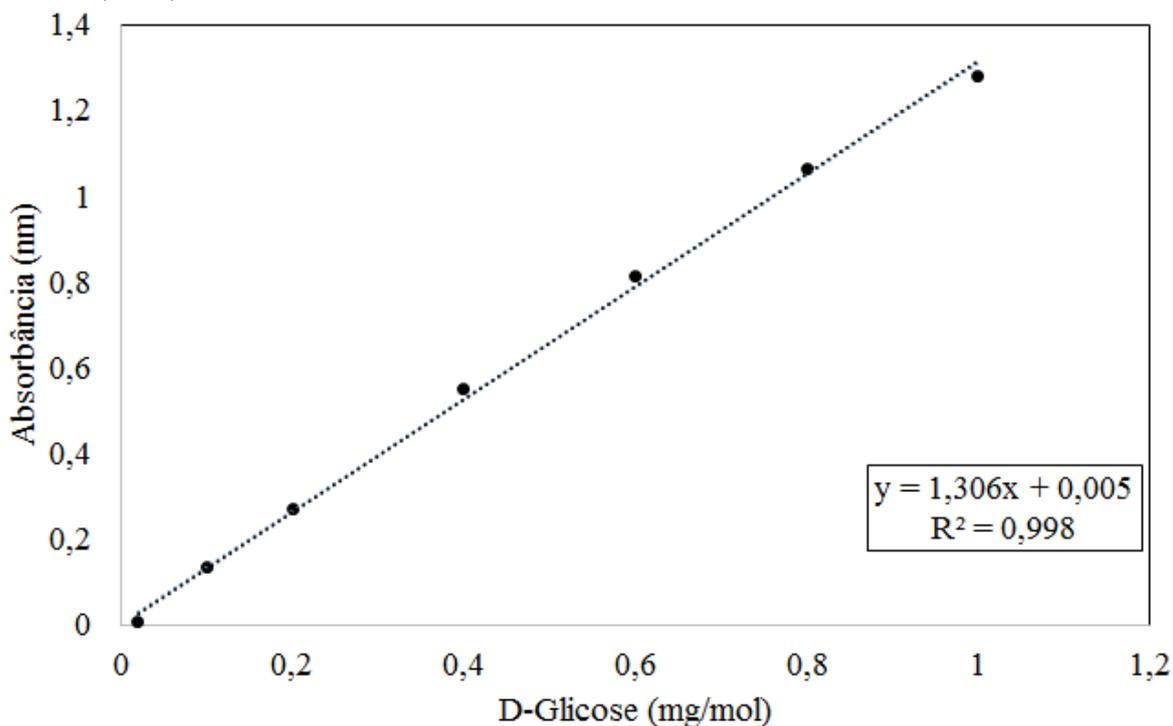
SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>

- SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J.M. Breeding and Growth of *Rhizopus* in Raw Cassava By Solid State Fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 41. p. 330-336, 1994.
- SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido. 2005. 157f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Setor de Tecnologias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- STROPARO, E. Avaliação do processo de hidrólise da batata doce por enzimas comerciais e por enzimas produzidas por *A. niger* em condições otimizadas. Dissertação de mestrado em Bioenergia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, 2011.
- TENGERDY, R. P. Solid substrate fermentation. *Trends in Biotechnology*, n. 4, v. 3, p. 96-99, 1985.
- TESTER J. W.; MODELL M. *Thermodynamics and Its Applications*. 3 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall editor, p. 557, 1996.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 146–161, 2013.
- TIEGS, D, GMEHLING, J., RASMUSSEN, P., E FREDENSLUND, AA., VaporLiquid Equilibria by UNIFAC Group Contribution. Revision and Extension. 4. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 26, p. 159-161, 1987.
- VAN MUNSTER, J. M. et al. Application of carbohydrate arrays coupled with mass spectrometry to detect activity of plant-polysaccharide degradative enzymes from the fungus *Aspergillus niger*. *Scientific Reports*, v. 7, p. 43117; doi: 10.1038/srep43117, 2017.
- WANDERLEY, M. C. A.; NETO, J. M. W. D.; ALBUQUERQUE, W. W. C; MARQUES, D. A. V.; LIMA, C. A.; SILVÉRIO, S. I. C.; FILHO, J. L. L.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, A. L. F. Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp. UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. *Protein Expression and Purification*, 2017. doi: 10.1016/j.pep.2017.02.010.
- WILSON, G.M.; DEAL, C.H. Activity coefficients and molecular structure. Activity coefficients in changing environments - Solutions of groups, *I&EC Fundamentals*, v. 1, n 1, p. 20-23, 1962.
- WU, X., LI, X., YANG, M., ZENG, H., ZHANG, S., LU, R., XU, D. 2017. An ionic liquid-based nanofluid of titanium dioxide nanoparticles for effervescence-assisted dispersive liquid-liquid extraction for acaricide detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1497, p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.005>
- WYSOCZANSKA, K.; MACEDO, E. A. Influence of the Molecular Weight of PEG on the Polymer/Salt Phase Diagrams of Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chemical & Engineering Data*, n.61, p.12, p. 4229-4235, 2016.
- YAN, B.; CAO, X. Phase diagram of novel recycling aqueous two-phase systems composed of two pH-response polymers: Experiment and modeling. *Fluid Phase Equilibria*, v. 364, p. 42–47, 2014.

ZARKARIAN, J.A., ANDERSON, F.E., BOYD, J.A., PRAUSNITZ, J.M. UNIFAC Parameters from Gas-Liquid Chromatographic Data. Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev, v.18, p.657-661, 1979.

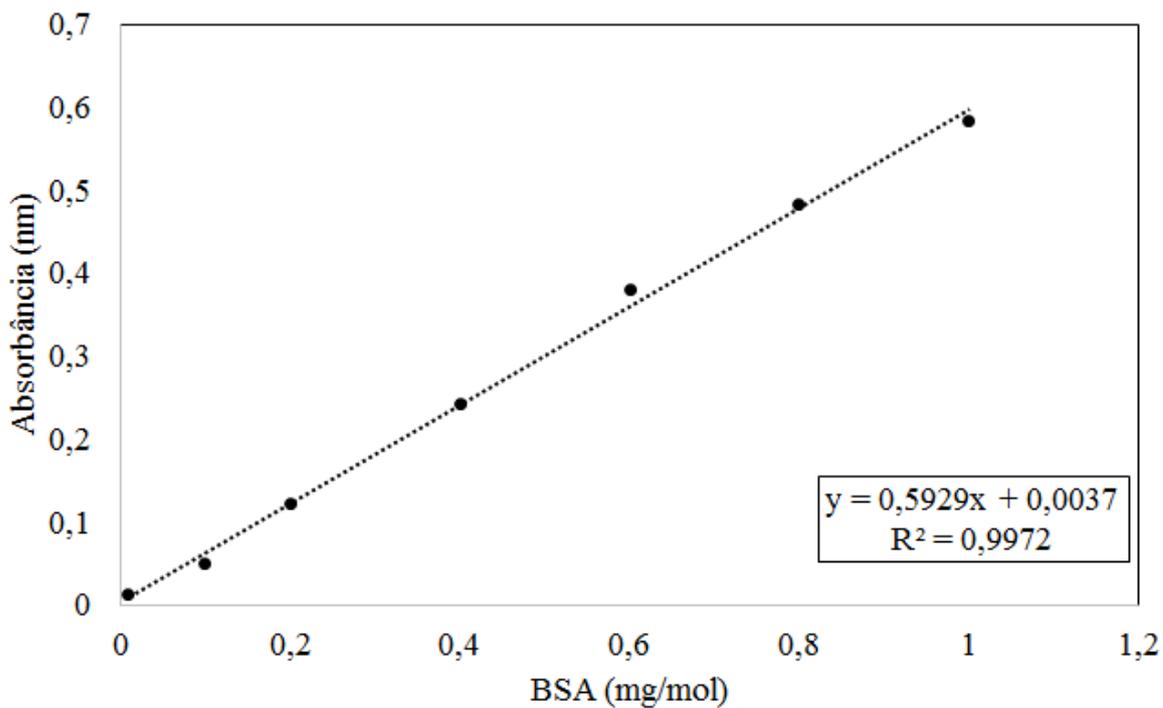
## **ANEXO 1- Curvas padrões**

**Curva padrão de glicose para determinação da atividade amilolítica pelo método de Miller (1959).**



Onde y é o comprimento de onda (nm), x é a concentração de D-Glicose (mg/mol) e  $R^2$  é o coeficiente de determinação.

**Curva padrão de BSA para determinação do teor de proteínas pelo método de Bradford (1976).**



Onde y é o comprimento de onda (nm), x é a concentração de BSA (mg/mol) e  $R^2$  é o coeficiente de determinação.