



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

EXTRAÇÃO DE LIPASE DA AMÊNDOA DO PEQUI E PURIFICAÇÃO
PARCIAL POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

PRISCILLA AMARAL NASCIMENTO

ITAPETINGA – BA

2020

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

EXTRAÇÃO DE LIPASE DA AMÊNDOA DO PEQUI E PURIFICAÇÃO
PARCIAL POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

PRISCILLA AMARAL NASCIMENTO

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^a. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Co-Orientadores:

Prof^a. DSc. Cristiane Martins Veloso

Prof. DSc. Leandro Soares Santos

ITAPETINGA – BA

2020

660.634
N197e

Nascimento, Priscilla Amaral.

Extração de lipase da amêndoa do pequi e purificação parcial por sistemas aquosos bifásicos. / Priscilla Amaral Nascimento. – Itapetinga-BA: UESB, 2020.

103 fl.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação da Prof. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e coorientação da Prof. D. Sc. Cristiane Martins Veloso e Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos.

1. Amêndoa do pequi – Extração de lipase. 2. Amêndoa do pequi – Purificação parcial – Sistemas Aquosos Bifásicos. 3. Enzimas – Usos – Lipase vegetal – Oleaginosas. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Veloso, Cristiane Martins. IV. Soares, Leandro Santos. V. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Amêndoa do pequi : Extração de lipase
2. Amêndoa do pequi : Purificação parcial
3. Sistemas Aquosos Bifásicos
4. Enzimas : Lipase vegetal
5. Oleaginosas : Usos



ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Av. Nelson Brihi, s/n - Itapetinga - Bahia
Nº 14.25, 41.967/2006



UESB



Governo do
Estado da Bahia

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: EXTRAÇÃO DE LIPASE DA AMÊNDOA DO PEQUI E PURIFICAÇÃO PARCIAL POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Autor (a): PRISCILLA AMARAL NASCIMENTO

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

Coorientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

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. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan
UESB


Prof.^a Dr.^a Vanessa Santos Sampaio
UESB


Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo
Orientadora- UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 03 de março de 2020.

“Para aqueles que estão determinados em voar, não ter asas é apenas um pequeno detalhe.”
(Guilherme Ávila)

A Deus
Aos meus pais
Aos meus irmãos

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção, amparo nos momentos difíceis e por mostrar que sou forte o suficiente para vencer qualquer obstáculo.

Aos meus amados pais, Maria e Ademir, pelo amor incondicional, por não medirem esforços para me ver feliz e sempre acreditarem em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditei.

Aos meus irmãos, Artur e Natália, por serem meus melhores amigos e companheiros de vida.

À João Pedro, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo das pequenas às grandes vitórias. Te conhecer ao longo dessa jornada fez tudo isso se tornar mais especial!

À Renata Bonomo, pela excelente orientação, ensinamentos, compreensão, confiança e paciência. Você me mostrou o tipo de profissional que desejo ser um dia. Foi um prazer ser sua orientada!

Aos amigos de Nanuque e Ouro Branco, em especial à Luiz Henrique, Kalythea, Nathália, Maria Júlia, Alan e meninas da república Pirei, por sempre se fazerem presentes, apoiando e torcendo por cada passo dado. A amizade de vocês é um privilégio!

À Carol, por se tornar uma amiga/irmã durante esses dois anos. Se alegrou com minhas alegrias e sofreu com as angústias da pós-graduação. Mesmo com as dificuldades, seguimos juntas até o fim. Você foi um porto seguro, obrigada por tudo!

À Annie, pela amizade e companheirismo no laboratório, pela generosidade e coração ímpar, por dividir comigo as conquistas, responsabilidades, frustrações e inúmeros bons momentos. Sorte grande foi poder te conhecer e tê-la por perto em minha caminhada.

Aos amigos conquistados durante o mestrado, em especial às meninas do A303, pela rotina compartilhada com bom humor e companheirismo.

Aos familiares, pelo carinho e preocupação.

Aos co-orientadores Cristiane Veloso e Leandro Soares, pelas sugestões, apoio e incentivo para a realização do trabalho.

Ao professor Rafael Fontan, por ser sempre prestativo e disponível, contribuindo positivamente para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Aos integrantes da banca examinadora, por aceitarem fazer parte da avaliação desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Processos, pela troca de conhecimento, carinho e momentos de descontração. Em especial, à Mateus, Lucas e Marjorie.

À “turma do SAB”, pela amizade, apoio e ajuda diária, em especial à Karine e Olga.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação

em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade e por fornecerem as condições de trabalho necessárias para que eu me tornasse mestre.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESB) pela bolsa concedida e à CAPES pelo auxílio ao experimento.

A todos que não foram citados, mas contribuíram de forma significativa para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Pequi	19
2.2 Lipase.....	21
2.2.1 Lipase vegetal.....	23
2.2.2 Aplicações das lipases na indústria	24
2.3 Processos de separação e purificação	25
2.3.1 Extração sólido-líquido	26
2.3.2 Extração líquido-líquido (ELL).....	27
2.3.2.1 Sistemas aquosos bifásicos (SABs).....	28
1. Tipos de sistemas aquosos bifásicos.....	30
2. Diagrama de equilíbrio de fases	31
3. Parâmetros de partição	33
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

CAPÍTULO 2: Otimização da extração da lipase obtida a partir da amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).

1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 Local do experimento	50
2.2 Material.....	50
2.3 Métodos	50
2.3.1 Preparo da amostra.....	50
2.3.2 Determinação da composição química centesimal	51
2.3.2 Definição da solução extratora	51
2.3.4 Determinação do teor de proteínas	51
2.3.5 Recuperação teórica de proteínas.....	52
2.3.6 Determinação de atividade enzimática.....	52

2.3.7	Otimização das condições de extração	53
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1	Composição química centesimal da amêndoa do pequi	54
3.2	Definição da solução extratora	55
3.3	Otimização das condições de extração	57
4.	CONCLUSÕES	69
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

CAPÍTULO 3: Partição de lipase da amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG/Isopropanol + Sulfato de amônio + água.

1.	INTRODUÇÃO	76
2.	MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1	Local do experimento	77
2.2	Material	77
2.3	Métodos	77
2.3.1	Precipitação com sulfato de amônio	77
2.3.2	Purificação utilizando sistemas aquosos bifásicos	78
1.	Planejamento experimental	78
2.	Determinação da curva binodal	79
3.	Determinação da linha de amarração	79
4.	Partição da lipase	81
i.	Determinação do teor de proteínas	82
ii.	Determinação de atividade enzimática	82
5.	Avaliação dos parâmetros de partição	83
6.	Estimativa da variação da energia livre de Gibbs	84
2.3.3	Identificação da proteína por eletroforese SDS-PAGE	84
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1	Dados de equilíbrio: diagrama de equilíbrio e comportamento da linha de amarração	85
3.2	Partição da lipase	86
3.3	Identificação da proteína por eletroforese SDS-PAGE	90
4.	CONCLUSÕES	91
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ANEXO	94

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Composição química centesimal da polpa e amêndoa do pequi expressas em matéria seca	20
Tabela 2. Lipases obtidas a partir de diferentes fontes vegetais.....	24
Tabela 3. Parâmetros de extração sólido-líquido de lipases de origem vegetal	27
Tabela 4. Partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos.....	29
Tabela 5. Principais categorias de sistemas aquosos bifásicos.....	30

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental utilizado no estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi.....	53
Tabela 2. Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental utilizado no estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi.....	53
Tabela 3. Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental utilizado no estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi.....	54
Tabela 4. Composição química centesimal da amêndoa do pequi expressa em matéria seca.....	54
Tabela 5. Comparação entre médias das atividades enzimáticas total e específica e recuperação de proteínas utilizando diferentes soluções extratoras para o estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi	55
Tabela 6. Resposta em atividade enzimática e porcentagem de recuperação para o estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio e sulfato de amônio + tween 80 como soluções extratoras	57
Tabela 7. Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio	58
Tabela 8. Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80	59
Tabela 9. Resposta em atividade enzimática e porcentagem de recuperação para o estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio e sulfato de amônio + tween 80 como soluções extratoras	61

Tabela 10. Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio	62
Tabela 11. Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80	62
Tabela 12. Resposta em atividade enzimática e porcentagem de recuperação para o estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando Sulfato de amônio como solução extratora.....	65
Tabela 13. Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio	66
Tabela 14. Testes finais de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando Sulfato de amônio e sulfato de amônio + tween 80 como soluções extratoras em suas condições ótimas.....	68

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Variáveis e níveis do planejamento experimental utilizado na purificação de lipase a partir de sistemas aquosos bifásicos	78
Tabela 2. Dados de equilíbrio para diferentes condições de sistemas aquosos bifásicos encontrados na literatura.....	78
Tabela 3. Composição global para os sistemas formados por PEG 4000/isopropanol e sulfato de amônio, nas temperaturas de 25°C e 35 °C, expressa em porcentagem mássica (% m/m).....	80
Tabela 4. Parâmetros ajustados, coeficiente de determinação e desvio padrão obtidos para o sistema formado por isopropanol e sulfato de amônio a 35°C pela equação de Hu et al. (2003)..	85
Tabela 5. Dados da linha de amarração e fração mássica do sistema formado por isopropanol (W_{iso}), sulfato de amônio (W_{sal}) e água a 35°C.....	86
Tabela 6. Comparação entre médias para coeficiente de partição de atividade enzimática e de proteínas e recuperação teórica em sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C	87
Tabela 7. Comparação entre médias para seletividade, fator de purificação e variação da energia livre de Gibbs de transferência (ΔG) (kJ mol^{-1}) de sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C	89

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Estrutura do fruto do pequi 19
- Figura 2.** Reações catalisadas por lipases..... 21
- Figura 3.** Mecanismo de ativação interfacial das lipases 22
- Figura 4.** Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares..... 32

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio como solução extratora..... 59
- Figura 2.** Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio + tween 80 como solução extratora..... 60
- Figura 3.** Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio como solução extratora..... 63
- Figura 4.** Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio + tween 80 como solução extratora..... 63
- Figura 5.** Gráfico da correlação entre os valores preditos e os valores observados da atividade enzimática e recuperação de proteínas, respectivamente, no processo de extração de lipase de amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80 64
- Figura 6.** Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio como solução extratora..... 66
- Figura 7.** Gráfico da correlação entre os valores preditos e os valores observados da atividade enzimática e recuperação de proteínas, respectivamente, no processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio 67

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Diagrama de fases do sistema isopropanol + sulfato de amônio + água na temperatura de 35°C 85
- Figura 2:** Eletroforese SDS-PAGE da lipase da amêndoa do pequi.
(E) Extrato bruto da amêndoa do pequi; (F) Fase inferior do sistema isopropanol-sulfato de amônio a 25°C; (P) Marcador molecular de proteínas (24 a 200 kDa) 90

RESUMO

NASCIMENTO, P. A. **Extração de lipase da amêndoa do pequi e purificação parcial por sistemas aquosos bifásicos.** Itapetinga-BA: UESB, 2020. 103p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). *

O interesse industrial por tecnologias envolvendo o uso de enzimas tem ganhado espaço ao longo dos anos, sendo as lipases uma das três hidrolases mais comercializadas no mundo em virtude das suas múltiplas aplicações. Tais enzimas podem ser encontradas em vegetais, animais e microrganismos, sendo a lipase vegetal uma boa alternativa para exploração renovável. Dentre elas, uma fonte em potencial a ser estudada é a amêndoa do pequi, uma oleaginosa de alto valor nutricional que ainda é pouco explorada comercialmente devido à dificuldade de separação dos demais componentes estruturais do alimento. Nesse contexto, objetivou-se no trabalho em questão a extração de lipase obtida a partir da amêndoa do pequi, particionando-a em sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol/isopropanol, sulfato de amônio e água. Após seu preparo, o substrato foi submetido a testes iniciais utilizando-se três soluções extratoras diferentes (sulfato de amônio, sulfato de amônio + tween 80 (0,25%) e sulfato de amônio + CaCl_2 (1%)) a fim de avaliar o meio com melhor eficiência. Em seguida, as condições do processo de extração foram otimizadas a partir da avaliação do efeito das variáveis independentes tempo e volume de solução extratora sobre a atividade enzimática e recuperação de proteínas (%). Por fim, a lipase contida no extrato enzimático obtido a partir da melhor solução extratora testada e dentro das condições ótimas de extração foi submetido ao particionamento por sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 4000/Isopropanol, Sulfato de amônio e água na temperaturas de 25°C e 35°C, onde uma parte do extrato foi aplicada diretamente nos sistemas (extrato bruto) e a outra parte foi previamente submetida à etapa de precipitação por sulfato de amônio (precipitado). O teste de comparação entre médias (teste de Tukey) identificou diferença significativa com valores máximos de atividade enzimática específica (8,17 U/mg) para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e atividade enzimática total (447,23 U) e recuperação de proteínas (57,97%) para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + tween 80, optando-se por otimizar as condições de extração para as duas soluções. O planejamento experimental demonstrou efeito significativo dos parâmetros tempo e volume nas variáveis resposta atividade enzimática (U) e recuperação de proteínas (%) para ambas as soluções extratoras, onde a solução composta apenas por sulfato de amônio apresentou resultados com menor variabilidade estatística (R^2 superior), e por isso foi selecionada como meio para extração da lipase. Os valores ótimos de tempo e volume para se obter máxima atividade enzimática ($A_{et} = 800,03$ U) foram fixados em 20 minutos e 2,25 mL de solução extratora. No processo de partição por sistemas aquosos bifásicos, observou-se que o sistema composto por Isopropanol e Sulfato de amônio (extrato bruto) a 25°C obteve os melhores resultados para coeficiente de partição de atividade enzimática ($K_e = 0,053$) e de proteínas ($K_p = 2,333$), recuperação teórica (% $Y = 86,391$), seletividade ($S = 0,023$) e fator de purificação ($FP = 4,479$), além da energia livre de Gibbs de transferência indicar que o particionamento foi espontâneo ($\Delta G = -7,264$). Portanto, conclui-se que os processos de separação sólido-líquido utilizando sulfato de amônio como solução extratora e de purificação utilizando Isopropanol-Sulfato de amônio a 25°C estabelecidos no presente experimento são viáveis para a extração de lipase a partir da amêndoa do pequi.

Palavras-chave: Enzimas; processos *downstream*; sistema aquoso bifásico.

ABSTRACT

NASCIMENTO, P. A. **Extraction of lipase from pequi seed and partial purification by aqueous two-phase systems.** Itapetinga-BA: UESB, 2020. 103p. (Dissertation – Master's in Engineering and Food Science). *

Industrial interest in technologies involving the use of enzymes has more space in the last years, where lipase is one of the three best selling hydrolases in the world due to its multiple applications. These enzymes can be found in plants, animals and microorganisms, and plant lipase can be seen as a good alternative for renewable exploration. A potential source of study is pequi seed, a high nutritional value oilseed that is still little explored commercially due to the difficulty of separating the structural components of the food. In this context, the objective of this work was the extraction of lipase produced from pequi seed, besides partition using aqueous two-phase systems composed of polyethyleneglycol/isopropanol, ammonium sulfate and water. After substrate preparation, it was subjected to initial testing using three different solutions (ammonium sulfate, ammonium sulfate + tween 80 (0.25%) and ammonium sulfate + CaCl_2 (1%)) in order to evaluate the compound with better extraction capacity. Conditions of the extraction process were optimized by evaluating the effect of the independent variables time and solute: solvent ratio (m/v) on enzymatic activity and protein recovery (%). Finally, the lipase obtained from the best extraction solution tested within optimal conditions of extraction was partitioned by aqueous two-phase systems formed by PEG 4000/Isopropanol, ammonium sulphate and water at temperatures of 25°C and 35°C, where part of the extract was applied directly to the systems (crude extract) and the other part was previously submitted to the precipitation step by ammonium sulfate (precipitate). The mean comparison test identified significant difference with values of specific enzymatic activity (8.17 U/mg) for $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and enzyme activity (447.23 U) and protein recovery (57.97%) for $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Tween 80. Therefore, it was concluded by optimizing the extraction conditions for both solutions. The experimental design showed significant effect of the time and volume parameters on response variables enzymatic activity (U) and protein recovery (%) for both extractor solutions. The solution composed only of Ammonium sulfate showed results with less statistical variability (higher R^2) and for that reason it was selected for lipase extraction. The optimal values of time and volume to obtain maximum enzymatic activity ($A_{et} = 800.03$ U) were fixed in 20 minutes and 2.25 mL of extraction solution. In partition process, it was observed that the system composed by Isopropanol and Ammonium sulphate (crude extract) at 25°C obtained the best results for partition coefficient of enzymatic activity ($K_e = 0,053$), partition coefficient of protein ($K_p = 2,333$), recovery (% $Y = 86,391$), selectivity ($S = 0,023$) and purification factor ($FP = 4,479$) with a spontaneous process indicated by Gibbs free energy of transfer ($\Delta G = -7,264$). Therefore, it can be concluded that the solid-liquid separation process using ammonium sulfate as extraction solution and purification using Isopropanol-Ammonium sulfate at 25°C presented in this study are viable for lipase extraction from pequi seed.

Keywords: Aqueous two-phase systems; downstream process; enzymes.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

REFERÊNCIAL TEÓRICO

OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol hidrolases (E.C. 3.1.1.3)), enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, possuem como principal função biológica a catálise de reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (LOPES et al., 2011). Em geral, não necessitam de cofatores, atuam em ampla faixa de pH e são estáveis em altas temperaturas. Além disso, possuem elevada especificidade e seletividade, características que as tornam o terceiro grupo em vendas de enzimas no mundo, devido às suas múltiplas aplicações na indústria, como de detergentes, alimentos, fármacos, produção de biodiesel e tratamento de efluentes (ANDUALEMA e GESSESSE, 2012; REINEHR et al., 2014; ANGAJALA et al., 2016).

Tais enzimas podem ser encontradas em vegetais, animais e microrganismos, onde a principal fonte para aplicação comercial é a microbiana, por ser considerada mais estável e apresentar maior facilidade de aumento de escala. No entanto, o tempo e o número de operações unitárias elevados destinados ao isolamento e purificação de biocatalisadores provenientes de microrganismos e animais podem restringir sua utilização (MESSIAS et al., 2011; ALVES et al., 2017). Em contrapartida, as lipases de origem vegetal apresentam a possibilidade de obtenção a partir de etapas de extração e purificação realizadas por técnicas simples e de baixo custo, podendo se tornar uma alternativa para a indústria (KAPOOR e GUPTA, 2012).

Dentre as enzimas lipolíticas produzidas a partir de vegetais, uma fonte em potencial a ser estudada é a amêndoa do pequi. O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é amplamente encontrado no cerrado brasileiro, segundo maior bioma da América do Sul, que ocupa aproximadamente 2 milhões de km² do território nacional. No ano de 2016, mais de 20 mil toneladas do fruto foram produzidas no país, indicando o mesmo como uma importante opção de renda e alimentação para as populações residentes nas regiões extrativistas (AMORIM et al., 2016; LEÃO et al., 2017; LEÃO et al., 2018).

O pequi é composto por amêndoa, polpa, espinhos e casca, onde as fontes alimentares estão concentradas nos dois primeiros componentes estruturais, que podem ser utilizados industrialmente ou na culinária (OLIVEIRA et al., 2008). A amêndoa é uma oleaginosa encontrada no interior do pequi ainda pouco explorada comercialmente. Por ser rica em lipídeos, o que lhe confere grande valor nutritivo, acredita-se na possibilidade de obtenção de uma fonte importante de extração de lipase, enzima de forte interesse para a indústria de alimentos. Um dado que ajuda a reforçar essa expectativa é sua estimativa do teor de proteínas, variando entre 24 e 54%, sendo considerado o mais alto em toda a estrutura do fruto

(SANTOS et al., 2013; CARDOSO et al., 2019).

O processo de purificação de um bioproduto representa grande parte dos custos totais de produção, principalmente quando se deseja obter elevado grau de pureza – como ocorre com as enzimas. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas que sejam, ao mesmo tempo, efetivas e econômicas em sua aplicação em larga escala, sem que a atividade biológica da molécula seja perdida. Uma técnica que apresenta tais características de forma conveniente é a partição em sistemas aquosos bifásicos – os SABs (SANTOS et al., 2014).

Os SABs apresentam diversas vantagens, como o rápido equilíbrio de fases e transferência de massa, a possibilidade de reciclagem das fases e a boa reprodutibilidade, embora ainda possuam uma grande desvantagem que é o custo elevado de alguns reagentes químicos a serem usados na partição. Costumam ser muito aplicados em etapas iniciais de particionamento de enzimas, mas em alguns casos podem até mesmo substituir os clássicos sistemas cromatográficos (CAVALCANTI et al., 2006; BARBOSA et al., 2011).

O processo de extração e purificação da lipase a partir da amêndoa do pequi ainda não foi documentado na literatura. Dessa forma, o trabalho em questão teve por objetivo realizar um estudo da extração de lipase presente na amêndoa do pequi, particionando-a em sistema aquoso bifásico composto por PEG/isopropanol, sulfato de amônio e água.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pequi

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) – conhecido popularmente como piqui, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil – é uma espécie nativa do cerrado brasileiro. Considerado o segundo maior bioma da América do Sul, o cerrado ocupa aproximadamente 2 milhões de km² do território nacional e está distribuído entre os estados do Pará, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Ceará e Maranhão (MARIANO et al., 2009; AMORIM et al., 2016).

O pequizeiro é uma árvore pertencente à família *Caryocaraceae*, que apresenta alcance de até 12 metros de altura com tronco de aspecto áspero e resistente. As folhas são formadas por três folíolos com as bordas recortadas, enquanto as flores são grandes e possuem coloração amarelada. Cada árvore pode produzir em média 6 mil frutos por ano entre os meses de novembro e março, sendo que algumas espécies podem ser encontradas em outras épocas do ano (MELO Jr. et al., 2004; OLIVEIRA e SCARIOT, 2010).

O fruto de pequi é composto por exocarpo ou pericarpo (camada fina de casca), de coloração esverdeada ou marrom-esverdeada; mesocarpo externo (camada espessa de casca), com coloração pardo-acinzentada; mesocarpo interno (polpa – porção comestível do fruto), de coloração amarelada; endocarpo espinhoso e amêndoa, que é revestida por um tegumento fino e marrom, também considerada uma porção comestível do pequi. A camada espinhosa é a responsável pelo nome dado ao fruto, originado do tupi “pyqui”, onde “py” significa casca e “qui” significa espinho (ALMEIDA e SILVA, 1994; LIMA et al., 2007). Na Figura 1, é possível visualizar a estrutura do pequi em suas divisões.



Figura 1: Estrutura do fruto do pequi.

Fonte: próprio autor.

Embora apresente diversas aplicações e corresponda à uma significativa área geográfica, a cultura do pequi não possui cultivo comercial, onde a exploração ainda é basicamente extrativista e pouco industrializada. O espinho presente em seu interior é um fator determinante para essa dificuldade na comercialização, visto que impede a remoção eficiente da polpa e da amêndoa. De todo modo, a extração do fruto é uma importante opção de renda e alimentação para as populações que residem nessas regiões, através da utilização *in natura* ou de derivados (OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre os produtos derivados do pequi, são encontradas aplicações para diferentes segmentos. A polpa é utilizada na culinária regional, por exemplo, na fabricação de licor e na elaboração de pratos típicos, como o arroz com pequi. A amêndoa é usualmente abordada como ingrediente de farofas, doces e paçocas, além de ser consumida salgada como petisco. O óleo extraído da polpa é empregado na culinária; na indústria de cosméticos, produzindo sabonetes e cremes fortificantes para pele; e na medicina popular, já que seu efeito tonificante combate a bronquite, gripe e resfriado. Por fim, a separação das porções alimentares fornece como resíduo a casca do pequi, componente que pode oferecer uma farinha de sabor distinto e característico com alto teor de fibra alimentar (CARRAZZA e ÁVILA, 2010; LIMA et al., 2007; SANTOS, et al., 2013; LEÃO et al., 2017).

Polpa e amêndoa, fontes alimentares do pequi, são componentes estruturais ricos em fibras e minerais, principalmente zinco, cobre e fósforo, o que as tornam importantes aliadas na nutrição humana (Tabela 1). Por ser uma oleaginosa, a amêndoa possui alto teor de lipídeos, e destaca-se também no alto teor de proteínas, sendo este considerado o mais alto em toda a estrutura do fruto (BIDERMAN, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; CARDOSO et al., 2019). Tais informações ajudam a embasar a proposta de que a amêndoa do pequi pode conter potencial para produção de lipase, enzima de forte interesse para a indústria de alimentos.

Tabela 1 – Composição química centesimal da polpa e amêndoa do pequi expressas em matéria seca.

Constituintes	Polpa	Amêndoa
Umidade (%)	76,0	35,0
Cinzas (g)	2,0	5,0
Proteínas (g)	6,71	24,6
Lipídeos (g)	61,79	42,2
Carboidratos (g)	37,5	28,2

Fonte: OLIVEIRA et al., 2008.

2.2 Lipase

As lipases (triacilglicerol hidrolases (E.C. 3.1.1.3)), enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, possuem como principal função biológica a catalisação da *hidrólise* de longas cadeias de triacilglicerol liberando ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (GANDRA et al., 2008). A reação reversa, que é a síntese de ésteres a partir de um álcool e um ácido carboxílico sob condições microaquosas, também pode ser catalisada, conhecida como *esterificação*. A combinação em uma sequência lógica de hidrólise e esterificação resultam em reações denominadas *interesterificações* (LOPES et al., 2011).

Outras reações de síntese (Figura 2) que também podem ser estimuladas são a *transesterificação* (troca de grupamentos acila entre dois acilgliceróis), *aminólise* (síntese de amidas), *acidólise* (transferência do grupamento acila entre um acilglicerol e um ácido carboxílico), *alcoólise* (transferência do grupamento acila entre um acilglicerol e um álcool), *glicerólise* (interesterificação do triacilglicerol com glicerol) e *lactonização* (esterificação intramolecular). As aplicações dessas reações fazem com que as enzimas lipolíticas estejam entre os biocatalisadores mais importantes para o uso industrial (OLIVEIRA et al., 2000; FREGOLENTE et al., 2009).

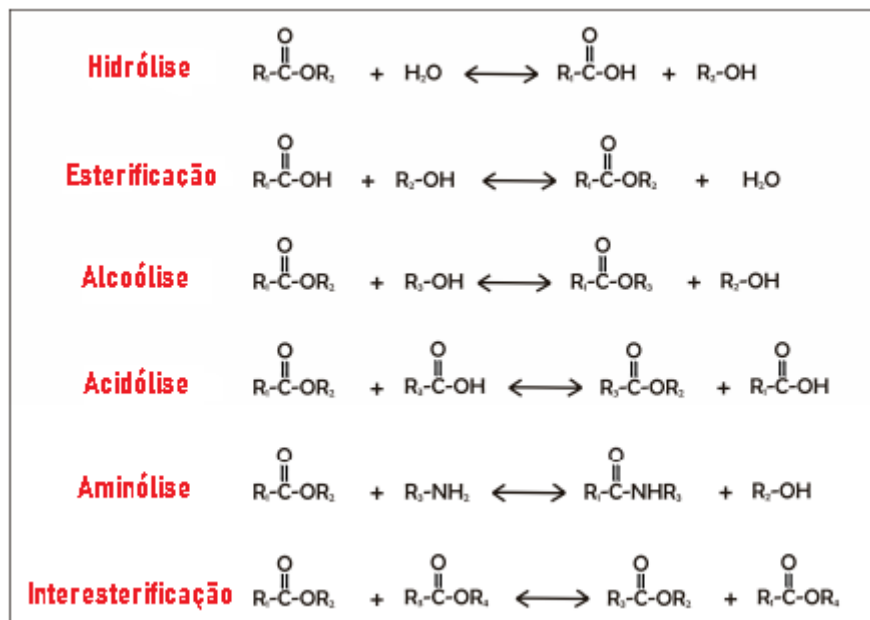


Figura 2: Reações catalisadas por lipases.

Fonte: Borrelli e Trono, 2015.

Em geral, tais grupos apresentam estabilidade em soluções aquosas neutras a temperatura ambiente, com atividade nos valores de pH entre 4 e 9, sendo os valores ótimos entre 6 e 8, e de temperatura entre 25°C e 70°C, onde a atividade ótima pode estar entre 30 e

40°C. Além disso, a lipase pode apresentar peso molecular entre 19 e 75 kDa e é definida como uma glicoproteína na qual a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo, no que se conhece por mecanismo de ativação interfacial (Figura 3) (LEHNINGER, 2006; ANDUALEMA e GESSESSE, 2012).

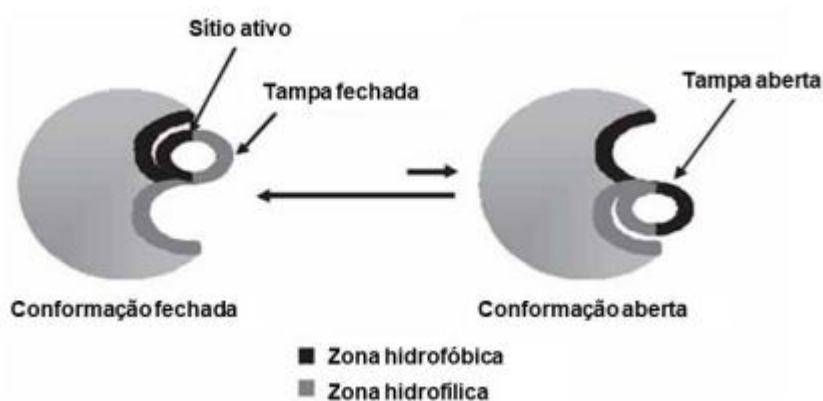


Figura 3: Mecanismo de ativação interfacial das lipases.

Fonte: Palomo et al., 2006.

De acordo com Borrelli e Trono (2015), as lipases possuem uma “tampa” de oligopeptídeos que cobre o sítio ativo e o isola do meio reacional, o que manterá sua conformação fechada na presença de uma interface hidrofílica. Em contrapartida, o contato com um meio hidrofóbico faz com que a “tampa” se abra, favorecendo a interação entre substrato e sítio ativo – característica que evidencia a capacidade desse biocatalisador em atuar apenas na interface óleo/água (MANOEL et al., 2015; TACIAS-PASCACIO et al., 2016).

As enzimas lipolíticas são amplamente encontradas na natureza a partir de fontes animal, vegetal ou microbiana, sendo a última considerada a mais estável entre as três, e por isso, tornou-se a fonte preferencial de obtenção. As lipases microbianas constituem um importante grupo de catalisadores devido à versatilidade de propriedades enzimáticas, obtendo uma série de reações passíveis de serem catalisadas. Além disso, são amplamente diversificadas em especificidade do substrato e apresentam facilidade no controle/aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, o que as tornam muito atrativas para aplicação na indústria. Em contrapartida, o tempo e o número de operações unitárias elevados destinados ao isolamento e purificação de enzimas provenientes de microrganismos e animais podem restringir sua utilização (HASAN et al., 2006; ROVEDA et al., 2010; ALVES et al., 2017).

Dos mais de 4000 biocatalisadores conhecidos, cerca de 200 são utilizados comercialmente, sendo grande parte deles de origem microbiana. Pelo menos 75% das enzimas industrializadas são pertencentes ao grupo das hidrolases, ao passo que as lipases constituem o terceiro maior grupo de venda do mundo, ficando atrás apenas das proteases e carboidrases. A partir disso, o alto potencial para uso industrial faz necessária a busca por fontes alternativas de obtenção dessa biomolécula, onde a fonte vegetal pode se tornar uma excelente escolha de extração sustentável (MESSIAS et al., 2011; BORRELLI e TRONO, 2015).

Enzimas vegetais tem sido vistas como uma opção ao uso de enzimas microbianas, sendo alguns dos fatores que evidenciam essa possibilidade: os processos de extração e purificação parcial podem ser realizados a partir de técnicas simples e que apresentam baixo custo; a purificação não requer operações unitárias complexas; a obtenção ocorre a partir de fontes renováveis; além da presença de características específicas ao seu mecanismo de funcionamento, como a tipo-seletividade (relaciona-se ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação do grupo acila) ou regioseletividade (associada à posição da hidrólise de ésteres de ácidos graxos). Entretanto, devido aos baixos níveis de lipase na sua fonte nativa, a produção em larga escala ainda é pouco abordada (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005; KAPOOR e GUPTA, 2012; EL-HEFNAWY e SAKRAN, 2014).

2.2.1 Lipase vegetal

A lipase de origem vegetal pode ser encontrada nas folhas, flores, caules, sementes ou frutos de diversos tipos de plantas, mais especificamente em sua fonte de reserva energética. As sementes são consideradas o principal ponto de armazenamento de substâncias de reserva, onde lipídeos, carboidratos e proteínas são as mais importantes para o seu desenvolvimento. Os biocatalisadores serão responsáveis pela conversão dos macronutrientes essenciais em compostos metabolizáveis (amido em glicose, triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos, e polipeptídeos em peptídeos menores ou aminoácidos) durante a germinação. Por esse motivo, cereais e óleos de sementes são considerados objetos de estudo preferenciais na extração de lipases vegetais (MARTINS et al., 2007; BON et al., 2008; MOUNGUENGUI et al., 2013).

Diversos trabalhos que abordam a obtenção de enzimas lipolíticas a partir de fontes vegetais podem ser encontrados na literatura e são listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Lipases obtidas a partir de diferentes fontes vegetais.

Origem	Referência
Fruto do dendezeiro (<i>Elaeis guineensis</i>)	Suwanno et al., 2017.
Látex de mamão (<i>Carica papaya</i>)	Rivera et al., 2012.
Farinha de trigo (<i>Triticum spp.</i>)	Melis et al., 2017.
Farelo de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Brunschwiler et al., 2013.
Grão de café (<i>Coffea arabica</i> L.)	Patui et al., 2014.
Semente de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	Mehdi et al., 2018.
Semente de mamona (<i>Ricinus communis</i> L.)	Aguieiras et al., 2014.
Semente de seringueira (<i>Hevea brasiliensis</i>)	Weerasooriya e Gunasekara, 2011.

Fonte: próprio autor.

2.2.2 Aplicações das lipases na indústria

Devido às suas múltiplas aplicações na indústria, as lipases destacam-se em diversas áreas, como é o caso da indústria de detergentes, um dos principais destinos da enzima comercializada atualmente, atuando como um aditivo, pois facilitam os processos de limpeza a partir da hidrólise de lipídeos e favorecem a solubilização dessas biomoléculas em água. A maior vantagem do seu uso em detergentes substituindo os polissulfatos está na biodegradabilidade e redução de impactos ambientais (POLAINA e MACCABE, 2007; ANDUALEMA e GESSESSE, 2012; SINGH et al., 2016).

No setor alimentício, os ácidos graxos livres obtidos a partir da hidrólise enzimática parcial ou seletiva de óleos e gorduras de diferentes alimentos conferem aos mesmos sabor e aroma peculiares de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação. Esse mecanismo pode ser observado na panificação e produção de bebidas fermentadas, de modo que a enzima será responsável por catalisar o processo de fermentação; e no processamento de carnes, onde também é feita a remoção do excesso de gordura. Na indústria de laticínios, a lipase atua na redução do teor de gordura do leite e na catálise da maturação de queijos. Em todos os exemplos citados, o uso do biocatalisador é um fator determinante para o aumento da vida de prateleira dos alimentos (JAEGER e EGGERT, 2002; CASTRO et al., 2004; GANDRA et al., 2008; KOBLITZ, 2008; CORTEZ et al., 2017).

A enzima ainda pode ser usada como suplemento na alimentação de não-ruminantes –

suprimindo deficiências enzimáticas e melhorando a utilização dos nutrientes das matérias-primas que apresentam difícil digestibilidade para os animais –, no tratamento de resíduos gordurosos da indústria e na produção de medicamentos, cosméticos e biodiesel (FERREIRA et al., 2005; MESSIAS et al., 2011; SARMAH et al., 2017).

2.3 Processos de separação e purificação

Os processos de separação de bioprodutos, também conhecidos como *downstream*, são fundamentais na obtenção de moléculas com alto grau de pureza, tornando-se altamente aplicáveis e necessários para a indústria. Essas etapas podem representar até 90% dos gastos com um determinado processo produtivo, fazendo com que o desenvolvimento de um protocolo eficiente e de baixo custo seja de extrema importância (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005; BARBOSA et al., 2011).

Existem diversas técnicas que podem ser empregadas na recuperação e purificação de enzimas, como: extração com solventes, precipitação e separação por membrana, que apresentam alto poder de concentração e baixa purificação. Por outro lado, métodos mais modernos – como cromatografias, eletroforese, extração em duas fases aquosas e extração com micela reversa – recuperam e purificam com alta eficiência (SILVEIRA et al., 2009; NAJAFPOUR, 2015).

A definição do grau de pureza requerido para uma proteína varia de acordo com a aplicabilidade da molécula. Proteínas para fins terapêuticos ou uso direto em humanos necessitam de alta pureza, o que não é tão necessário para aquelas que serão aplicadas em processos industriais. A purificação de biocatalisadores é composta por diversos estágios, sendo que, para alcançar o grau desejado, é necessário seguir alguns passos importantes: remoção de sólidos insolúveis (clarificação), isolamento do composto ou purificação de baixa resolução, purificação de alta resolução e polimento ou acondicionamento final do produto. Para a ampliação de escala, o método pode conter entre quatro e seis etapas, divididas em: ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração; e purificação, utilizando etapas de pré-tratamento, purificação de alta resolução e refinamento final (ASENJO, 1994; MONDAL et al., 2006; ZYDNEY, 2015).

A aplicação de processos *downstream* para enzimas enfrenta algumas dificuldades em promover sua recuperação de modo que a atividade biológica seja preservada, o que exige um elevado número de etapas de purificação. Uma das etapas que demanda maior atenção é a seleção de uma técnica de extração e isolamento específica e compatível ao produto, devido à

grande sensibilidade apresentada. Sendo assim, é importante controlar constantemente diversos parâmetros do processo de acordo com as características ótimas da molécula, como pH, temperatura, pressão osmótica, entre outros (HABERT et al., 2006; SOUZA et al., 2015).

2.3.1 Extração sólido-líquido

A extração é a etapa inicial de uma série de processos *downstream* para uma determinada enzima, onde obtém-se um extrato bruto contendo o bioproduto na forma solúvel. A escolha do método a ser empregado está relacionada com as características da matéria-prima, que pode ser uma matriz sólida ou líquida (CARTA e JUNGBAUER, 2010).

O método de separação de proteínas baseado na diferença de solubilidade é um dos mais utilizados e acessíveis para as fases iniciais de purificação. Nesse método, os sais apresentam efeito na solubilidade das proteínas, aumentando-a ou reduzindo-a de acordo com a concentração utilizada. Em baixas concentrações, os sais aumentam a solubilidade de muitas proteínas, no que se é conhecido por efeito *salting in*, ocasionado por alterações na tendência à ionização dos grupos R (cadeias laterais) livres dissociáveis da molécula. Já em concentrações elevadas, a solubilidade da proteína tende a diminuir a partir do efeito *salting out*, onde a hidratação dos íons de sal irá reduzir a disponibilidade de moléculas de água que solvatam as regiões hidrofóbicas da superfície da proteína. Dessa forma, aplicando-se os mecanismos para processos de separação, o efeito *salting in* pode favorecer a extração da enzima, enquanto o efeito *salting out* favorece sua precipitação (GHOSH, 2006; NAJAFPOUR, 2015).

A capacidade de influência dos sais na solubilidade de uma proteína está também em sua força iônica, que, além da concentração, está relacionada com o número de cargas elétricas presentes na estrutura do sal. Contudo, o efeito da variação da força iônica na solubilidade pode ser diferente para cada tipo de proteína devido ao arranjo tridimensional da molécula e a forma como os cátions e ânions encontram-se dispostos (MARZZOCO e TORRES, 2007; FENNEMA, 2010).

Para enzimas lipolíticas de origem vegetal, a extração sólido-líquido também se baseia na solubilidade do soluto com o solvente. O alcance de uma eficiência máxima para o processo pode ser obtido a partir do controle de diversos fatores, como concentração e tipo de solvente, presença de aditivos, temperatura, pH e tempo de extração (Tabela 3) (ANVARI, 2015).

Tabela 3 – Parâmetros de extração sólido-líquido de lipases de origem vegetal.

Fonte	Solvente	pH	T (°C)	Atividade enzimática específica (U/mg)	Referência
Farelo de mamona	Tampão acetato 0,1M	4,4	37	0,017	Salaberría et al., 2017.
Semente de mamona	Acetona	-	4	0,600	Corradini et al., 2019.
Semente de baobá	Hexano	-	4	0,005	Kouteu et al., 2016
Semente de maracujá	Tampão fosfato de sódio 0,1M	7,0	37	0,091	Santos et al., 2013.
Semente de seringueira	Tampão fosfato de potássio 0,05M + Triton X-100 (0,1%)	8,0	25	0,32	Weerasooriya e Gunasekara, 2011.

Fonte: próprio autor.

2.3.2 Extração líquido-líquido (ELL)

A extração líquido-líquido (ELL) é uma operação unitária que envolve a separação de componentes em solução a partir da transferência de massa entre dois líquidos parcialmente ou totalmente imiscíveis. A termodinâmica enuncia que, se um sistema sofre qualquer perturbação no balanço energético e de massa, o mesmo tenderá a buscar o equilíbrio termodinâmico. Logo, o processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases devido à sua miscibilidade em relação aos líquidos e à busca pelo equilíbrio do sistema (RABELLO, 1999; SANTOS, 1999; SONIYA e MUTHURAMAN, 2015). Dentre os fatores que podem governar o equilíbrio de fases, destacam-se: temperatura, pressão, natureza química e concentração inicial das substâncias na mistura (MADURO, 2005).

Nos últimos anos, a extração entre líquidos vem despertando o interesse em ser usada como uma etapa intermediária de separação devido às inúmeras vantagens que apresenta, como o alto rendimento, alto grau de purificação, seletividade, diminuição no número de etapas *downstream*, simplicidade de operação e baixo custo (SELVAKUMAR et al., 2010; PASSOS et al., 2013). No entanto, a dificuldade encontrada para empregar a ELL está na utilização de solventes orgânicos, que podem causar problemas ambientais e na saúde humana por serem tóxicos, inflamáveis e cancerígenos, além de não serem adequados para a separação de moléculas biológicas por apresentarem baixa solubilidade nestes sistemas (ASENJO e ANDREWS, 2011; MAGESTE et al., 2012; WU et al., 2017).

Uma alternativa interessante à extração líquido-líquido tradicional, capaz de solucionar o problema citado anteriormente, seria o princípio de partição em sistemas de duas

fases aquosas. Os sistemas aquosos bifásicos são formados por fases compostas predominantemente por água, oferecendo as condições necessárias para a separação de proteínas e outras biomoléculas, sem que haja mudança conformacional e, conseqüentemente, perda na atividade biológica (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009; BASSANI et al., 2010; PASSOS et al., 2013). Essa técnica parece ser aplicada mais eficientemente em etapas iniciais dos processos de purificação, mas em alguns casos podem até mesmo substituir os clássicos métodos cromatográficos (BARBOSA et al., 2011).

2.3.2.1 Sistemas aquosos bifásicos (SABs)

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são conhecidos desde o final do século XIX, quando Martinus Beijerinck observou a separação espontânea em duas fases líquidas límpidas ao misturar soluções aquosas de gelatina e ágar ou amido solúvel em determinadas faixas de temperatura e concentração dos componentes. Concluiu-se então, que a fase mais densa era composta por ágar ou amido enquanto a fase menos densa era enriquecida com gelatina, com ambas as fases apresentando a água como componente majoritário (ZHANG e LIU, 2010; MURARI et al., 2017). Essa descoberta, alinhada a outros estudos propostos ao longo dos anos, possibilitou o início da aplicação de SABs em processos de partição e purificação de biocompostos a partir dos trabalhos de Albertson realizados nos anos 50 (ZAFARINI-MOATTAR e NASIRI, 2010).

Desde então, as pesquisas nessa área vêm sendo aprofundadas, fazendo dos sistemas aquosos bifásicos uma importante ferramenta na partição e/ou concentração de compostos como células animais e vegetais, microrganismos e seus esporos, enzimas, proteínas (Tabela 4), ácidos nucleicos, entre outros.

Tabela 4 – Partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos.

Biomolécula	Sistema	Referência
Lipase	PEG e Fosfato de potássio	Padilha e Osório, 2019.
	Líquido iônico e Tetraidrofurano	Souza et al., 2015.
	Isopropanol e Sulfato de amônio	Ooi et al., 2009.
Protease	PEG e Citrato de sódio	Silva et al., 2017.
Lisozima e α -lactoalbumina	Líquido iônico e Fosfato de potássio	Sampaio et al., 2017.
α -amilase	PEG e Fosfato de potássio	Pereira et al., 2018.
α -lactoalbumina e β -lactoglobulina	Líquido iônico e Fosfato de potássio	Michel et al., 2015.
Bromelina	PEG e Sulfato de amônio	Coelho et al., 2013.
Invertase	PEG e Sulfato de magnésio	Padilha et al., 2016.

Fonte: próprio autor.

De um modo geral, a formação dos sistemas aquosos bifásicos é resultante da incompatibilidade entre dois compostos hidrofílicos a partir de certa concentração crítica, resultando em duas fases imiscíveis em que o maior constituinte é a água. Apesar de existir uma grande variedade de componentes para os SABS, os mais aplicados na partição de bioprodutos são os formados por dois polímeros (como polietilenoglicol e dextrana) ou um polímero e um sal (fosfato, citrato, sulfato) (GARZA-MADRID et al., 2010; JIANG et al., 2015).

O equilíbrio de um sistema líquido-líquido pode ser definido conforme a terceira lei da termodinâmica, em que a estabilidade é garantida quando a energia livre de Gibbs total atinge seu valor mínimo à temperatura e pressão constantes. Cada fase do sistema possui propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, composição, índice de refração e condutividade. Sendo assim, o equilíbrio termodinâmico é atingido quando não há nenhuma variação nas propriedades termodinâmicas, alcançando-se a separação das fases. A região que separa uma fase da outra é denominada interface e apresenta constante mudança nos valores das propriedades termodinâmicas intensivas, tendendo sempre para o valor da propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO et al., 2007; MONTEIRO

FILHO, 2010; LEVINE, 2012).

A extração com sistemas de duas fases aquosas oferece diversas vantagens, quando comparada a outros métodos de purificação, para o processamento em larga escala, sendo algumas delas: elevado rendimento, baixo custo, retenção da atividade biológica, seletividade e reprodutibilidade favoráveis, baixa tensão interfacial, possibilidade de reciclagem de fases, faixa de trabalho próxima do equilíbrio, facilidade na ampliação de escala (*scale up*) e uso em processos contínuos (SELBER et al., 2001; CAVALCANTI et al., 2006; MALPIEDI et al., 2009; SELVAKUMAR et al., 2010). Com isto, o interesse em sua aplicação deixou de se restringir à biologia celular para concentrar-se na análise dos fundamentos da separação de fases e da partição de proteínas; na redução dos custos do processamento; no aumento da seletividade da extração, como na adição de ligantes; na pesquisa de novos componentes formadores das fases, especialmente para substituir a dextrana, que é um componente de elevado custo; e na operação em múltiplos estágios (COIMBRA, 1995; RITO-PALOMARES e BENAVIDES, 2017; PADILHA e OSÓRIO, 2019).

1. Tipos de sistemas aquosos bifásicos

Sistemas aquosos bifásicos podem ser formados a partir de dois polímeros, um polímero e um sal (orgânico ou inorgânico), um solvente orgânico e um sal ou até mesmo misturas de líquidos iônicos e sais inorgânicos. Na Tabela 5 é possível observar alguns dos principais tipos de SABs e seus constituintes.

Tabela 5 – Principais categorias de sistemas aquosos bifásicos.

Tipo de sistema	Constituintes
Dois polímeros	Polietilenoglicol e Dextrana Polietilenoglicol e Polivinil Álcool Polipropilenoglicol e Dextrana
Polímero e composto de baixa massa molecular	Polietilenoglicol e Sulfato de amônio/magnésio Polietilenoglicol e Fosfato de potássio/sódio Polietilenoglicol e Glicose/Maltose
Solvente orgânico e Sal inorgânico	Álcool/Sais de citrato Álcool/Sais de sulfato

Fonte: Najafpour, 2015.

Apesar da grande variedade de sistemas compostos por duas fases aquosas, a quantidade de sistemas realmente aplicáveis para a extração líquido-líquido fica reduzida basicamente aos formados por PEG/sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG/dextrana, quando são analisados fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação das fases, possibilidade de esterilização, atoxicidade e faixa de aplicação (COIMBRA, 1995; COIMBRA et al., 2003). Por esses motivos, os estudos mais recentes tendem a concentrar-se nesses dois tipos de sistemas, dando enfoque principal para o sistema PEG/sal, devido ao baixo custo, menor viscosidade e menor tempo de separação de fases, visto que os componentes apresentam maior diferença de densidade (ASENJO e ANDREWS, 2011; TAN et al., 2017).

De acordo com Kula (1982), o efeito *salting out* em sistemas PEG/sal parece atuar retirando as proteínas da fase salina para a fase rica em polímero ou, se a solubilidade da proteína pela fase rica em PEG não for suficiente, precipitando a molécula na interface. Os limites de solubilidade são dependentes da natureza das proteínas, e portanto, espera-se um comportamento diferencial quando soluções contendo um conjunto de proteínas são manipuladas.

2. Diagramas de equilíbrio de fases

A eficiência na partição de compostos está diretamente ligada ao conhecimento do comportamento das fases do sistema, onde a determinação dos dados de equilíbrio é representada por meio dos diagramas de equilíbrio de fases. A modificação nas concentrações de componentes com propriedades distintas tende a favorecer a formação de sistemas monofásicos ou bifásicos. Nesse sentido, diagramas de fases possuem grande relevância nos estudos de separação de biomoléculas, visto que são usados como ferramenta básica no ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração (ZASLAVSKY, 1995; KABIRI-BADR e CABEZAS Jr., 1996). A representação gráfica (Figura 4) apresenta diagramas triangulares ou retangulares que expressam a concentração dos componentes do sistema.

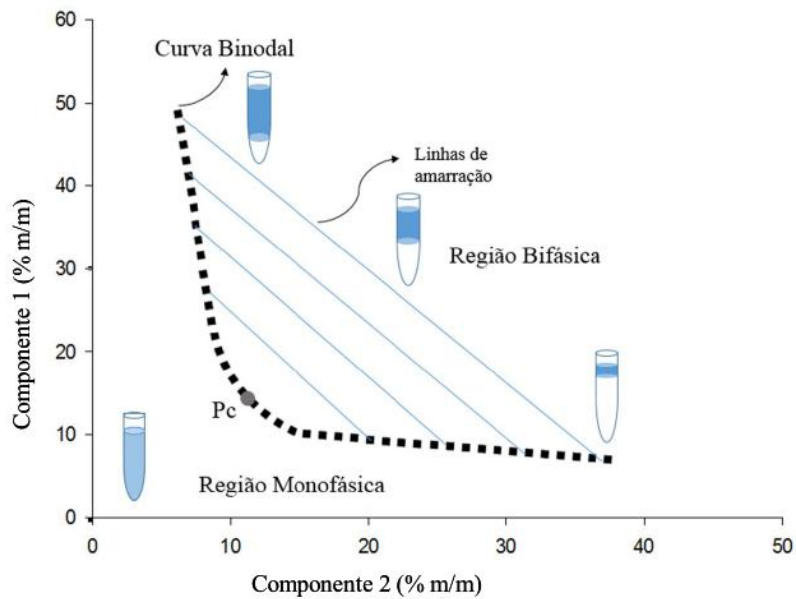


Figura 4: Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.

Fonte: SANTOS, 2018.

A partir do diagrama de fases é possível obter diversas informações, como por exemplo, a curva binodal, que é o limite entre as regiões monofásica e bifásica do diagrama, determinando em quais composições globais o sistema será homogêneo ou heterogêneo. As linhas retas que ligam dois pontos na curva binodal são denominadas linhas de amarração ou *tie-lines*. Qualquer ponto localizado na região bifásica e em uma mesma linha de amarração, fornecerá fases que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.) e propriedades extensivas diferentes (massa, volume, etc.) (DA SILVA e LOH, 2006).

Outro componente importante que ainda pode ser observado no diagrama de fases é o ponto crítico (Pc), com posicionamento no meio da curva binodal, dividindo-a como fase rica para os componentes 1 e 2 em cada lado do ponto. Essa é a região do sistema onde as propriedades físico-químicas das duas fases são teoricamente iguais. Quanto mais próxima a composição do sistema está do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases, ou seja, as composições e os volumes entre as fases serão teoricamente iguais. Entretanto, nos pontos globais próximos ao ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas podem provocar mudanças drásticas, levando o sistema de uma a duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

As variáveis de um sistema afetam diretamente a formação das fases e, conseqüentemente, dos diagramas. Dentre as variáveis que podem afetar os sistemas aquosos

bifásicos, as principais são as propriedades físico-químicas das proteínas e as variáveis relacionadas ao meio, como temperatura, massa molar e concentração dos constituintes; fazendo-se necessário o estudo de tais fatores quando se deseja entender o mecanismo de partição de um composto para determinado SAB. Além disso, a preferência da molécula por uma fase é dependente de suas composições e propriedades, pois o processo de partição é fundamentado na distribuição seletiva da molécula, e portanto, é imprescindível o conhecimento prévio do comportamento dos dados de equilíbrio do sistema (ALBERTSSON et al., 1994; MARCOS et al., 2002; TUBIO et al., 2004).

3. Parâmetros de partição

A seletividade de uma molécula biológica por uma das fases do sistema aquoso bifásico ocorre devido às interações entre a mesma e os componentes do sistema. O parâmetro que caracteriza o particionamento do composto de interesse é conhecido como coeficiente de partição (K), e pode ser definido como a razão entre a concentração desse composto na fase superior e inferior do SAB (Equação 1) (ALBERTSSON, 1986).

$$K = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (1)$$

Para ser considerado eficiente, o processo de purificação de uma enzima deve ser capaz de diferenciá-la dos contaminantes em fases distintas, no que se conhece como fator seletividade (Equação 2):

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (2)$$

Onde K_e e K_p são os coeficientes de partição de atividade enzimática e de proteínas, respectivamente.

O parâmetro fator de purificação (FP) indica a capacidade do sistema em remover contaminantes do extrato bruto enzimático. O cálculo de FP é dado como a razão entre a atividade enzimática específica na fase preferencial de particionamento do bioproduto e no extrato (Equação 3):

$$FP = \frac{[U_{esp}]_{fase}}{[U_{esp}]_{ext}} \quad (3)$$

Além disso, a recuperação teórica é uma variável que avalia a eficiência da partição de acordo com a quantidade de enzima presente na fase preferencial, ou seja, %Y determina o rendimento do SAB utilizando a Equação 4 (PICÓ et al., 2006):

$$y(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{RK_e}\right)} \quad (4)$$

Onde R corresponde à razão entre os volumes da fase superior e inferior e K_e ao coeficiente de partição de atividade da lipase.

A distribuição pelas fases ocorre como resultado das inúmeras interações existentes entre o composto a ser purificado e os componentes do sistema coexistindo em equilíbrio, como as interações de hidrogênio, iônicas, hidrofóbicas e forças de Van der Waals. Dessa forma, a variação do coeficiente de partição está relacionada com as condições a que o meio é submetido, seja pelas características intrínsecas da molécula de interesse (massa molar, carga superficial e hidrofobicidade) ou pela natureza do SAB utilizado (tipo de constituinte, massa molar, concentração, pH e força iônica) (MINAMI e KILIKIAN, 1998; FARRUGGIA et al., 2003; CHAIWUT et al., 2010).

No que se diz respeito ao particionamento de biocompostos complexos como as proteínas, o controle de variáveis é mais rigoroso, visto que toda operação unitária deve ser cuidadosamente aplicada de forma a preservar suas funções. O tamanho, a conformação (estrutura secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura primária), presença de carga elétrica e hidrofobicidade da proteína influenciarão diretamente o processo. Além disso, fatores relacionados à natureza do sistema apresentam efeito significativo na seletividade pelas fases, como massa molar e concentração dos polímeros, presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína, pH, temperatura e adição de sais inorgânicos (ZASLAVSKY, 1995; PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Outra condição com influência na separação de moléculas a partir de sistemas aquosos bifásicos é o efeito do impedimento estérico observado nas fases ricas em constituintes de alta massa molecular (fase superior), uma vez que duas macromoléculas não podem ocupar um mesmo espaço em um mesmo momento e, por isso, competem pela posição. Os espaços intersticiais ocupados na fase superior acarretam a diminuição da solubilidade das proteínas pela fase polimérica (RAWDKUEN et al., 2010; RAMAKRISHNAN et al., 2016).

Já nas fases compostas por sais (fase inferior), um dos fatores que requer maior atenção é a ocorrência do efeito *salting out*. Nesse mecanismo, as moléculas de água tendem a solvatar os íons de sal presentes em excesso na fase, e assim, a água de solvatação das proteínas é removida. Dessa forma, a diminuição da solubilidade do bioproduto pela fase inferior promove a partição para a fase superior. Sistemas compostos por polímeros de elevado peso molecular e/ou elevadas concentrações e com fase inferior simultaneamente concentrada em sal resultam na distribuição das biomoléculas para a interface, devido à influência dos efeitos citados – volume de exclusão e *salting out* (GHOSH; NELSON e COX, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo a extração de lipase da amêndoa do pequi, particionando-a em sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol/isopropanol, sulfato de amônio e água.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando diferentes soluções extratoras;
- Estudar a influência do tempo e do volume de solução extratora no processo de extração;
- Avaliar o efeito da precipitação com sulfato de amônio como etapa de pré-purificação;
- Obter dados de equilíbrio para o sistema aquoso bifásico formado por isopropanol, sulfato de amônio e água na temperatura de 35°C e aplicar os resultados obtidos de forma experimental;
- Estabelecer sistemas aquosos bifásicos de mesmo ponto global compostos por PEG 4000/isopropanol, sulfato de amônio e água nas temperaturas de 25°C e 35°C;
- Avaliar a partição da lipase nos sistemas aquosos bifásicos estudados com base no coeficiente de partição da proteína (K_p) e da enzima (K_e), recuperação teórica (Y%), seletividade (S), fator de purificação (FP) e variação da energia livre de Gibbs de transferência (ΔG);
- Identificar as massas molares das moléculas presentes no extrato bruto enzimático e na fase preferencial da enzima através da técnica de eletroforese SDS-PAGE.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DE CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

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

ALBERTSSON, P. A. **Aqueous polymer-phase systems partition of cell particles and macromolecules**. 3 ed. New York: Wiley & Sons, 1986.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. **Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos Cerrados**. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), 1994. 38p.

ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1-12, 2017.

AMORIM, D. J.; REZENDE, H. C.; OLIVEIRA, E. L.; ALMEIDA, I. L. S.; COELHO, N. N. M.; MATOS, T. N.; ARAÚJO, C. S. T. Characterization of Pequi (*Caryocar brasiliense*) shells and evaluation of their potential for the adsorption of Pb (II) ions in aqueous systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 616-623, 2016.

ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: review. **Biotechnology**, v. 11, p. 100-118, 2012.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: an overview of its current challenges and perspectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257-270, 2016.

ANVARI, M. Extraction of lipase from *Rhizopus microsporus* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 4, p. 723-731, 2015.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n. 49, p. 8826-8835, 2011.

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

BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; FRICKS, A. T.; ZANIN, G. M.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of chromatography B**, Aracaju, v. 879, p. 3853-3858, 2011.

BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 532-537, 2010.

BIDERMAN, I. Frutas do Cerrado. **Revista Nestlé Bionutrição e Saúde**, ano 3, n.10, p.41-45, 2009.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506p.

BORRELLI, G.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774–20840, 2015.

BRUNSCHWILER, C.; HEINE, D.; KAPPELER, S.; CONDE-PETIT, B.; NYSTROM, L. Direct measurement of rice bran lipase activity for inactivation kinetics and storage stability prediction. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 2, p. 272–277, 2013.

CARDOSO, C. M. M.; ZAVARIZE, D. G.; VIEIRA, G. E. G. Transesterification of Pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) bio-oil via heterogeneous acid catalysis: Catalyst preparation, process optimization and kinetics. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 1-7, 2019.

CARRAZZA, L.; ÁVILA, J. C. C. **Manual tecnológico de aproveitamento integral do fruto do pequi**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2010. 48p.

CARTA, G.; JUNGBAUER, A. **Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up**. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. 364p.

CARVALHO, C. C.; COIMBRA, J. S. R.; COSTA, I. A. F.; MINIM, L. H.; MAFFIA, M. C. Equilibrium data for PEG 4000 + Salt + Water systems from (278.15 to 318.15). **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, p. 351-356, 2007.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, T. S.; NETO, B. B.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; PESSOA Jr., A. Aqueous two-phase systems extraction of a-toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of chromatography B**, v.833, p.135-140, 2006.

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.

COELHO, D. F.; SILVEIRA, E.; PESSOA Jr., A.; TAMBOURGI, E. B. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 185-192, 2013.

COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L. A.; MEIRELLES, A. J. A. Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido. **Cadernos didáticos**, 95. Viçosa:

UFV, 2003. 43p.

COIMBRA, J. S. R. **Desempenho de um extrator tipo Graesser na separação de proteínas por soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. Tese (Doutorado) – Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1995.

CORRADINI, F. A. S.; ALVES, E. A.; KOPP, W.; RIBEIRO, M. P. A.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Kinetic study of soybean oil hydrolysis catalyzed by lipase from solid castor bean seeds. **Chemical Engineering Research and Design**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.02.008>

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2017.

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

EL-HEFNAWY, M. E.; SAKRAN, M. Characteristics of lipase in dormant seeds catalysed hydrolysis of olive oil in SDS-olive oil reversed microemulsions. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 92, n. 8, p. 1335-1339, 2014.

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.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

FERREIRA, V. P. A.; FERREIRA, W. M.; SALIBA, E. O. S.; TEIXEIRA, A. O. Reatividade in vitro de lipase submetida a diferentes tratamentos tecnológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, p. 340-344, 2005.

FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R.; BATISTELA, C. B. Produção de monoglicerídeos e diglicerídeos via glicerólise enzimática e destilação molecular. **Química Nova**, v. 32, p. 1539-1543, 2009.

GANDRA, K. M.; DEL BIANCHI, M.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 182-192, 2008.

GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human serum albumin as proof of concept. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1082-1087, 2010.

GHOSH, R. **Principles of bioseparations engineering**. Singapore: World Scientific Publishing, 2006. 282p.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por**

membranas. Rio de janeiro: E-Papers. 2006. 180p.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**; v. 39, p. 235-251, 2006.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 390-397, 2002.

JIANG, B.; FENG, Z.; LIU, C.; XU, Y.; LI, D.; JI, G. Extraction and purification of wheat-esterase using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2878-2885, 2015.

KABIRI-BADR, M.; CABEZAS Jr., H. A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v.115, p.39-58, 1996.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process biochemistry**, New Delhi, v. 47, p. 555-569, 2012.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: Teoria e Aplicações Práticas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242p.

KOUTEU, P. A. N.; BARÉA, B.; BAROUH, N.; BLIN, J.; VILLENEUVE, P. Lipase activity of tropical oilseed plants for ethyl biodiesel synthesis and their typo-and regioselectivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 46, p. 8838-8847, 2016.

KULA, M. R.; KRONER, K. H.; HUSTED, H. Purification of enzyme by liquid-liquid extraction. **Advances Biochemical Engineering**, v. 24, p. 73-118, 1982.

LEÃO, D. P.; BOTELHO, B. G.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S. Potential of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peels as sources of highly esterified pectins obtained by microwave assisted extraction. **Food Science and Technology**, v. 87, p. 575-580, 2018.

LEÃO, D. P.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BASTOS, R.; COIMBRA, M. A. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. **Food chemistry**, Belo Horizonte, v. 225, p. 146-153, 2017.

LEVINE, I. N. **Físico-química.** 6 Ed. São Paulo: LTC, 2012. 189p.

LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira Fruticultura**, v.29, p.695-698. 2007.

LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? **Food Science and Technology**, Campinas, v. 31, n. 3, p. 603-613, 2011.

MADURO, R. M. **Equilíbrio líquido-líquido em sistemas nicotina+água+extratante.** Dissertação (Mestrado) – Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MAGESTE, A. B.; SENRA, T. D. A.; HESPANHOL, M. C. S.; BONOMO, R. C. F. B.; DA SILVA, L. H. M. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69-77, 2012.

MALPIEDI, L. P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G. A.; NERLI, B. B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers. **Separation Purification Technology**, v. 65, p. 40-45, 2009.

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53-57, 2015.

MARCOS, J. C.; FONSECA, L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Application of surface response analysis to the optimization of penicillin acylase purification in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.1006-1004, 2002.

MARIANO, R. G. B.; COURI, S.; FREITAS, S. P. Enzymatic technology to improve oil extraction from *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi) pulp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 637-643, 2009.

MARTINS, M. T. C. S.; PÔRTO, N. A.; CANUTO, M. F. S.; BRUNO, R. L. A. Composição química de sementes de espécies do gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 621-623, 2007.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 404p.

MEHDI, W. A.; MEHDE, A. A.; ÖZACAR, M., ÖZACAR, Z. Characterization and immobilization of protease and lipase on chitin-starch material as a novel matrix. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 947-958, 2018.

MELIS, S.; PAULY, A.; DELCOUR, J. A. Impact of lipases with different substrate specificity in wheat flour separation on the properties of the resultant gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 77, p. 291-296, 2017.

MELO Jr., A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S. R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 66, p. 56-65, 2004.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MICHEL, B.; NEVES, M. T.; SOUSA, R. C. S.; CHAGAS, M. M.; MARTINS, B. A.; COIMBRA, J. S. R. Partição de proteínas do soro do leite em sistemas aquosos bifásicos baseados em líquidos iônicos. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1148-1152, 2015.

MINAMI, N. M.; KILIKIAN, B. V. Separation and purification of glucoamylase in aqueous two-phase systems by a two-step extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 309-312, 1998.

MONDAL, K.; GUPTA, M. N.; ROY, I. Affinity-based strategies for protein purification. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3499-3504, 2006.

MONTEIRO FILHO, E. S. Sistemas aquosos bifásicos: uma alternativa para purificação de biomoléculas e simulação de sistemas líquidos complexos. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB** (ISSN 2178-9436), Jaboticabal, v. 1, n. 1, p. 33-41, 2010.

MOUNGUENGUI, R. W. M.; BRUNSCHWIG, C.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P.; BLIN, J. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 39, p. 441-456, 2013.

MURARI, G. F.; PENIDO J. A.; SILVA, H. M.; BAÊTA, 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**, v. 198, p. 43-49, 2017.

NAJAFPOUR, G. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 2. ed. Amsterdã: Elsevier Science, 2015. 668p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

OLIVEIRA, M. E. B.; GUERRA, N. B.; MAIA, A. H. N.; ALVES, R. E.; MATOS, N. M. S.; SAMPAIO, F. G. M.; LOPES, M. M. T. Características químicas e físico-químicas de pequis da Chapada do Araripe-Ceará. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.1, p.114-115, 2010.

OLIVEIRA, W. L. D; SCARIOT, A. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do pequi**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 84p.

OLIVEIRA, M. E. B.; GUERRA, N. B.; BARROS, L. M.; ALVES, R. E. **Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi**. Fortaleza: Embrapa agroindústria tropical, 2008. 33p.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F. De; MEI, L. H. I. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, Lorena, v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.

OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1083-108, 2009.

PADILHA, G. S.; OSÓRIO, W. R. Economic method for extraction/purification of a *Burkholderia cepacia* lipase with potential biotechnology application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2019. doi:10.1007/s12010-019-03041-x

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**, v. 101, p. 157-165, 2016.

PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; SEGURA, R. L.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE R.; GUISAN, J. M. **Purification, immobilization, hyperactivation, and stabilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports**. In: Guisán JM, editor. Immobilization Of Enzymes And Cells (Methods in Biotechnology). 2 Ed. Humana Press. p. 449-466, 2006.

PASSOS, H.; TRINDADE, M. P.; VAZ, T. S. M. DA COSTA, L. P.; FREIRE, M. G. F.; COUTINHO, J. A. P. The impact of self-aggregation on the extraction of biomolecules in ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 108, p. 174-180, 2013.

PATUI, S.; CLINCON, L.; PERESSON, C.; ZANCANI, M.; CONTE, L.; DEL TERRA, L.; BRAIDOT, E. Lipase activity and antioxidant capacity in coffee (*Coffea arabica* L.) seeds during germination. **Plant Science**, v. 219-220, p. 19-25, 2014.

PEREIRA, A. S.; FONTAN, R. I. C.; FRANCO, M.; SOUZA Jr., E. C.; VELOSO, C. M.; SAMPAIO, V. S.; BONOMO, R. C. F. Study of alpha-amylase obtained by solid state fermentation of cassava residue in aqueous two-phase systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 1141-1152, 2018.

PESSOA Jr., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 444p.

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.

POLAINA, J.; MACCABE, A. C. **Industrial enzymes: structure, function and application**. Netherlands: Springer, 2007. 336p.

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

RAMAKRISHNAN, V.; GOVEAS, L. C.; SURALIKERIMATH, N.; JAMPANI, C.; HALAMI, P. M.; NARAYAN, B. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 19-27, 2016.

RAWDKUEN, S.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P. 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**, v. 89, n. 1, p. 73-80, 2010.

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcóólise. **Química Nova**, Erechim, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

RITO-PALOMARES, M.; BENAVIDES, J. **Aqueous two-phase systems for bioprocess development for the recovery of biological products**. Switzerland: Springer, 2017. 196p.

RIVERA, I.; MATEOS-DÍAZ, J. C.; SANDOVAL, G. Plant lipases: partial purification of *Carica papaya* lipase. **Methods in Molecular Biology**, v. 861, p. 115-122, 2012.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

SAGIROGLU, A.; ARABACI, N. Sunflower seed lipase: Extraction, purification and characterization. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 35, p. 37-51, 2005.

SALABERRÍA, F.; PALLA, C.; CARRÍN, M. E. Hydrolytic activity of castor bean powder: effect of gum arabic, lipase and oil concentrations. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 9, n. 5, p. 741-745, 2017.

SAMPAIO, V. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; SOUSA, R. C. S.; SOUZA Jr., E. C.; FONTAN, R. C. I.; GANDOLFI, O. R. R. Partitioning behavior of lysozyme and α -lactalbumin in aqueous two-phase system formed by Ionic Liquids and Potassium Phosphate. **International Journal of Food Engineering**, v. 13, n. 10, 2017.

SANA, N. K.; HOSSIN, I.; HAQUE, E. M.; SHAHA, R. K. Identification, purification and characterization of lipase from Germinating Oil Seeds (*Brassica napus* L.). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 7, p. 246-252, 2004.

SANTOS, K. A. **Sistemas aquosos bifásicos para partição de amilases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 10535 usando fermentação em estado sólido do resíduo de mandioca**. Dissertação (Mestrado) – Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2018.

SANTOS, T. C.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M.; FINOTELLI, P. V.; AMARAL, P. F. F. **Purificação de lipase produzida a partir *Yarrowia lipolytica* por meio sistema aquoso bifásico e ultrafiltração**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, 2014.

SANTOS, F. S.; SANTOS, R. F.; DIAS, P. P.; ZANÃO Jr.; L. A.; TOMASSONI, F. A cultura do Pequi (*Caryocar brasiliense* camb.). **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 2, n. 3, p. 46-57, 2013.

SANTOS, K. C.; CASSIMIRO, D. M. J.; AVELAR, M. H. M.; HIRATA, D. B.; CASTRO, H. F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462-470, 2013.

SANTOS, G. R. **Equilíbrio líquido-Líquido em sistemas eletrolíticos aquosos**. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; YAMUNA RANI, K.; SRIDHAR, R.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. **Biotechnology Progress**, p. 1-67, 2017.

SELBER, K.; COLLEN, A.; HYYTIA, T.; PENTTILA, M.; TJERNELD, F.; KULA, M. R. Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, v. 10, p. 229-236, 2001.

SELVAKUMAR, P.; LING, T. C.; WALKER, S.; LYDDIATT, A. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: a novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS. **Separation and Purification Technology**, v. 75, p. 323-331, 2010.

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 tamarii* URM4634 using PEG-Citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.9, p. 168-173, 2017.

SILVA, F. A. **Estudo da produção de biodiesel utilizando etanol e óleo de soja ou de macaúba, catalisada por lipase de mamona e de *Thermomyces lanuginosus***. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2015.

SILVEIRA, E.; SOUZA Jr., M. E.; SANTANA, J. C. C.; CHAVES, A. C.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from *Ananas comosus* crude extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 149-157, 2009.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-15, 2016.

SONIYA, M.; MUTHURAMAN, G. Comparative study between liquid-liquid extraction and bulk liquid membrane for the removal and recovery of methylene blue from waste water. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 30, p. 266-273, 2015.

SOUZA, R. L.; LIMA, R. A.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. **Separation e Purification Technology**, Aracaju, v. 155, p. 118-126, 2015.

SUWANNO, S.; RAKKAN, T.; YUNU, T.; PAICHID, N.; KIMTUN, P.; PRASERTSAN, P.; SANGKHARAK, K. The production of biodiesel using residual oil from palm oil mill effluent and crude lipase from oil palm fruit as an alternative substrate and catalyst. **Fuel**, v. 195, p. 82-87, 2017.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; PEIRCE, S.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; YATES, M.;

ROSALES-QUINTERO, A.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: Tuning their stability, activity and specificity. **RSC Advances**, v. 6, n. 102, p. 1-46, 2016.

TAN, Z.; LI, F.; ZHAO, C.; TENG, Y.; LIU, Y. Chiral separation of mandelic acid enantiomers using an aqueous two-phase system based on a thermo-sensitive polymer and dextran. **Separation and Purification Technology**, v. 172, p. 382-387, 2017.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal Chromatography B**, v.799, p. 293-301, 2004.

WEERASOORIYA, M. K. B.; GUNASEKARA, O. S. W. Partially purified rubber seed lipase for efficient removal of fatty soil. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 39, n. 1, p. 69-76, 2011.

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.

YESILOGLU, Y.; DEMIRKAN, B. Biocatalytic properties of lipase from walnut seed (*Juglans regia* L.). **Journal of the American oil Chemists' Society**, v. 87, p.659-665, 2010.

ZHANG Y. Y.; LIU J. H. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 909-912, 2010.

ZAFARINI-MOATTAR, M. T.; NASIRI, S. (Liquid + liquid) and (liquid + solid) equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly ethylene glycol di-methyl ether 2000 and di-sodium hydrogen phosphate. **Journal of Chemistry Thermodynamics**, v. 42, p. 1071-1078, 2010.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning**. New York: Marcel Dekker, 1995.

ZYDNEY, A. L. Continuous downstream processing for high value biological products: a review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 465-475, 2015.

ARTIGO 1

Otimização da extração da lipase obtida a partir da amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).

RESUMO

Realizou-se um estudo de otimização das condições de extração (tempo e volume de solução) de lipase presente na amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio 0,1M e aditivos (tween 80 0,25% e cloreto de cálcio 1%). Realizou-se um teste inicial de escolha da solução extratora com meios compostos por sulfato de amônio, sulfato de amônio + tween 80 e sulfato de amônio + cloreto de cálcio, fixando os parâmetros tempo e volume de solução extratora em 60 minutos e 2,5 mL para 0,5 g de amostra desengordurada. O planejamento experimental foi conduzido de maneira inteiramente casualizada (DIC) com fatorial 4x4 para as variáveis independentes tempo e volume de solução extratora. Os resultados observados no teste de comparação entre médias (teste de Tukey) identificaram diferença significativa ($P < 0,05$) com valores máximos de atividade enzimática específica (8,17 U/mg) para a separação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e atividade enzimática total (447,23 U) e recuperação de proteínas (57,97%) para o meio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Tween 80, optando-se por otimizar as condições de extração para as duas soluções. O planejamento experimental demonstrou efeito significativo dos parâmetros tempo e volume nas variáveis resposta atividade enzimática (U) e recuperação de proteínas (%) para ambas as soluções extradoras. Para a solução composta por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, observou-se como maior atividade $A_e = 800,03$ U no volume de 2,25 mL e recuperação de 72,42% em 2,75 mL, ambas no tempo de extração de 20 minutos. Já para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + tween 80, obteve-se atividade máxima de 1726,18 U em 3,0 mL de solução durante 25 minutos de extração e 98,74% de recuperação em 15 minutos. Apesar de alcançar valores superiores para as variáveis resposta, o meio contendo sulfato de amônio + tween 80 apresentou resultados com maior variabilidade estatística (R^2 inferior), e por isso, a solução contendo apenas sulfato de amônio foi selecionada como meio para extração da lipase.

Palavras-chave: extração sólido-líquido; otimização; planejamento experimental.

ABSTRACT

The objective of this work was study the optimization of extraction conditions (time and volume of solution) of pequi seed lipase using ammonium sulfate and additives (tween 80 and calcium chloride) to propose different extraction solutions. An initial test of extraction solution was performed with solutions composed by ammonium sulfate, ammonium sulfate + tween 80 and ammonium sulfate + calcium chloride. The parameters time and volume of extraction solution were fixed in 60 minutes and 2.5 mL to 0.5 g of degreased sample. The design of experiments was completely randomized with a 4x4 factorial design for the independent variables time and volume of extraction solution. The results observed in the mean comparison test identified significant difference ($P < 0.05$) with values of specific enzymatic activity (8.17 U/mg) for $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ extract and enzyme activity (447.23 U) and protein recovery (57.97%) for $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Tween 80. Therefore, it was concluded by optimizing the extraction conditions for both solutions. The experimental design showed significant effect of the time and volume parameters on response variables enzymatic activity (U) and protein recovery (%) for both extractor solutions. For the solution composed by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the highest activity was 800.03 U in 2.25 mL and 72.42% of recovery in 2.75 mL, both at 20 minutes of extraction. For $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Tween 80, an activity of 1726.18 U was obtained in 3.0 mL of solution during 25 minutes of reaction and 98.74% of recovery at 15 minutes. Despite having higher values for the response variables, the ammonium sulphate + tween compound showed higher statistical variability results (lower R^2). Thus, the solution containing only ammonium sulfate was selected for lipase extraction.

Keywords: experimental design; optimization; solid-liquid extraction.

1. INTRODUÇÃO

Diversos processos tecnológicos utilizam catalisadores biológicos para potencializar a conversão química. Esses biocompostos apresentam como principal vantagem o aumento considerável da velocidade das reações com alta seletividade e especificidade à molécula de interesse, impedindo que ocorram interações paralelas durante as transformações moleculares. Embora o interesse industrial por tecnologias enzimáticas tenha crescido significativamente nos últimos anos, ainda há grande espaço para expansão, considerando seu potencial para substituição dos catalisadores químicos (NARWAL e GUPTA, 2013; TSAI, 2014; TALENS-PERALES et al., 2016).

As lipases (triacilglicerol hidrolases (E.C. 3.1.1.3)) constituem um importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas. Pertencentes a família das hidrolases, possuem como principal função biológica a catálise de reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. Sua atuação ocorre na interface óleo-água, o que lhes confere potencial tanto em meio aquoso como em meio orgânico (REINEHR et al., 2014; CASTIGLIONI et al., 2018; JAVED et al., 2018). Diante de sua versatilidade, a aplicação das enzimas lipolíticas se estende a diversos segmentos, como: detergentes (SAHAY e CHOUHAN, 2018), alimentos (BUBALO et al., 2015), fármacos (SETHI et al., 2016), produção de biodiesel (COLÍN-LUNA et al., 2018) e tratamento de efluentes (GARRIDO e SILVA, 2016).

Tais biomoléculas são encontradas em plantas, animais e microrganismos, onde as lipases de origem vegetal diferenciam-se devido à capacidade de produção a partir de etapas de isolamento e purificação realizadas por técnicas simples e de baixo custo, podendo se tornar uma opção para a indústria e, conseqüentemente, um objeto de desenvolvimento de pesquisas (KAPOOR e GUPTA, 2012; ANTUNES et al., 2017). Dentre as enzimas lipolíticas produzidas a partir de vegetais, uma fonte em potencial a ser estudada é a amêndoa do pequi, oleaginosa encontrada no interior do fruto ainda pouco explorada comercialmente. Por apresentar elevados teores de lipídeos e proteínas em sua composição química, acredita-se na possibilidade de obtenção de uma fonte importante de extração de lipase, enzima de forte interesse para o setor alimentício (AMORIM et al., 2016; LEÃO et al., 2018; CARDOSO et al., 2019).

A extração sólido-líquido é a etapa inicial de uma série de processos *downstream* para a obtenção de uma determinada enzima, onde a separação baseando-se na solubilidade está entre as técnicas mais utilizadas e acessíveis. Nesse método, os sais apresentam efeito na dissolução das proteínas, aumentando-a ou reduzindo-a de acordo com a concentração

utilizada. Em baixas concentrações, os sais aumentam a solubilidade no que se é conhecido por efeito *salting in*, favorecendo a extração (GHOSH, 2006; CARTA e JUNGBAUER, 2010; NAJAFPOUR, 2015). Além disso, o alcance de uma eficiência máxima para o processo pode se basear também no controle de diversos parâmetros, como concentração e tipo de solvente, temperatura, pH, tempo de reação e presença de aditivos. Dentro deste, podem ser citados o cloreto de cálcio, que auxilia na estabilidade da lipase e promove sua ativação devido aos íons Ca^{2+} , e o surfactante tween 80, que diminui a tensão interfacial e oferece maior contato enzima-substrato (CAVALCANTI et al., 2006; ANVARI, 2015; HERTADI e WIDHYASTUTI, 2015; PARIMI et al., 2017).

Embora as enzimas lipolíticas sejam amplamente estudadas, o processo de separação da lipase a partir da amêndoa do pequi ainda não foi documentado na literatura. Diante do exposto, o trabalho em questão teve como objetivo realizar um estudo de otimização das condições de extração (tempo e volume) de lipase presente na amêndoa do pequi utilizando Sulfato de amônio e aditivos para propor diferentes soluções extratoras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O trabalho experimental foi conduzido no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus Juvino Oliveira - Itapetinga.

2.2 Material

Sais inorgânicos sulfato de amônio (CAS No. 7783-20-2) e cloreto de cálcio (CAS No. 10035-04-8) e o surfactante tween 80 (CAS No. 9005-65-6) foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil), Fmaia (Minas Gerais, Brasil) e Dinâmica (São Paulo, Brasil), respectivamente. Todos os reagentes apresentam grau analítico e foram empregados sem purificação adicional.

2.3 Métodos

2.3.1 Preparo da amostra

Os pequis utilizados no experimento foram obtidos no comércio local do município de Salinas-MG, selecionando-se frutos maduros e não danificados.

As amêndoas foram retiradas do fruto a partir do corte da polpa ao meio com faca de aço inoxidável. Em seguida, foram lavadas, cortadas e submetidas ao processo de secagem em desidratador à 45°C até peso constante (96 horas). Após a secagem, a amostra foi macerada,

lavada com hexano na proporção 1:5 (m/v) em relação à sua massa final, com tempo de contato de 10 minutos, e filtrada com papel filtro em funil de vidro. O produto desengordurado foi mantido em recipiente aberto por 2 horas para evaporação do hexano residual.

2.3.2 Determinação da composição química centesimal

Determinou-se os teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos de acordo com a AOAC (2007), sendo o teor de carboidratos definido pela diferença em relação aos demais componentes do alimento.

2.3.3 Definição da solução extratora

Inicialmente, foram realizados testes com 3 tipos de soluções extratoras diferentes, a fim de definir a de maior potencial na extração de lipase para ser aplicada na etapa de otimização das condições do processo. As composições das soluções avaliadas foram:

- i. Sulfato de amônio 0,1M pH 7,0;
- ii. Sulfato de amônio 0,1M pH 7,0 + Tween 80 (0,25%);
- iii. Sulfato de amônio 0,1M pH 7,0 + Cloreto de cálcio (1%).

A extração ocorreu em recipientes de vidro colocados em banho ultrassônico a 30°C, onde os parâmetros tempo e volume de solução extratora foram fixados em 60 minutos e 2,5 mL para 0,5 g de amostra desengordurada, respectivamente, por serem os níveis máximos propostos para tais variáveis dentro do planejamento experimental. As amostras foram, então, centrifugadas por 10 minutos a 2000g para retirada dos sólidos em suspensão. Por fim, o teor de proteína total e a atividade enzimática no extrato foram medidos.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) constituído por três tratamentos com três repetições em cada tratamento. Para a análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste F e teste de Tukey para comparação entre médias, ao nível de 5% de significância.

2.3.4 Determinação do teor de proteínas

A quantificação de proteínas totais nos extratos obtidos foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda fixado em 595 nm. A curva analítica foi construída utilizando como padrão a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA).

2.3.5 Recuperação teórica de proteínas

A partir dos cálculos da porcentagem de proteína presente na amêndoa do pequi pelo método de Kjeldahl e da concentração de proteína após a extração pelo método de Bradford, encontrou-se a porcentagem de recuperação teórica de proteínas pela Equação 1:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{C_P \times V_{se}}{m_a \times w_p} \times 100 \quad (1)$$

Onde: C_P é a concentração de proteínas após a extração (g/mL), V_{se} é o volume de solução extratora utilizada (mL), m_a é a massa de amêndoa adicionada para a extração (g) e w_p é a fração mássica de proteína presente inicialmente na amêndoa.

2.3.6 Determinação de atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada conforme Winkler e Stukmann (1979) com modificações, utilizando o substrato sintético p-nitrofenil palmitato (p-NPP). O meio reacional é denominado solução C, composto pelas soluções A e B:

- Solução A: 162,0 mg de pNPP dissolvidos em 30,0 mL de isopropanol;
- Solução B: 9,0 g de Triton X-100 e 0,90 g de goma arábica dissolvidos em 450 mL de tampão Tris-HCl 0,09M, pH 8,0.

Para a solução C, foram adicionados 1,0 mL da solução A e 9,0 mL da solução B sob agitação contínua. Para cada tubo de ensaio, adicionou-se 0,5 mL da mistura em banho termostático a 37°C por 10 minutos para ambientação. Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL do extrato enzimático foi incubada juntamente à solução C por 15 minutos. A reação foi interrompida aquecendo as amostras a 100°C por 1 minuto, seguido de adição de 2,0 mL de acetona (PASTORE et al., 2003).

O p-nitrofenol liberado pela ação da lipase gera coloração amarelada que pode ser quantificada pela leitura da absorbância a 410 nm. A curva padrão foi construída utilizando-se p-nitrofenol. Uma unidade de lipase (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por mL por minuto nas condições descritas. Para o cálculo da atividade enzimática, foi utilizada a Equação 2:

$$U = \frac{C_{pNP} \times FD \times V_T \times V_{se}}{V_E \times t} \quad (2)$$

Onde: U é a unidade de atividade enzimática, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio; C_{pNP} é a concentração de p-nitrofenol (μmol) liberado por mL; FD é o fator de diluição; V_T é o volume total de reação; V_{se} é o volume de solução extratora; V_E é o volume de extrato enzimático; t é o tempo de reação (minutos).

Por fim, a atividade enzimática específica (U/mg) foi obtida através da razão entre a atividade enzimática (U) e a massa de proteína (mg).

2.3.7 Otimização das condições de extração

Após a escolha de sulfato de amônio e sulfato de amônio + tween 80 como melhores solventes baseando-se nos valores de atividade enzimática total e específica e recuperação de proteínas obtidos, as condições do processo de extração foram otimizadas a partir da avaliação do efeito das variáveis independentes tempo e volume de solução extratora (massa de amostra fixada em 0,5 g) sobre as variáveis resposta atividade enzimática e recuperação de proteínas. Na Tabela 1 é apresentado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com planejamento fatorial completo 4x4 e três repetições em todos os pontos a partir do software *SAS Studio*.

Tabela 1 – Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental utilizado no estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi.

Variável	Níveis			
Tempo (minutos)	15	30	45	60
Volume (mL)	1,0	1,5	2,0	2,5

Após avaliar estatisticamente as respostas obtidas nesse planejamento, desenvolveu-se um novo planejamento experimental fatorial 4x4, apresentando duas repetições em cada ponto, com novos níveis para tempo e volume de solução extratora (Tabela 2).

Tabela 2 – Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental utilizado no estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi.

Variável	Níveis			
Tempo (minutos)	10	15	20	25
Volume (mL)	2,25	2,5	2,75	3,0

Após nova avaliação estatística das respostas obtidas nesse planejamento, desenvolveu-se um terceiro planejamento experimental fatorial 4x4, com novos níveis para tempo e variando o volume proposto anteriormente (Tabela 3).

Tabela 3 – Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental utilizado no estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi.

Variável	Níveis			
Tempo (minutos)	12,5	15	17,5	20
Volume (mL)	2,25	2,5	2,75	3,0

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição química centesimal da amêndoa do pequi

Com base nas metodologias citadas, foi possível determinar a composição química centesimal da amêndoa do pequi expressa em matéria seca (Tabela 4).

Tabela 4 – Composição química centesimal da amêndoa do pequi expressa em matéria seca.

Constituintes	Amêndoa
Umidade (%)	25,58
Cinzas (g)	3,83
Proteínas (g)	24,41
Lipídeos (g)	40,15
Carboidratos (g)	31,61

A composição encontrada diverge, em alguns componentes, dos resultados visualizados na literatura, tendência comumente observada em frutos oriundos de propagação por sementes, como é o caso do pequi. Tais variações podem ser explicadas pela variabilidade genética, condições de cultivo (solo, clima, época de colheita) e condições de secagem estabelecidas (tempo, velocidade e temperatura do ar) (CELESTINO, 2010; DAMIANI et al., 2013).

Para a extração de enzimas lipolíticas, as variações nos teores de proteínas e lipídeos da amêndoa do pequi afetam diretamente a concentração de proteínas e atividade do extrato devido à disponibilidade para recuperação proteica em relação à matriz sólida e conversão enzimática de substrato em produto, respectivamente. Entretanto, os demais componentes também podem influenciar no processo de extração, como é o caso da umidade, que está relacionada com a atividade de água, e consequentemente, com a velocidade das reações, estabilidade e ativação da lipase (FENNEMA, 2010).

3.2 Definição da solução extratora

O resultado para o teste F na Análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa ($P < 0,05$) entre as soluções de extração. Sendo assim, realizou-se a avaliação por teste de comparação entre médias utilizando o teste de Tukey (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação entre médias das atividades enzimáticas total e específica e recuperação de proteínas utilizando diferentes soluções extratoras para o estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi. (CV = 3,75%, 0,41% e 3,94%)

Solução extratora	Atividade enzimática (U)	Atividade enzimática específica (U/mg)	Recuperação de proteínas (%)
Sulfato de amônio	447,23 ± 12,37 ^a	8,17 ± 0,02 ^a	44,84 ± 1,33 ^a
Sulfato de amônio + Tween 80	492,42 ± 11,98 ^b	6,96 ± 0,02 ^b	57,97 ± 1,4 ^b
Sulfato de amônio + Cloreto de cálcio	227,60 ± 7,29 ^c	6,58 ± 0,03 ^b	28,33 ± 1,13 ^c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os ensaios iniciais com diferentes soluções extratoras apresentaram atividade enzimática total máxima para sulfato de amônio + tween 80 ($A_{et} = 492,42$ U) e mínima para sulfato de amônio + $CaCl_2$ ($A_{et} = 208,16$ U). De forma semelhante, a solução sulfato de amônio + $CaCl_2$ obteve o menor atividade enzimática específica ($A_{ee} = 6,53$ U/mg), variável que está relacionada com a atividade existente em 1 mg de proteína, enquanto a solução composta apenas por sulfato de amônio alcançou o maior valor ($A_{ee} = 8,23$ U/mg). Para a recuperação de proteínas, a maior porcentagem foi observada com a solução contendo o aditivo tween 80 (57,97%) e a menor porcentagem é atribuída à solução com o aditivo cloreto de cálcio (28,33%).

O resultado do teste de comparação entre médias indicou que há diferença significativa entre as soluções no que se diz respeito à atividade enzimática específica. Nesse caso, é possível observar que o meio contendo apenas $(NH_4)_2SO_4$ foi superior aos demais, evidenciando a relação de maior atividade em menor quantidade de proteína. No entanto, a solução de $(NH_4)_2SO_4$ + tween 80 apresentou diferença significativa superior com relação à atividade enzimática total e recuperação de proteínas.

As variáveis atividade enzimática total e % de recuperação estão relacionadas ao desempenho do processo de extração. Já a atividade enzimática específica, relaciona-se com a análise de parâmetros de purificação, tornando inconclusivo o teste inicial com as três soluções extratoras. Optou-se, portanto, em realizar a otimização das condições de extração para Sulfato de amônio e sulfato de amônio + tween 80. Contudo, é importante ressaltar que

acrescentar aditivos implica no encarecimento do método e dificulta a posterior ampliação de escala, o que permite concluir que o mesmo só deve ser aplicado se aumentar consideravelmente a eficiência do protocolo de extração (LEHNINGER, 2006; BRESCIANI, 2011).

O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não é comumente abordado na literatura como extrator, onde sua principal função em processos de separação e purificação está na precipitação (*efeito salting out*) devido à diminuição da solubilidade pelos cátions NH_4^+ , considerados íons que desestabilizam proteínas pela série de Hofmeister. No entanto, seu uso em pequenas concentrações ($\leq 0,2$ M) pode favorecer a solubilidade da proteína (*efeito salting in*), e nesse caso, a extração sólido-líquido, em consequência da presença dos ânions SO_4^{2-} , que são íons estabilizantes. Esses dois mecanismos podem ser explicados pelo fato de que, em baixas concentrações, os íons dissociados tendem a reforçar a camada de solvatação da lipase, enquanto no aumento da concentração salina, os íons passam a competir com o bioproduto pelas moléculas de água disponíveis para formar sua própria camada de solvatação – fenômeno que pode induzir as interações intermoleculares da enzima, formando um agregado proteico conhecido como precipitado (FENNEMA, 2010; DEIVE et al., 2012; ANVARI, 2015).

O comportamento da solução contendo o emulsificante pode ter sido originado por alterações no estado de agregação do substrato e/ou alterações na estrutura da enzima. Como o tween 80 promove a diminuição da tensão interfacial entre lipídeos e água, é favorecido o contato entre o substrato e a lipase, e conseqüentemente, há uma tendência de aumento da atividade lipolítica (PETERS, 2002; CAVALCANTI et al., 2006), como pode ser observado em Mahmood et al. (2013) e Dobrev et al. (2015).

Já o resultado inferior encontrado para o uso do cloreto de cálcio contraria o que é visualizado na literatura, visto que, em geral, o íon Ca^{2+} auxilia na estabilidade e ativação da lipase, conforme observado em Hertadi e Widhyastuti (2015). Entretanto, existem situações em que a presença de sais cloreto no meio reacional pode estabelecer o efeito inverso ao esperado, ou seja, a inativação e/ou instabilidade das enzimas. No presente trabalho, o excesso de íons originado do sulfato de amônio juntamente com o aditivo provocou diminuição da atividade enzimática por um possível *efeito salting out* e/ou pela redução na atividade de água à medida que esses íons eram dissociados no meio e solvatados pelas moléculas de água livre, o que também foi reportado em Ripólles et al. (2011).

3.3 Otimização das condições de extração

Após a execução do primeiro planejamento experimental, foram obtidas as variáveis resposta Atividade enzimática (U) e Recuperação de proteínas (%) utilizando as duas soluções que apresentaram melhores resultados nos testes preliminares (Tabela 6).

Tabela 6 – Resposta em atividade enzimática e porcentagem de recuperação para o estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio e sulfato de amônio + tween 80 como soluções extratoras.

Experimento	Tempo (min)	Volume (mL)	Atividade enzimática (U)		Recuperação (%)	
			(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ + Tween 80	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ + Tween 80
1	15	1,0	429,23 ± 7,64	327,77 ± 10,49	80,11 ± 0,41	58,59 ± 7,34
2	15	1,5	566,30 ± 20,01	251,43 ± 7,05	86,07 ± 1,88	90,87 ± 3,55
3	15	2,0	701,42 ± 14,79	301,03 ± 7,70	89,86 ± 1,13	81,16 ± 3,07
4	15	2,5	549,27 ± 7,14	335,47 ± 10,73	94,15 ± 0,74	88,68 ± 3,53
5	30	1,0	340,21 ± 5,82	356,93 ± 7,15	45,35 ± 0,74	32,11 ± 1,45
6	30	1,5	426,36 ± 17,63	807,11 ± 22,99	59,87 ± 1,64	57,08 ± 1,54
7	30	2,0	465,07 ± 15,11	1257,30 ± 26,27	70,97 ± 2,95	82,72 ± 2,38
8	30	2,5	484,16 ± 20,25	1577,45 ± 8,36	79,94 ± 1,56	91,83 ± 1,74
9	45	1,0	403,96 ± 20,06	641,09 ± 14,32	63,98 ± 1,40	46,95 ± 1,03
10	45	1,5	496,33 ± 13,72	895,74 ± 23,66	65,89 ± 1,17	62,49 ± 3,33
11	45	2,0	605,01 ± 5,71	1254,97 ± 16,42	75,90 ± 1,13	97,49 ± 0,90
12	45	2,5	633,82 ± 42,32	393,78 ± 15,85	92,27 ± 1,95	76,37 ± 4,90
13	60	1,0	310,28 ± 16,72	398,91 ± 15,27	41,50 ± 1,90	69,95 ± 1,70
14	60	1,5	347,05 ± 15,71	453,18 ± 21,20	60,94 ± 0,67	74,47 ± 2,65
15	60	2,0	300,25 ± 20,36	490,73 ± 15,59	75,15 ± 1,64	81,39 ± 3,63
16	60	2,5	407,39 ± 17,87	560,93 ± 14,28	87,15 ± 2,44	88,98 ± 3,13

Valores expressos em termos de média ± desvio padrão.

A Tabela 6 indica valores máximos de atividade enzimática e recuperação para a solução de sulfato de amônio no tempo de 15 minutos, obtendo 701,42 U em um volume de 2,0 mL e 94,15% em 2,5 mL. Já no meio composto por sulfato de amônio + tween 80, a atividade máxima foi de 1577,45 U em 2,5 mL de solução extratora aos 30 minutos de reação e a recuperação de 97,49% (2,0 mL) no tempo de 45 minutos. Posteriormente, a significância dos dados foi verificada pelo teste F, a partir da Análise de Variância (ANOVA) (ANEXO), ao nível de 5% de significância. A baixa probabilidade ($p < 0,0001$) encontrada para o valor de F da regressão em todos os planejamentos verificou que os modelos foram significativos. A proposta de modelo matemático empírico para o primeiro planejamento utilizando Sulfato de amônio é observada através da Tabela 7 pelos coeficientes de regressão.

Tabela 7 – Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

Variáveis	Atividade enzimática				Recuperação de proteínas			
	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p
Termo independente	429,6597	51,5766	8,33	<0,0001	105,4583	5,8229	18,11	<0,0001
Tempo (L)	-3,7007	0,7737	-4,78	<0,0001	-2,5291	0,3630	-6,97	<0,0001
Tempo (Q)	-	-	-	>0,05	0,0169	0,0047	3,63	0,0007
Volume (L)	100,4277	23,2113	-4,33	<0,0001	-	-	-	>0,05
Volume (Q)	-	-	-	>0,05	-	-	-	>0,05
Tempo (L) x Volume (L)	-	-	-	>0,05	0,5177	0,0455	11,37	<0,0001

A partir da tabela, observou-se como variáveis significativas o tempo e o volume de solução extratora, na forma linear, para a resposta atividade enzimática. Na recuperação de proteínas, o tempo apresentou efeito quadrático, além do efeito significativo na interação entre as variáveis. As Equações 3 e 4 trazem as equações de regressão onde foi possível construir o gráfico de superfície de resposta (Figura 1).

$$A_e = -3,701t + 100,428v + 429,660 \quad (3)$$

$$\% \text{ rec} = 0,017t^2 + 0,5177tv - 2,529t + 105,458 \quad (4)$$

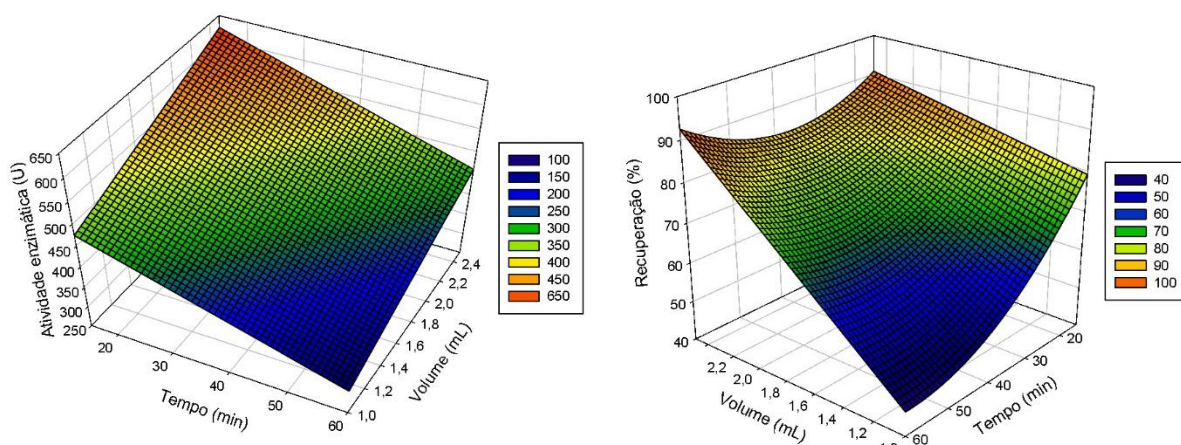


Figura 1: Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio como solução extratora.

De forma semelhante, a análise de regressão para o processo de extração que utilizou sulfato de amônio + tween 80 como solução extratora é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 – Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80.

Variáveis	Atividade enzimática				Recuperação de proteínas			
	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p
Termo independente	-1082,9498	260,1201	-4,16	0,0001	8,276	18,7912	0,44	0,6618
Tempo (L)	86,7707	13,7899	6,29	<0,0001	-1,8037	0,5002	-3,61	0,0008
Tempo (Q)	-1,1291	0,1810	-6,24	<0,0001	0,0241	0,0066	3,68	0,0006
Volume (L)	216,2683	72,8482	2,97	0,0048	88,5636	20,8502	4,25	0,0001
Volume (Q)	-	-	-	>0,05	-18,5516	5,9092	-3,14	0,0031
Tempo (L) x Volume (L)	-	-	-	>0,05	-	-	-	>0,05

O planejamento para essa solução apresentou efeito significativo linear para o volume e quadrático para o tempo, no que se diz respeito à atividade enzimática, enquanto a recuperação de proteínas obteve efeito quadrático para as duas variáveis. O modelo matemático é demonstrado pelas Equações 5 e 6, tornando possível estabelecer a superfície de resposta visualizada na Figura 2.

$$A_e = -1,129t^2 + 86,771t + 216,268v - 1082,950 \quad (5)$$

$$\% \text{ rec} = 0,024t^2 - 18,552v^2 - 1,804t + 88,564v + 8,276 \quad (6)$$

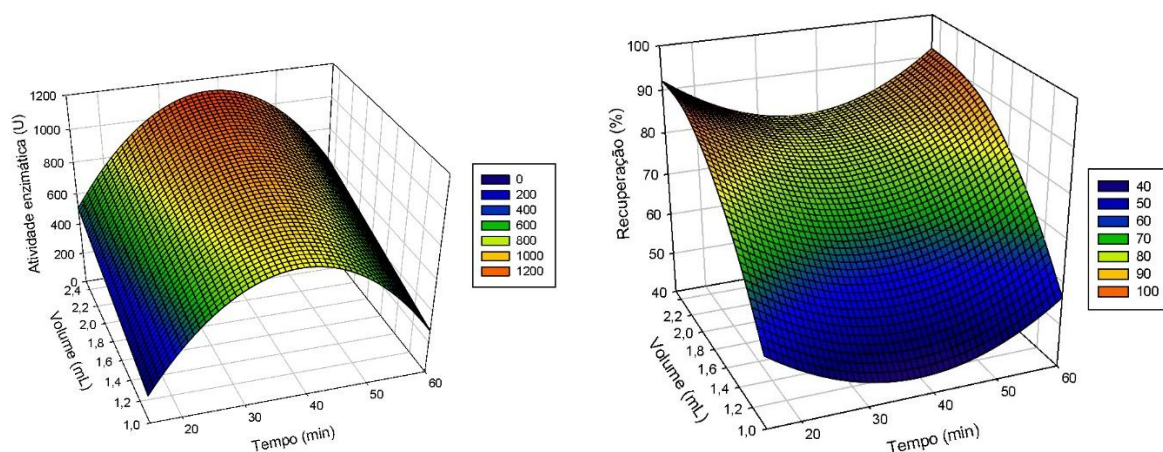


Figura 2: Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio + tween 80 como solução extratora.

As equações para a resposta atividade enzimática apontam um melhor comportamento à medida que o volume aumenta, para ambas as soluções, e que o tempo diminui, para a solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para a recuperação de proteínas, só é possível indicar que há melhor desempenho conforme o volume aumenta. Dessa forma, pode-se confirmar que a variação da concentração dos sais interfere na solubilidade da lipase e de proteínas em geral.

Nessas condições, observa-se que os dados demonstram instabilidade, com uma alta variação, principalmente para a solução sulfato de amônio + tween 80. Sendo assim, optou-se por estabelecer outro planejamento experimental (Tabela 9), com níveis de tempo e volume de solução extratora comuns às duas soluções, a fim de facilitar a comparação dos novos resultados, e mais próximos de seus valores ótimos. Um fator que ajudou a reforçar a necessidade de novos experimentos foi o baixo coeficiente de determinação para os modelos ajustados, sendo $R^2 = 0,579$ e $0,808$ na solução Sulfato de amônio e $R^2 = 0,525$ e $0,731$ na solução sulfato de amônio + tween 80, para atividade enzimática e recuperação de proteínas, respectivamente.

Tabela 9 – Resposta em atividade enzimática e porcentagem de recuperação para o estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio e sulfato de amônio + tween 80 como soluções extratoras.

Experimento	Tempo (min)	Volume (mL)	Atividade enzimática (U)		Recuperação (%)	
			(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ + Tween 80	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ + Tween 80
1	10	2,25	495,66 ± 3,94	222,77 ± 6,56	68,56 ± 0,28	86,44 ± 1,62
2	10	2,5	474,93 ± 10,02	228,57 ± 5,83	87,31 ± 0,78	89,51 ± 2,03
3	10	2,75	501,57 ± 0,01	224,17 ± 4,81	86,90 ± 4,14	76,16 ± 2,23
4	10	3,0	478,95 ± 8,75	185,07 ± 12,24	82,21 ± 1,69	76,06 ± 2,43
5	15	2,25	784,29 ± 9,18	335,60 ± 14,43	66,31 ± 0,01	91,09 ± 1,82
6	15	2,5	802,92 ± 2,92	351,02 ± 11,66	77,28 ± 1,10	98,74 ± 0,01
7	15	2,75	754,93 ± 6,41	358,86 ± 4,81	88,97 ± 2,41	93,75 ± 2,97
8	15	3,0	648,63 ± 10,50	367,00 ± 5,25	58,89 ± 3,20	90,65 ± 2,43
9	20	2,25	836,76 ± 11,81	999,45 ± 14,43	72,65 ± 1,55	92,52 ± 0,81
10	20	2,5	807,29 ± 10,20	1052,19 ± 4,37	89,19 ± 0,78	96,27 ± 2,03
11	20	2,75	697,20 ± 9,62	1059,59 ± 12,83	92,59 ± 1,21	91,77 ± 1,49
12	20	3,0	585,66 ± 7,00	1094,69 ± 22,74	79,95 ± 1,32	85,79 ± 2,97
13	25	2,25	538,95 ± 7,87	1370,73 ± 5,25	76,60 ± 1,83	86,44 ± 1,22
14	25	2,5	560,93 ± 8,75	1501,17 ± 7,29	84,49 ± 2,35	90,63 ± 1,80
15	25	2,75	591,37 ± 6,41	1598,37 ± 16,03	97,07 ± 0,52	80,13 ± 0,74
16	25	3,0	517,43 ± 22,74	1726,18 ± 10,50	90,85 ± 1,32	77,95 ± 1,08

Valores expressos em termos de média ± desvio padrão.

Na Tabela 9, observa-se como maior valor de atividade enzimática 836,76 U em 2,25 mL de solução extratora no tempo de 20 minutos e de recuperação 97,07% (2,75 mL) no tempo de 25 minutos para o meio contendo sulfato de amônio. A solução sulfato de amônio + tween 80 apresentou máxima atividade com 1726,18 U (3,0 mL) em 25 minutos e 98,74% de

recuperação (2,5 mL) em 15 minutos de extração. O tratamento dos dados obtidos resultou na estimativa dos coeficientes de regressão para os parâmetros estudados (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 – Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

Variáveis	Atividade enzimática				Recuperação de proteínas			
	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p
Termo independente	-2356,0587	940,6377	-2,50	0,0186	-658,9289	122,6213	-5,37	<0,0001
Tempo (L)	157,3582	12,0686	13,04	<0,0001	-3,6394	1,5733	-2,31	0,0286
Tempo (Q)	-4,3946	0,3420	-12,85	<0,0001	0,1204	0,0446	2,7	0,0118
Volume (L)	1462,6604	718,9267	2,03	0,0518	576,8542	93,7191	6,16	<0,0001
Volume (Q)	-304,8105	136,8144	-2,23	0,0344	-107,7705	17,8351	-6,04	<0,0001
Tempo (L) x Volume (L)	-	-	-	>0,05	-	-	-	>0,05

Tabela 11 – Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80.

Variáveis	Atividade enzimática				Recuperação de proteínas			
	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p
Termo independente	1240,4401	561,2849	2,21	0,0358	-141,7978	75,3688	-1,88	0,0707
Tempo (L)	-116,5942	37,3997	-3,12	0,0043	6,8270	0,967	7,06	<0,0001
Tempo (Q)	3,5966	0,6818	5,28	<0,0001	-0,1932	0,0274	-7,05	<0,0001
Volume (L)	-420,6693	200,4073	-2,10	0,0453	146,4739	57,6042	2,54	0,0170
Volume (Q)	-	-	-	>0,05	-30,0230	10,9623	-2,74	0,0108
Tempo (L) x Volume (L)	32,2739	10,9088	2,96	0,0064	-	-	-	>0,05

Foi verificada significância para o efeito quadrático do tempo e linear do volume para a variável resposta atividade enzimática. Para a variável resposta recuperação de proteínas, verificou-se significância para o efeito quadrático de ambas as variáveis independentes estudadas. As equações de regressão são demonstradas pelas Equações 7 e 8, onde a superfície de resposta obtida é representada pela Figura 3.

$$A_e = -4,395t^2 - 304,811v^2 + 157,358t + 1462,660v - 2356,059 \quad (7)$$

$$\% \text{ rec} = 0,12t^2 - 107,77v^2 - 3,639t + 576,854v - 658,929 \quad (8)$$

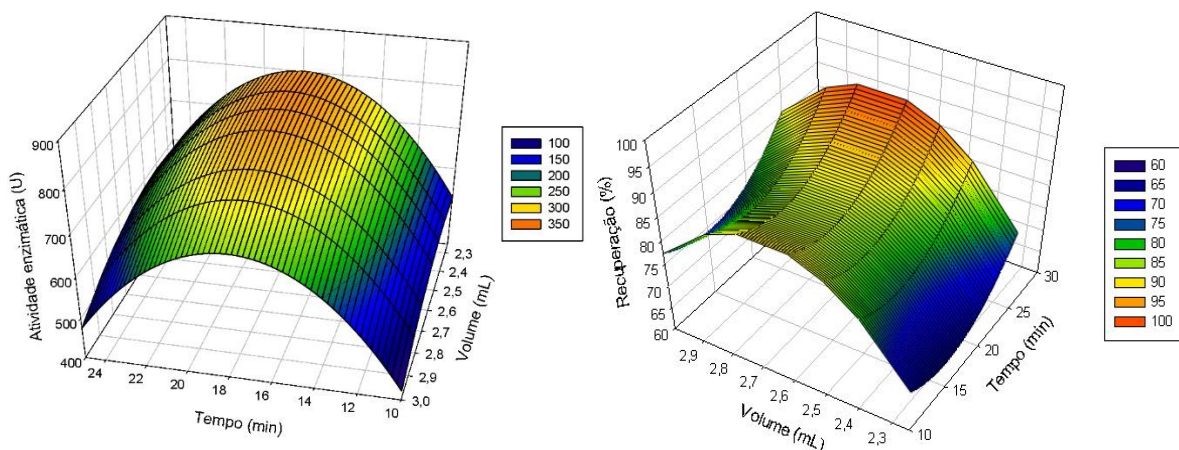


Figura 3: Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio como solução extratora.

Os resultados analisados estatisticamente para a solução sulfato de amônio + tween 80 expressaram efeito quadrático significativo para o tempo e linear para o volume em relação à variável resposta atividade enzimática, sendo que a recuperação de proteínas obteve efeito quadrático para os dois parâmetros. A Figura 4 retrata a superfície de resposta plotada a partir das Equações 9 e 10.

$$A_e = +3,597t^2 + 32,274tv - 116,594t - 420,669v + 1240,440 \quad (9)$$

$$\% \text{ rec} = -0,193t^2 - 30,023v^2 + 6,827t + 146,474v - 141,798 \quad (10)$$

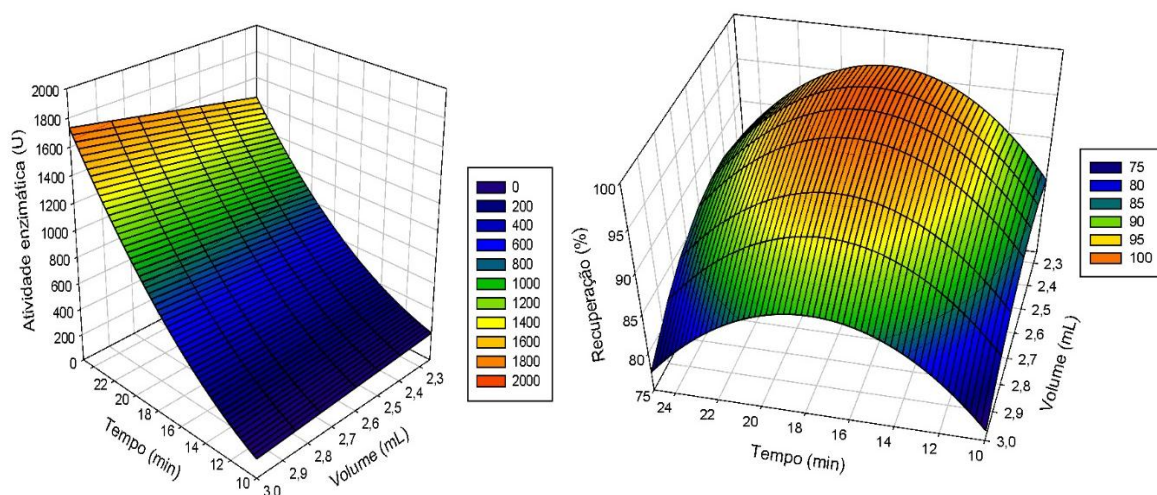


Figura 4: Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio + tween 80 como solução extratora.

O gráfico de superfície de resposta indica uma tendência de maior atividade enzimática quando o volume diminui e de maior recuperação quando o tempo aumenta para a

solução sulfato de amônio. Para sulfato de amônio + tween 80, há aumento na atividade à medida que o intervalo de tempo é maior e na recuperação de proteínas à medida que o volume é reduzido. Em outras palavras, para que a otimização do processo de extração seja atingida de forma efetiva para ambas as variáveis resposta, deseja-se atuar com menor volume e maior tempo possíveis dentro das condições do experimento.

O coeficiente de determinação de $R^2 = 0,973$ e $0,802$ (atividade enzimática e recuperação de proteínas) e o gráfico de correlação (Figura 5) entre os valores observados e preditos pelo modelo empírico para a solução sulfato de amônio + tween 80 validaram os dados do planejamento, demonstrando uma boa correlação entre os valores teóricos e os obtidos na prática, além de permitir concluir que as condições desse experimento foram potencializadas de forma satisfatória, finalizando-o com os resultados encontrados.

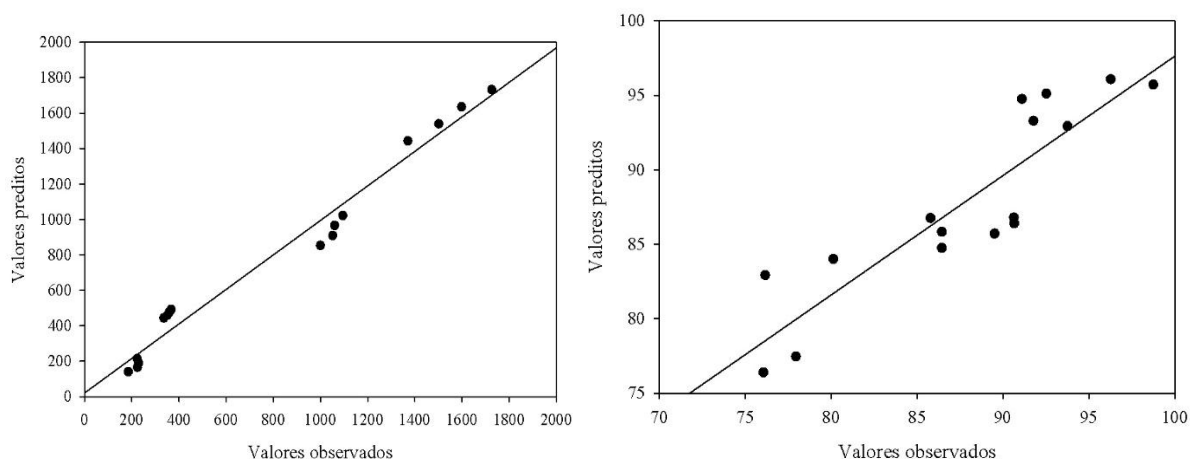


Figura 5: Gráfico da correlação entre os valores preditos e os valores observados da atividade enzimática e recuperação de proteínas, respectivamente, no processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80.

De acordo com o planejamento experimental, os valores ótimos de tempo e volume para se obter máxima atividade enzimática devem ser fixados em:

$$t = 25 \text{ minutos} \quad v = 3,0 \text{ mL}$$

No entanto, os coeficientes de determinação de $0,884$ e $0,711$ para atividade e recuperação na solução sulfato de amônio demonstraram que ainda seria necessário um novo planejamento experimental, com novos valores para o tempo, mas mantendo-se o volume de solução extratora do planejamento anterior. Os resultados são apresentados na Tabela 12:

Tabela 12 – Resposta em atividade enzimática e porcentagem de recuperação para o estudo da extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio como solução extratora.

Experimento	Tempo (min)	Volume (mL)	Atividade enzimática (U)	Recuperação (%)
1	12,5	2,25	427,43 ± 9,18	39,09 ± 0,99
2	12,5	2,5	420,99 ± 2,92	39,83 ± 0,31
3	12,5	2,75	406,97 ± 8,02	38,82 ± 0,52
4	12,5	3,0	372,24 ± 13,99	31,44 ± 0,56
5	15	2,25	500,90 ± 6,56	64,62 ± 0,85
6	15	2,5	498,25 ± 10,20	65,06 ± 1,72
7	15	2,75	506,39 ± 8,02	67,77 ± 0,86
8	15	3,0	428,22 ± 7,00	61,15 ± 0,94
9	17,5	2,25	697,70 ± 9,15	67,01 ± 0,71
10	17,5	2,5	679,01 ± 10,20	72,11 ± 2,19
11	17,5	2,75	596,18 ± 8,04	72,77 ± 0,34
12	17,5	3,0	585,66 ± 7,20	61,33 ± 0,38
13	20	2,25	800,03 ± 6,66	67,86 ± 0,99
14	20	2,5	788,34 ± 5,83	70,69 ± 0,78
15	20	2,75	697,20 ± 9,62	72,42 ± 1,38
16	20	3,0	632,89 ± 15,74	60,02 ± 2,07

Valores expressos em termos de média ± desvio padrão.

A Tabela 19 apresentou maior atividade enzimática no volume de 2,25 mL, sendo $A_e = 800,03$ U, enquanto a maior porcentagem de recuperação foi 72,42% no volume de 2,75 mL. Para ambas as variáveis, o tempo de extração foi de 20 minutos. A Tabela 13 demonstra a estimativa dos coeficientes de regressão das variáveis trabalhadas.

Tabela 13 – Coeficientes de regressão para as variáveis resposta do processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

Variáveis	Atividade enzimática				Recuperação de proteínas			
	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Valor p
Termo independente	-786,3592	269,0943	-2,92	0,0068	-589,9348	66,7991	-8,83	<0,0001
Tempo (L)	105,7863	16,3200	6,48	<0,0001	40,0841	2,9763	13,47	<0,0001
Tempo (Q)	-	-	-	>0,05	-1,1164	0,0914	-12,22	<0,0001
Volume (L)	236,3654	101,9359	2,32	0,0279	239,5610	48,0088	4,99	<0,0001
Volume (Q)	-	-	-	>0,05	-46,961	9,1363	-5,14	<0,0001
Tempo (L) x Volume (L)	-23,1672	6,1822	-3,75	0,0008	-	-	-	>0,05

A partir da análise estatística dos dados, verificou-se efeito significativo para tempo e volume, bem como sua interação, no que se diz respeito à atividade enzimática. Em contrapartida, a recuperação de proteínas apontou efeito quadrático para ambas as variáveis. O modelo matemático proposto pode ser observado pelas Equações 11 e 12, onde a superfície de resposta pôde ser construída e mostrada na Figura 6. Além disso, a correlação entre os resultados preditos e observados será visualizada na Figura 7.

$$A_e = -23,167tv + 105,786t + 236,365v - 786,359 \quad (11)$$

$$\% \text{ rec} = -1,116t^2 - 46,961v^2 + 40,08t + 239,561v - 589,93 \quad (12)$$

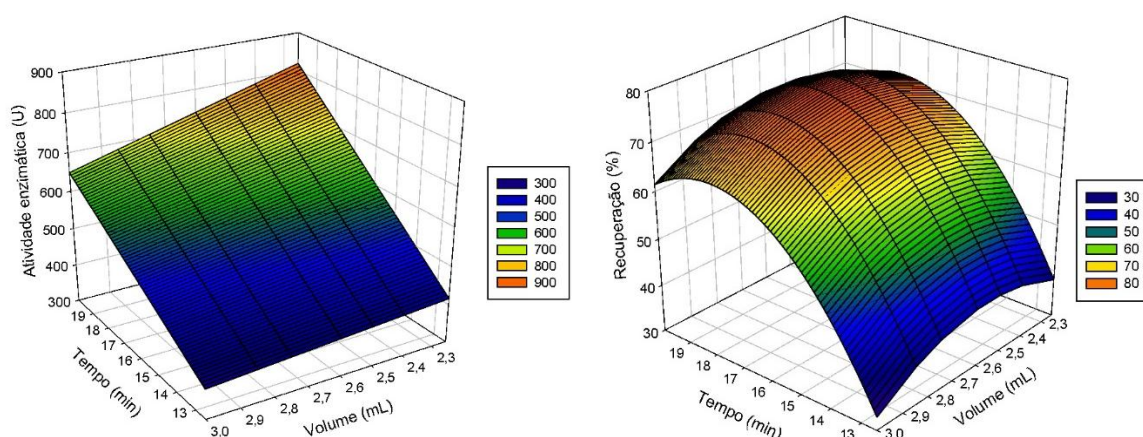


Figura 6: Superfície de resposta para atividade enzimática e recuperação de proteínas em função do tempo e do volume utilizando sulfato de amônio como solução extratora.

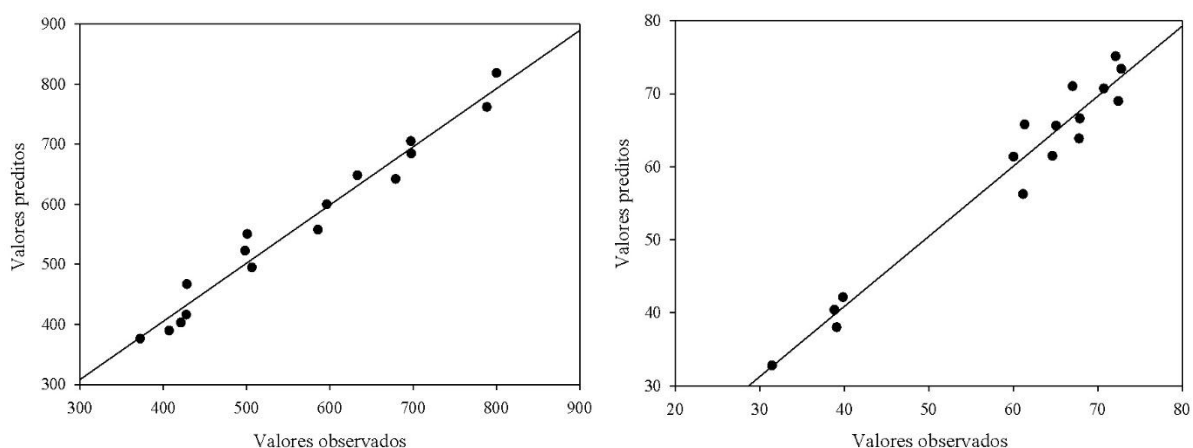


Figura 7: Gráfico da correlação entre os valores previstos e os valores observados da atividade enzimática e recuperação de proteínas, respectivamente, no processo de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

O comportamento observado para a atividade enzimática demonstra que os fatores envolvidos no processo de extração são diretamente dependentes um do outro, onde a atividade é potencializada à medida que o volume diminui e o tempo aumenta. O gráfico de superfície de resposta para recuperação de proteínas indicou uma tendência de melhor condição de extração conforme o tempo aumenta, sem efeito aparente da variação do volume. Dessa forma, para garantir maior desempenho de ambas as variáveis simultaneamente, é necessário utilizar o menor volume e maior tempo possíveis dentro do intervalo estabelecido nesse planejamento.

Os coeficientes de determinação de $R^2 = 0,969$ para atividade enzimática e $R^2 = 0,958$ para recuperação de proteínas e o gráfico de correlação foram capazes de validar estatisticamente os modelos propostos, indicando boa proximidade entre os valores obtidos experimentalmente e os previstos pela regressão, o que propôs que os parâmetros envolvendo o processo de extração foram otimizados de maneira convincente.

De acordo com o planejamento experimental, os valores ótimos de tempo e volume para se obter máxima atividade enzimática devem ser fixados em:

$$t = 20 \text{ minutos} \quad v = 2,25 \text{ mL}$$

Apesar da obtenção, em alguns pontos, de maiores valores de atividade enzimática e recuperação de proteínas para a solução sulfato de amônio + tween 80, a alta variação de seus dados (R^2 inferior), tanto nas repetições quanto nos tratamentos, sugeriu a escolha pela solução extratora composta apenas por sulfato de amônio. Isso também pôde ser observado nos testes finais de validação dos resultados utilizando as condições ótimas definidas para

cada solução (Tabela 14), onde a variável resposta atividade enzimática foi superior para o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com a recuperação de proteínas apresentando um alto percentual.

Tabela 14 – Testes finais de extração de lipase da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio e sulfato de amônio + tween 80 como soluções extratoras em suas condições ótimas.

Solução extratora	Atividade enzimática (U)	Recuperação de proteínas (%)
Sulfato de amônio	729,761 ± 14,77	84,770 ± 4,26
Sulfato de amônio + Tween 80	255,429 ± 38,54	93,351 ± 1,43

Valores expressos em termos de média ± desvio padrão.

Além disso, como citado anteriormente, a presença de aditivos encarece o processo e dificulta uma posterior ampliação de escala (LEHNINGER, 2006; BRESCIANI, 2011). Por fim, outro fator que reforça a exclusão do tween 80 ao processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi é a sua aplicação no processo de purificação baseado em sistemas aquosos bifásicos, implicando em um meio que ainda não foi documentado na literatura e que possui comportamento desconhecido, onde seria necessário definir os dados de equilíbrio para os sistemas propostos – o que não é o foco principal desse trabalho.

A atividade enzimática encontrada no presente trabalho está de acordo com outros estudos que utilizaram vegetais como fonte de extração de lipase. Almeida et al. (2014), por exemplo, alcançou uma atividade de hidrólise máxima de 6,55 U através da otimização do processo de extração a partir da farinha de trigo (*Triticum spp.*). Quando a matéria-prima possui constituição rica em lipídeos, existe uma tendência de que a atividade lipolítica seja mais alta, como ocorre em Mehdi et al. (2018), que assumiu 4705,5 U para a semente de girassol (*Heliantus annuus* L.), em Santos et al. (2013), que atingiu 487,8 U em suas melhores condições para a semente de mamona (*Ricinus communis* L.), e em Suwanno et al. (2017), que obteve 322,68 U para o dendê (*Elaeis guineensis*).

O fator recuperação de proteínas não é muito abordado na literatura para métodos de extração. No entanto, os valores encontrados são considerados satisfatórios por indicarem alta remoção de proteínas de uma matriz sólida, processo que é muitas vezes dificultado devido à estrutura complexa da fonte de estudo.

4. CONCLUSÕES

A composição química centesimal encontrada no presente trabalho divergiu, em alguns componentes, dos resultados visualizados na literatura. Os testes iniciais de extração de lipase da amêndoa do pequi com diferentes soluções extratoras permitiram selecionar as soluções $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + tween 80 por apresentarem diferença significativa nos valores de atividade enzimática total (U) e atividade enzimática específica (U/mg)/recuperação de proteínas (%), respectivamente. O planejamento experimental definido para a otimização das condições de extração mostrou-se eficiente no estudo dos parâmetros tempo e volume de solução extratora, possibilitando verificar sua influência nas variáveis resposta atividade enzimática (U) e recuperação de proteínas (%) para ambas as soluções extratoras, onde a solução composta apenas por Sulfato de amônio apresentou resultados com menor variabilidade estatística (R^2 superior), e por isso foi selecionada como meio para extração da lipase.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. L.; PAREYT, B.; GERITS, L. R.; DELCOUR, J. A. Effect of wheat grain steaming and washing on lipase activity in Whole Grain Flour. **Cereal Chemistry Journal**, v. 91, n. 4, p. 321-326, 2014.

AMORIM, D. J.; REZENDE, H. C.; OLIVEIRA, E. L.; ALMEIDA, I. L. S.; COELHO, N. N. M.; MATOS, T. N.; ARAÚJO, C. S. T. Characterization of Pequi (*Caryocar brasiliense*) shells and evaluation of their potential for the adsorption of Pb (II) ions in aqueous systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 616-623, 2016.

ANTUNES, R. S.; LOPES, F. M.; BRITO, A. O.; GARCIA, L. F.; SOUSA, D. F.; GIL, E. S. Enzimas vegetais: extração e aplicação biotecnológica. **Infarma – Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 3, p. 181-198, 2017.

ANVARI, M. Extraction of lipase from *Rhizopus microsporus* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 4, p. 723-731, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 18 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2007.

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.

BRESCIANI, F. R. **Otimização da produção de lipase por *Luteibacter* sp. e caracterização do potencial biotecnológico.** Dissertação (Mestrado) – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

BUBALO, M. C.; JURINJAK, A. T.; VINKOVIL, M.; RADOSEVIL, K.; SRLEK, V. G.; REDOVNIKOVIL, I. R. Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v.122, p.188-198, 2015.

CARDOSO, C. M. M.; ZAVARIZE, D. G.; VIEIRA, G. E. G. Transesterification of Pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) bio-oil via heterogeneous acid catalysis: Catalyst preparation, process optimization and kinetics. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 1-7, 2019.

CARTA, G.; JUNGBAUER, A. **Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up.** Weinheim: Wiley-VCH, 2010. 364p.

CASTIGLIONI, G. L.; COSTA, J. A. V.; ALEGRE, R. M. Estudo da produção de lipase por *Burkholderia cepacia*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 4, p. 637-644, 2018.

CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, T. S.; NETO, B. B.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; PESSOA Jr., A. Aqueous two-phase systems extraction of a-toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of chromatography B**, v.833, p.135-140, 2006.

CELESTINO, S. M. C. **Princípios de secagem de alimentos.** 1. ed. Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2010. 51 p.

COLÍN-LUNA, J. A.; ZAMORA-RODEA, E. G.; GONZÁLEZ-BRAMBILA, M. M.; BARRERA-CALVA, E.; ROSAS-CEDILLO, R.; MEDINA-MENDOZA, A. K.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. C. Biodiesel production using immobilized lipase supported on a zirconium-pillared clay. Effect of the immobilization method. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, p.1-10, 2018.

DAMIANI, C.; ALMEIDA, T. L.; COSTA, N. V.; MEDEIROS, N. X.; MOURA E SILVA, G. A.; SILVA, F. A.; LAGE, M. E.; BECKER, F. S. Perfil de ácidos graxos e fatores antinutricionais de amêndoas de pequi crua e torrada. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 71-78, 2013.

DEIVE, F. J.; RODRÍGUEZ, A.; REBELO, L. P. N.; MARRUCHO, I. M. Extraction of *Candida antarctica* lipase A from aqueous solutions using imidazolium-based ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, v. 97, p. 205-210, 2012.

DOBREV, G.; ZHEKOVA, B.; DOBREVA, V.; STRINSKA, H.; DOYKINA, P.; KRASTANOV, A. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. **Biocatalysis and**

Agricultural Biotechnology, v. 4, n. 1, p. 77-82, 2015.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

GARRIDO, J. V. M. L.; SILVA, C. F. Prospecção tecnológica e científica da utilização de lipases microbianas para tratamento de efluentes. **Cadernos de prospecção**, v. 9, n. 3, p. 298-306, 2016.

GHOSH, R. **Principles of bioseparations engineering**. Singapore: World Scientific Publishing, 2006. 282p.

HERTADI, R.; WIDHYASTUTI, H. Effect of Ca²⁺ ion to the activity and stability of lipase isolated from *Chromohalobacter japonicus* BK-AB18. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 306-313, 2015.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process biochemistry**, New Delhi, v. 47, p. 555-569, 2012.

LEÃO, D. P.; BOTELHO, B. G.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S. Potential of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peels as sources of highly esterified pectins obtained by microwave assisted extraction. **Food Science and Technology**, v. 87, p. 575-580, 2018.

MAHMOOD, I.; AHMAD, I.; CHEN, G.; HUIZHOU, L. A surfactant-coated lipase immobilized in magnetic nanoparticles for multicycle ethyl isovalerate enzymatic production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 73, p. 72-79, 2013.

MEHDI, W. A.; MEHDE, A. A.; ÖZACAR, M., ÖZACAR, Z. Characterization and immobilization of protease and lipase on chitin-starch material as a novel matrix. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 947-958, 2018.

NAJAFPOUR, G. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 2 ed. Amsterdã: Elsevier Science, 2015. 668p.

NARWAL, S.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 4, p. 479-490, 2013.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

OLIVEIRA, M. E. B.; GUERRA, N. B.; BARROS, L. M.; ALVES, R. E. **Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi**. Fortaleza: Embrapa agroindústria tropical, 2008. 33p.

PARIMI, N. S.; SINGH, M.; KASTNER, J. R.; DAS, K. C.; FORSBERG, L. S.; AZADI, P. Optimization of protein extraction from *Spirulina platensis* to generate a potential co-product and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content. **Frontiers in Energy Research**, v. 3, n. 68, 2017.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p.135-140, 2003.

PETERS, G. H. The dynamic response of a fungal lipase in the presence of charged surfactants. **Colloids and Surfactants B: Biointerfaces**, v. 26, n. 1-2, p. 84-101, 2002.

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcóolise. **Química Nova**, Erechim, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

RIPÓLLES, S.; CAMPAGNOL, P. C. B.; ARMENTEROS, M.; ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F. Influence of partial replacement of NaCl with KCl, CaCl₂ and MgCl₂ on lipolysis and lipid oxidation in dry-cured ham. **Meat Science**, v. 89, n. 1, p. 58-64, 2011.

SAHAY, S.; CHOUHAN, D. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, p.1-6, 2018.

SANTOS, K. C.; CASSIMIRO, D. M. J.; AVELAR, M. H. M.; HIRATA, D. B.; DE CASTRO, H. F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462-470, 2013.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, p.143-149, 2016.

SUWANNO, S.; RAKKAN, T.; YUNU, T.; PAICHID, N.; KIMTUN, P.; PRASERTSAN, P.; SANGKHARAK, K. The production of biodiesel using residual oil from palm oil mill effluent and crude lipase from oil palm fruit as an alternative substrate and catalyst. **Fuel**, v. 195, p. 82-87, 2017.

TALENS-PERALES, D.; MARÍN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Enzymes: Functions and Characteristics. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 532-538, 2016.

TSAI, S.W. Enantiopreference of *Candida antarctica* lipase B toward carboxylic acids: Substrate models and enantioselectivity thereof. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 98-116, 2014.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 3, p. 663-670, 1979.

ARTIGO 2

Partição de lipase da amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG/Isopropanol + Sulfato de amônio + água.

RESUMO

Nesse trabalho, estudou-se o processo de extração líquido-líquido com sistemas de duas fases aquosas para a partição da lipase da amêndoa do pequi. O experimento foi conduzido de maneira inteiramente casualizada (DIC) com planejamento fatorial 2x4 para as variáveis independentes temperatura (25°C e 35°C) e tipo de sistema – PEG 4000-Sulfato de amônio e isopropanol-sulfato de amônio com amostras de extrato bruto enzimático e precipitado obtido a partir da precipitação com sulfato de amônio. A partição da lipase foi avaliada pelos parâmetros coeficiente de partição de proteínas e de atividade enzimática, recuperação teórica, seletividade, fator de purificação e variação da energia livre de Gibbs de transferência. As variáveis resposta K_e , K_p e %Y tiveram efeito significativo do tipo de sistema em ambas as temperaturas, enquanto a variação de temperatura teve influência apenas no sistema isopropanol-(NH₄)₂SO₄ para a partição de proteínas e no sistema PEG-(NH₄)₂SO₄ para a partição de atividade enzimática e rendimento. Sendo assim, verificou-se que a enzima migrou preferencialmente para a fase rica em sal (inferior) e que o SAB composto por isopropanol e sulfato de amônio a 25°C com amostras do extrato bruto é o melhor protocolo inicial de purificação da lipase da amêndoa do pequi devido aos melhores resultados de partição encontrados dentro das condições estudadas ($K_e = 0,053$, $K_p = 2,333$, %Y = 86,391, S = 0,023, FP = 4,479, $\Delta G = -7,264$).

Palavras-chave: Dados de equilíbrio; extração líquido-líquido; parâmetros de partição.

ABSTRACT

In this work, we studied the liquid-liquid extraction process with aqueous two-phase systems for partition of lipase of pequi seed. The experiment was conducted in a completely randomized manner with a 2x4 factorial design for the independent variables temperature (25°C and 35°C) and type of system – PEG 4000-ammonium sulfate and isopropanol-ammonium sulfate with samples of crude enzyme extract and precipitate obtained from precipitation with ammonium sulfate. The lipase partition was evaluated by partition coefficient of protein, partition coefficient of enzymatic activity, enzyme activity recovery, selectivity, purification factor and variation of Gibbs free energy transfer parameters. The response variables K_e , K_p and %Y had a significant effect on the type of system at both temperatures, while the temperature change had an influence only on the isopropanol-(NH₄)₂SO₄ system for the protein partition and on the PEG-(NH₄)₂SO₄ system for the partition of enzymatic activity and yield. Thus, it was concluded that the enzyme had preference for the salt-rich phase (lower). In addition, it is believed that the SAB composed of isopropanol and ammonium sulfate at 25°C with samples of crude extract is the best initial protocol for purification of lipase of pequi seed due to the best partition results found within the study conditions ($K_e = 0,053$, $K_p = 2,333$, %Y = 86,391, S = 0,023, FP = 4,479, $\Delta G = -7,264$).

Keywords: Equilibrium data; liquid-liquid extraction; partition parameters.

1. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol hidrolases (E.C. 3.1.1.3)), catalisadores biológicos pertencentes à família das hidrolases, constituem um importante grupo destinado a aplicações biotecnológicas, sendo encontradas em plantas, animais e microrganismos. Possuem como principal função biológica a catálise de reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, onde sua atuação ocorre na interface óleo-água, o que lhes confere potencial tanto em meio aquoso como em meio orgânico (BORRELI e TRONO, 2015; CASAS-GODOY et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). Diante de sua versatilidade e especificidade, as lipases encontram-se entre as três enzimas mais vendidas no mundo, com aplicação em diversos segmentos, como: detergentes, alimentos, fármacos, produção de biodiesel e tratamento de efluentes (CASTIGLIONI et al., 2018). Por esse motivo, o interesse em purificá-las vem apresentando grande potencial.

Atualmente, as técnicas mais empregadas na purificação de proteínas são a precipitação (BOLLINELI et al., 2015), separação por membranas (ABREU e FIGUEIREDO, 2017), filtração (ANDRIOLI et al., 2019), eletroforese (FEKETE et al., 2016), extração com micelas reversas (SENSKE et al., 2016) e cromatografias de troca iônica (MUNEERUDDIN et al., 2015) e de afinidade (NIAN et al., 2016). Entretanto, a aplicação de processos *downstream* para enzimas enfrenta algumas dificuldades em promover sua recuperação de modo que a atividade biológica seja preservada, o que exige um elevado número de etapas de purificação, alto consumo de energia e de produtos químicos. Uma alternativa viável capaz de amenizar tais limitações é a utilização de sistemas aquosos bifásicos (PASSOS et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

O sistema aquoso bifásico (SAB) é um método de particionamento resultante da incompatibilidade entre dois compostos hidrofílicos a partir de certa concentração crítica, originando duas fases imiscíveis em que o maior constituinte é a água. Apesar de existir uma grande variedade de componentes para os SABs, os mais aplicados na purificação de bioprodutos são os formados por dois polímeros ou um polímero e um sal (JIANG et al., 2015; PADILHA et al., 2016).

A separação com sistemas de duas fases aquosas oferece diversas vantagens, incluindo: elevado rendimento, seletividade e reprodutibilidade favoráveis, facilidade na ampliação de escala e adaptabilidade para o uso em processos contínuos. Em geral, os SABs costumam ser muito aplicados em etapas iniciais de particionamento de enzimas. No entanto, em alguns casos podem até mesmo substituir os sistemas cromatográficos por ser uma técnica

que proporciona protocolos rápidos, eficientes e econômicos (SELVAKUMAR et al., 2010; TAN et al., 2017; PADILHA e OSÓRIO, 2019).

Embora as enzimas lipolíticas sejam amplamente estudadas, o processo de purificação da lipase a partir da amêndoa do pequi ainda não foi documentado na literatura. Diante do exposto, objetivou-se nesse trabalho avaliar a partição da lipase presente na amêndoa do pequi em sistemas aquosos bifásicos constituídos por PEG 4000/Isopropanol, Sulfato de amônio e água nas temperaturas de 25°C e 35°C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O trabalho experimental foi conduzido no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus Juvino Oliveira - Itapetinga.

2.2 Material

Os reagentes utilizados foram: sal inorgânico sulfato de amônio (CAS No. 7783-20-2) – adquirido da Synth (São Paulo, Brasil); polímero polietilenoglicol 4000 g.mol⁻¹ (CAS No. 25322-68-3) – obtido da Êxodo Científica (São Paulo, Brasil); álcool isopropílico (CAS No. 67-63-0) – obtido da Ecibra (São Paulo, Brasil). Todos os reagentes apresentam grau analítico e foram empregados sem purificação adicional.

2.3 Métodos

O extrato enzimático contendo a lipase foi previamente obtido a partir da extração em recipiente de vidro colocado em banho ultrassônico utilizando a solução Sulfato de amônio 0,1 M nas condições de tempo de 20 minutos e volume de 2,25 mL para 0,5 g de amostra desengordurada.

2.3.1 Precipitação com sulfato de amônio

Parte do extrato enzimático foi submetida à adição de sulfato de amônio até a saturação (60% da massa total do extrato). Então, a amostra foi centrifugada em centrífuga refrigerada (SP LABOR, modelo Sp-701, Presidente Prudente, Brasil) a 3500g por 20 minutos na temperatura de 4°C.

Sobrenadante e precipitado foram armazenados separadamente, onde o precipitado foi solubilizado com a quantidade mínima necessária de Sulfato de amônio 0,1M para se tornar

homogêneo (\cong 12 mL). Para isso, a cada 1 mL de solução salina adicionada, o meio era centrifugado a 3500g por 1 minuto a 25°C.

2.3.2 Purificação utilizando sistemas aquosos bifásicos

1. Planejamento experimental

Os ensaios de purificação utilizando sistemas aquosos bifásicos foram definidos de acordo com a análise prévia de sistemas compostos por sulfato de amônio. Nessa etapa, objetivou-se avaliar a influência da temperatura em diferentes tipos de sistemas compostos por amostras do extrato bruto enzimático e do precipitado resultante da etapa de pré-purificação a partir da precipitação com sulfato de amônio. A Tabela 1 descreve um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com planejamento fatorial 2x4, apresentando três repetições em todos os pontos. Os resultados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) com teste F e teste de Tukey para comparação entre médias, ao nível de 5% de significância a partir do software *SAS Studio*.

Tabela 1 – Variáveis e níveis do planejamento experimental utilizado na purificação de lipase a partir de sistemas aquosos bifásicos.

Tipo de sistema	Temperatura (°C)			
	25		35	
Isopropanol-Sulfato de amônio	Extrato bruto	Precipitado	Extrato bruto	Precipitado
PEG 4000-Sulfato de amônio	Extrato bruto	Precipitado	Extrato bruto	Precipitado

Sistemas aquosos bifásicos compostos por sulfato de amônio apresentam grande versatilidade e aplicabilidade no particionamento de moléculas biológicas, tornando-se um dos principais objetos de estudo na área, onde os dados de equilíbrio são facilmente encontrados para diversas condições. Dessa forma, optou-se por utilizar a mesma composição global para todos os sistemas propostos, tendo como validação os trabalhos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados de equilíbrio para diferentes condições de sistemas aquosos bifásicos encontrados na literatura.

Temperatura (°C)	Sistema	Referência
25	Isopropanol-Sulfato de amônio	Sanglard et al., 2018.
	PEG 4000-Sulfato de amônio	Coelho et al., 2013.
35	PEG 4000-Sulfato de amônio	González-Amado et al., 2016.

O sistema formado por isopropanol-sulfato de amônio a 35°C não foi encontrado na literatura, e por isso, foi necessário determinar a curva binodal e a linha de amarração do ponto global selecionado, como será mostrado a seguir.

2. Determinação da curva binodal

Inicialmente, preparou-se uma solução de sulfato de amônio concentrada em 46,5%, sendo que o reagente isopropanol utilizado apresentou grau de pureza de 99,5%. Tais componentes foram mantidos em banho termostático (Tecnal, Te- 184, Piracicaba, Brasil) com precisão de $\pm 0,1$ °C para que permanecessem na temperatura de 35 °C.

O método para estabelecer a curva binodal, segundo Albertsson (1971), baseia-se na turbidez do meio, onde é observada diretamente a formação de uma segunda fase. O procedimento consistiu em pesar 1,0 g da solução estoque de sulfato de amônio (46,5% m/m) em tubo de ensaio, utilizando-se uma balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil). O tubo contendo a solução de sulfato de amônio foi levado ao banho termostático (Tecnal, Te- 184, Piracicaba, Brasil) com precisão de $\pm 0,1$ °C, sendo incubado até atingir o equilíbrio térmico, na temperatura experimental desejada. Foram adicionadas alíquotas de isopropanol com pipeta automática até a turvação do sistema (solução bifásica), onde o volume de álcool foi registrado. Titulou-se o sistema com água destilada até que o meio se tornasse límpido novamente, 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 da curva binodal:

$$W_{iso} = \exp(a+b(W_{sal})^{0,5} + cW_{sal} + d(W_{sal})^2) \quad (1)$$

Em que W_{iso} e W_{sal} são as frações mássicas do isopropanol e do sal sulfato de amônio, respectivamente, e a , b , c e d são parâmetros de ajuste da equação obtidos com o auxílio do software SIGMAPLOT®. A massa de água do SAB foi obtida pela diferença do percentual de álcool e sal.

3. Determinação da linha de amarração

A linha de amarração foi obtida utilizando o método gravimétrico descrito por Merchuk et al. (1998), que consiste em selecionar um ponto acima da região bifásica (Tabela 3), através do qual a linha de amarração vai passar. O ponto que deu origem ao diagrama de

fases desenvolvido foi selecionado de modo que não tocasse na curva binodal do sistema nem excedesse o limite dessa curva, permitindo a formação de fases bem definidas a partir da mesma concentração para o isopropanol e o sulfato de amônio no ponto global.

Tabela 3 – Composição global para os sistemas formados por PEG 4000/isopropanol e sulfato de amônio, nas temperaturas de 25°C e 35 °C, expressa em porcentagem mássica (% m/m).

Ponto Global	Isopropanol/PEG (%)	Sulfato de amônio (%)	Água (%)
1	20	17,5	62,5

As composições conhecidas dos solutos foram adicionadas em tubos de centrífuga graduados de fundo cônico, a partir da massa das soluções estoques do sulfato de amônio, isopropanol e água para uma massa total do sistema de 50 g. A mistura foi agitada vigorosamente e então centrifugada (SP LABOR, modelo Sp-701, Presidente Prudente, Brasil) a 2000g por 10 minutos para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso durante 12 horas em estufa B.O.D a 35° C, a fim de 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.

Com a obtenção do equilíbrio, a fase superior foi coletada com o auxílio de uma seringa de agulhas longas 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, uma seringa foi introduzida cuidadosamente na célula de equilíbrio para a retirada da fase inferior, evitando que a interface fosse perturbada. Após a separação, determinou-se o volume e a densidade das fases a fim de obter os valores em termos de massa. Para isso, utilizou-se um Densímetro Digital de Bancada DMA 5000M (ANTON-PAAR, Graz, Áustria) com precisão de $5 \times 10^{-6} \text{ g.cm}^{-3}$ e $\pm 0,01^\circ\text{C}$ e repetibilidade de $1 \times 10^{-6} \text{ g.cm}^{-3}$ e $\pm 0,01^\circ\text{C}$ na faixa de operação de 0 a 3 g.cm^{-3} .

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 2-5) e quatro incógnitas (W_{ISO}^s , W_{ISO}^i , W_{SAL}^s , W_{SAL}^i) foi resolvido (MERCHUK et al., 1998) com o auxílio do comando solver do software Microsoft Excel (versão 14.0):

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

$$W_{iso^i} = \exp(a + b(W_{sal^i})^{0,5} + cW_{sal^i} + d(W_{sal^i})^2) \quad (3)$$

$$\frac{W_{iso^s} - W_{iso^m}}{W_{iso^m} - W_{iso^i}} = \frac{m_i}{m_s} \quad (4)$$

$$\frac{W_{sal^m} - W_{sal^s}}{W_{sal^i} - W_{sal^m}} = \frac{m_i}{m_s} \quad (5)$$

Onde W_{iso^s} , W_{sal^s} , W_{iso^i} , W_{sal^i} , W_{iso^m} , W_{sal^m} são as composições em fração mássica do isopropanol e do sulfato de amônio na fase superior, inferior e na mistura, respectivamente; e m_i e m_s são as massas da fase inferior e superior, respectivamente.

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

$$CLA = \sqrt{[\Delta C_1]^2 + [\Delta C_2]^2} \quad (6)$$

A inclinação da linha de amarração foi determinada por:

$$ILA = \Delta C_1 / \Delta C_2 \quad (7)$$

Onde ΔC_1 e ΔC_2 correspondem à diferença de concentração de componente 1 (C_1) e componente 2 (C_2) nas fases superior e inferior, respectivamente, expressa em % m/m.

4. Partição da lipase

A composição do ponto global (Tabela 3) foi utilizada para a construção dos sistemas aquosos bifásicos estudados na partição da lipase. Os sistemas foram formados a partir da adição de quantidades adequadas de solução estoque de PEG + sulfato de amônio + água e isopropanol + sulfato de amônio + água com posterior adição do extrato enzimático para uma massa total de 5 g em tubos de centrífuga cônico. Entretanto, a presença do sulfato de amônio como solução extratora fez com que fosse necessário realizar um balanço de massa que levasse em consideração essa entrada de sal na composição global do sistema.

Os tubos foram misturados e centrifugados a 2000g por 10 minutos a fim de acelerar a separação de fases. Em seguida, os sistemas foram mantidos em repouso por 12 horas em estufa B.O.D na condição de temperatura determinada. Após os sistemas atingirem o

equilíbrio, as fases foram coletadas com seringas de agulhas finas, para posterior determinação do teor de proteína total e da atividade enzimática.

i. Determinação do teor de proteínas

A quantificação de proteínas totais nos extratos obtidos foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda fixado em 595 nm. A curva analítica foi construída utilizando como padrão a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA).

ii. Determinação de atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada conforme Winkler e Stukmann (1979) com modificações, utilizando o substrato sintético p-nitrofenil palmitato (p-NPP). O meio reacional é denominado solução C, composto pelas soluções A e B:

- Solução A: 162,0 mg de pNPP dissolvidos em 30,0 mL de isopropanol;
- Solução B: 9,0 g de Triton X-100 e 0,90 g de goma arábica dissolvidos em 450 mL de tampão Tris-HCl 0,09M, pH 8,0.

Para a solução C, foram adicionados 1,0 mL da solução A e 9,0 mL da solução B sob agitação contínua. Para cada tubo de ensaio, adicionou-se 0,5 mL da mistura em banho termostático a 37°C por 10 minutos para ambientação. Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL do extrato bruto enzimático foi incubada juntamente à solução C por 15 minutos. A reação foi interrompida aquecendo as amostras a 100°C por 1 minuto, seguido de adição de 2,0 mL de acetona (PASTORE et al., 2003).

O p-nitrofenol liberado pela ação da lipase gera coloração amarelada que pode ser observada pela leitura da absorbância a 410 nm. A curva padrão foi construída utilizando-se p-nitrofenol. Uma unidade de lipase (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por mL por minuto nas condições descritas. Para o cálculo da atividade enzimática, foi utilizada a Equação 8:

$$\frac{U}{mL} = \frac{C_{pNP} \times FD \times V_T}{V_E \times t} \quad (8)$$

Onde: **U/mL** é a unidade de atividade enzimática, definida de acordo com o método

utilizado, nas condições padrão de ensaio; C_{pNP} é a concentração de p-nitrofenol (μmol) liberado por mL; FD é o fator de diluição; V_T é o volume total de reação; V_E é o volume de extrato enzimático; t é o tempo de reação (minutos).

Por fim, a atividade enzimática específica (U/mg) foi obtida através da razão entre a atividade enzimática (U/mL) e a concentração de proteínas (mg/mL).

5. Avaliação dos parâmetros de partição

O coeficiente de partição de atividade enzimática (K_e), definido como a atividade enzimática (U/mL) nas fases superior (U_{sup}) e inferior (U_{inf}) do sistema, foi determinado conforme descrito pela Equação 9.

$$K_e = \frac{[U]_{sup}}{[U]_{inf}} \quad (9)$$

O coeficiente de partição de proteína (K_p), que é a relação entre a concentração de equilíbrio de proteína total (mg/mL) na fase superior (C_{sup}) e inferior (C_{inf}), foi calculado como descrito na Equação 10.

$$K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (10)$$

A seletividade (S) foi estabelecida como a razão entre o coeficiente de partição de atividade da lipase (K_e) e o coeficiente de partição de proteína total (K_p):

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (11)$$

Para que seja possível selecionar o SAB com melhor capacidade de extração da proteína estudada, calculou-se a recuperação teórica (Y%) do sistema, utilizando a Equação 12 (PICÓ et al., 2006):

$$y(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{RK_e}\right)} \quad (12)$$

Onde R corresponde à razão entre os volumes da fase superior e inferior e K_e ao coeficiente de partição de atividade da lipase.

O fator de purificação (FP) foi definido como a razão entre a atividade enzimática

específica (U/mg) na fase preferencial de particionamento da enzima ($[U_{esp}]_{fase}$) e no extrato bruto/clarificado ($[U_{esp}]_{ext}$):

$$FP = \frac{[U_{esp}]_{fase}}{[U_{esp}]_{ext}} \quad (13)$$

6. Estimativa da variação da energia livre de Gibbs

Ao estudar a partição do substrato entre as fases de um sistema aquoso bifásico, a espontaneidade da reação pode ser melhor compreendida com base no parâmetro termodinâmico denominado energia livre de Gibbs de transferência (ΔG), que é calculado pela relação clássica da termodinâmica demonstrada:

$$\Delta G (kJ mol^{-1}) = -RT \ln K_e \quad (14)$$

Onde **R** é a constante universal dos gases ($8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), **T** é a temperatura do sistema (K) e **K_e** é o coeficiente de partição de atividade enzimática.

2.3.3 Identificação da proteína por eletroforese SDS-PAGE

Os extratos enzimáticos bruto e purificado foram submetidos à técnica de eletroforese por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%) sob condições desnaturantes para acompanhamento qualitativo das moléculas presentes conforme Cutler (2004), com modificações. A desnaturação das amostras ocorreu a partir de sua adição em tampão de desnaturação (Tris-HCl pH 6,8, 4% m/v de SDS, 4% v/v de 2-mercaptoetanol, 20% v/v de glicerol e azul de bromofenol) na proporção 1:3.

O gel de poliacrilamida foi polimerizado com um gel de separação de 15% e um gel de empilhamento de 5%, seguido de adição de 30 μL de amostra (desnaturada e centrifugada) em cada poço e posterior acréscimo de tampão do eletrodo para cobri-los completamente. A corrida obteve duração de 160 minutos em uma voltagem de 100 V. Por fim, o gel foi retirado das placas de vidro e imerso em solução corante com 0,1% de azul de Cromassie brilliant G-250, metanol, água e ácido acético na proporção 5:4:1 e descorado com a mesma solução sem o azul de Cromassie. As massas moleculares dos componentes presentes na amostra foram determinadas utilizando-se marcador de peso molecular com bandas entre 24 e 200 kDa. O gel resultante foi escaneado para documentação em foto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Dados de equilíbrio: diagrama de equilíbrio e comprimento da linha de amarração

A partir do diagrama de fases para o SAB composto por isopropanol e sulfato de amônio na temperatura de 35°C (Figura 1), é possível obter as informações referentes à concentração dos componentes para a formação das duas fases.

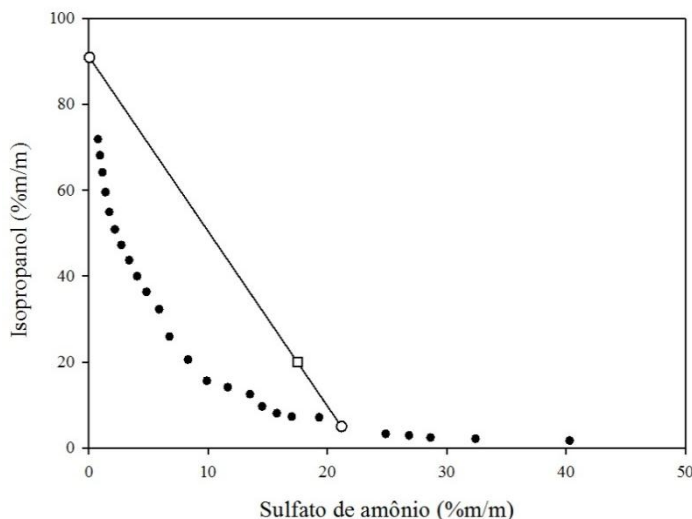


Figura 1: Diagrama de fases do sistema isopropanol + sulfato de amônio + água na temperatura de 35°C.

A partir da Figura 1, verifica-se que o ponto global (20% PEG/isopropanol; 17,5% sulfato de amônio) selecionado para os demais sistemas se encontra dentro da região bifásica do sistema isopropanol-sulfato de amônio na temperatura de 35°C, possibilitando concluir que é adequado utilizar essa composição para o mesmo.

Os dados obtidos experimentalmente a partir da curva binodal permitiram ajustar a equação não linear (Equação 1) proposta por Hu et al. (2003), sendo os valores dos parâmetros a , b , c e d , o coeficiente de determinação (R^2) e o desvio padrão (sd) da equação ajustada para o sistema estudado apresentados na Tabela 4. Os valores de R^2 e sd indicam que a equação se ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais.

Tabela 4 – Parâmetros ajustados, coeficiente de determinação e desvio padrão obtidos para o sistema formado por isopropanol e sulfato de amônio a 35°C pela equação de Hu et al. (2003).

a	b	c	d	R^2	sd
-0,0072	-3,3485	-6,6142	-1,2544	0,9987	0,014

As composições de equilíbrio, das fases superior e inferior, o comprimento (CLA) e a inclinação (ILA) da linha de amarração do sistema composto por isopropanol e sulfato de amônio na temperatura de 35°C são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados da linha de amarração e fração mássica do sistema formado por isopropanol (W_{iso}), sulfato de amônio (W_{sal}) e água a 35°C.

CLA	ILA	Composição global		Fase superior		Fase inferior	
		W_{iso}	W_{sal}	W_{iso}	W_{sal}	W_{iso}	W_{sal}
0,8857	-0,2454	20	17,5	0,9098	0,0006	0,0496	0,2117

A partir da Tabela 5 é possível observar que a concentração de sal é praticamente nula dentro da fase rica em isopropanol (superior), enquanto a fase com predominância de sulfato de amônio (inferior) apresenta uma concentração de álcool um pouco maior, apesar de não ser tão elevada.

Segundo Da Silva e Loh (2006), o comprimento da linha de amarração está associado à seletividade do sistema, sendo que, à medida que o CLA aumenta, a molécula alvo possui um indicativo em migrar preferencialmente para uma das fases, distanciando o coeficiente de partição cada vez mais de 1. Tal comportamento é resultante do aumento da diferença na composição entre as fases, que aumenta as contribuições entálpicas e entrópicas na transferência do bioproduto para uma das fases. Em González-Amado et al. (2016) e Sanglard et al. (2018), os comprimentos da linha de amarração de 0,4562 em SAB composto por PEG 4000 e sulfato de amônio a 35°C e 0,5199 em sistema isopropanol-sulfato de amônio a 25°C são menores que o do presente estudo (CLA = 0,8857), onde os resultados experimentais encontrados para os parâmetros de partição (item 3.2) reforçarão a afirmativa de particionamento espontâneo para o sistema isopropanol-sulfato de amônio a 35°C.

Entretanto, é válido ressaltar que o aumento no comprimento da linha de amarração não é uma garantia de eficiência do processo de separação, fazendo-se necessário compreender a natureza das biomoléculas envolvidas e dos constituintes do sistema para estabelecer as conclusões adequadas (CHAIWUT et al., 2010).

3.2 Partição da lipase

Foram realizados experimentos de partição da lipase em sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG 4000 + sulfato de amônio + água e isopropanol + sulfato de amônio + água para as temperaturas de 25°C e 35°C. Os resultados dos coeficientes de partição de proteínas (K_p) e de atividade enzimática (K_e) e da recuperação teórica (% Y) foram analisados estatisticamente através do teste F, na análise de variância (ANOVA), apresentando efeito significativo ($P < 0,05$) para a interação entre temperatura e tipo de sistema, bem como o desdobramento da influência da temperatura no tipo de sistema e do tipo de sistema na temperatura para as três variáveis resposta. Dessa forma, realizou-se a avaliação por teste de

comparação entre médias (Tabela 6) utilizando o teste de Tukey.

Tabela 6 – Comparação entre médias para coeficiente de partição de atividade enzimática e de proteínas e recuperação teórica de sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C. (CV = 8,14%, 11,32% e 2,79%)

Sistema	K _e		K _p		%Y	
	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C
Isopropanol-Sulfato de amônio (Extrato bruto)	0,053 ± 0,001 ^{Aa}	0,041 ± 0,001 ^{Aa}	2,333 ± 0,126 ^{Aa}	0,257 ± 0,002 ^{Ab}	86,391 ± 1,385 ^{Aa}	85,074 ± 1,289 ^{Aa}
Isopropanol-Sulfato de amônio (Precipitado)	0,114 ± 0,003 ^{Ba}	0,109 ± 0,004 ^{Ba}	1,561 ± 0,092 ^{Ba}	0,195 ± 0,005 ^{ABb}	75,117 ± 1,354 ^{Ba}	74,723 ± 1,956 ^{Ba}
PEG-Sulfato de amônio (Extrato bruto)	0,247 ± 0,004 ^{Ca}	0,636 ± 0,031 ^{Cb}	0,100 ± 0,010 ^{Ca}	0,214 ± 0,014 ^{ABa}	70,608 ± 0,374 ^{Ca}	49,118 ± 2,528 ^{Cb}
PEG-Sulfato de amônio (Precipitado)	0,227 ± 0,009 ^{Da}	0,582 ± 0,037 ^{Db}	0,082 ± 0,001 ^{Ca}	0,058 ± 0,003 ^{Ba}	62,426 ± 0,710 ^{Da}	48,680 ± 1,883 ^{Db}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey e de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

O teste F indicou que a variação de temperatura influenciou no sistema PEG-sulfato de amônio para K_e, e no sistema isopropanol-sulfato de amônio para K_p. No teste de comparação entre médias, é possível verificar influência significativa do tipo de sistema em ambas as temperaturas.

Os coeficientes apresentaram valores menores que 1 nos sistemas formados por PEG nas duas temperaturas estudadas e por isopropanol na temperatura de 35°C, o que indica migração preferencial das moléculas para a fase inferior rica em sal. Mathiazakan et al. (2016) e Ramakrishnan et al. (2016) demonstraram desempenho semelhante em SABs compostos por 1-propanol/sulfato de amônio e PEG/sulfato de amônio. Tal resultado pode ser explicado pelo favorecimento da solubilidade das proteínas através do efeito *salting in* promovido pela solução salina, onde os íons dissociados tendem a reforçar a camada de solvatação da enzima (ANVARI, 2015). Além disso, o particionamento para a fase contendo álcool ou PEG é desfavorecido, respectivamente, por sua capacidade desnaturante ou pelo efeito do volume de exclusão. Sob essa circunstância, polietilenoglicol e lipase irão competir pelos espaços intersticiais em virtude da extensa massa molar do polímero, ocasionando no que é conhecido por impedimento estérico e expulsando a biomolécula da fase (LEHNINGER, 2006; RAMAKRISHNAN et al., 2016).

O SAB composto por isopropanol e sulfato de amônio na temperatura de 25°C estabeleceu coeficiente de partição de proteínas com valor maior que 1 – preferência pela fase superior rica em álcool. O comportamento em questão é visto em Show et al. (2013), que

também utilizou um sistema formado por isopropanol e sulfato de amônio. De acordo com o autor, a afinidade observada entre as demais proteínas presentes no extrato e a fase nessas condições pode ser explicada pelo efeito da temperatura. Em temperatura ambiente, os contaminantes migram preferencialmente para o meio contendo isopropanol. No entanto, o aumento da temperatura do sistema tende a favorecer a solubilidade do álcool em água, dificultando as interações com os biocompostos e promovendo seu deslocamento para a fase rica em sal (MARTINS et al., 2013).

No que se diz respeito à recuperação teórica, o teste F e o teste de comparação entre médias verificaram que as duas temperaturas tiveram efeito significativo no tipo de sistema e que apenas o sistema PEG-sulfato de amônio teve significância dentro das temperaturas. Dessa forma, é possível apontar que o sistema isopropanol e sulfato de amônio (extrato bruto) apresentou maior rendimento.

O presente trabalho obteve valores distintos para o fator recuperação teórica da enzima, que é dependente das condições do meio e da afinidade da lipase por uma das fases. Por exemplo, Nandini e Rastogi (2011) atingiram 28,44% de rendimento no sistema composto por PEG 6000 e sulfato de amônio, já Barbosa et al. (2011) encontrou 90,15% para o sistema PEG 4000-fosfato de potássio. O sistema isopropanol-sulfato de amônio (extrato bruto) a 25°C desse experimento alcançou %Y máxima de 86,391%, de modo semelhante ao observado em Ooi et al. (2009), que apresentou 92,8% de recuperação teórica em um sistema isopropanol-sulfato de amônio.

Por fim, os parâmetros seletividade (S), fator de purificação (FP) e energia livre de Gibbs de transferência (ΔG) da lipase são apresentados na Tabela 7 pela análise estatística através do teste F na análise de variância (ANOVA). Os resultados verificaram efeito significativo ($P < 0,05$) para a interação entre temperatura e sistema e para o desdobramento da significância da temperatura no tipo de sistema e do tipo de sistema na temperatura para todas as variáveis estudadas. Assim, realizou-se a comparação entre médias utilizando o teste de Tukey.

No teste F, é possível observar que a variação de temperatura não apresentou diferença significativa apenas para o sistema isopropanol-sulfato de amônio (extrato bruto) no fator seletividade. O teste de Tukey verificou influência do tipo de sistema em ambas as temperaturas para os três parâmetros.

Tabela 7 – Comparação entre médias para seletividade, fator de purificação e variação da energia livre de Gibbs de transferência (ΔG) (kJ mol^{-1}) de sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C. (CV = 8,55%, 6,67% e 2,62%)

Sistema	S		FP		ΔG	
	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C
Isopropanol-Sulfato de amônio (Extrato bruto)	0,023 ± 0,001 ^{Aa}	0,162 ± 0,004 ^{Aa}	4,479 ± 0,210 ^{Aa}	1,183 ± 0,022 ^{Ab}	7,264 ± 0,063 ^{Aa}	8,139 ± 0,061 ^{Ab}
Isopropanol-Sulfato de amônio (Precipitado)	0,073 ± 0,004 ^{Aa}	0,564 ± 0,015 ^{Ab}	2,654 ± 0,180 ^{Ba}	0,423 ± 0,023 ^{Bb}	5,382 ± 0,066 ^{Ba}	5,662 ± 0,104 ^{Bb}
PEG-Sulfato de amônio (Extrato bruto)	2,489 ± 0,218 ^{Ba}	2,986 ± 0,193 ^{Bb}	1,139 ± 0,028 ^{Ca}	3,289 ± 0,125 ^{Cb}	3,462 ± 0,035 ^{Ca}	1,161 ± 0,126 ^{Cb}
PEG-Sulfato de amônio (Precipitado)	3,951 ± 0,147 ^{Ca}	10,082 ± 0,381 ^{Cb}	0,972 ± 0,022 ^{Ca}	3,533 ± 0,146 ^{Cb}	2,799 ± 0,066 ^{Da}	1,388 ± 0,163 ^{Cb}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey e de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

O fator seletividade representa a capacidade do sistema em separar molécula alvo e demais proteínas em fases diferentes. Em termos de seletividade, o sistema PEG-sulfato de amônio (precipitado) obteve a maior resposta ($S = 10,082$) na temperatura de 35°C e o SAB formado por isopropanol e sulfato de amônio (extrato bruto) na temperatura de 25°C a menor resposta ($S = 0,023$). Já o fator de purificação está relacionado com a aptidão do sistema em remover contaminantes do extrato bruto enzimático. O valor máximo ($FP = 4,479$) encontrado no sistema isopropanol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (extrato bruto) a 25°C está de acordo com a literatura, em que Anvari (2015) alcançou $FP = 4,0$ em um sistema PEG 4000- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e Ooi et al. (2009) atingiu $FP = 7,4$ em um sistema isopropanol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

A energia livre de Gibbs de transferência (ΔG) é a propriedade termodinâmica que relaciona as contribuições entálpicas e entrópicas da partição de um bioproduto. Para o particionamento dentro de um sistema aquoso bifásico, esse parâmetro informa a variação da energia livre associada ao processo de transferência da enzima (K_e) de uma fase para outra, o que pode variar de acordo com o tipo de sistema (DA SILVA e LOH, 2006). Segundo Levine (2012), quanto menor for o ΔG , mais espontâneo é o processo de transferência, onde a busca pelo equilíbrio termodinâmico é encontrada com a tendência de deslocamento da enzima da fase inferior para a superior. O valor positivo da energia livre de Gibbs para os sistemas contraria tal afirmação, onde a molécula migrou preferencialmente para a fase inferior devido à ausência de afinidade por PEG/álcool. Nesse caso, a espontaneidade da transferência será observada com o deslocamento da lipase para o meio contendo sulfato de amônio.

É importante ressaltar que os parâmetros de particionamento não devem ser avaliados

a partir da superioridade numérica, pois esta não representa necessariamente a eficiência do SAB. Os dados menores que 1 para o coeficiente de partição de atividade enzimática indicam apenas que a molécula alvo teve maior afinidade pela fase inferior (rica em sal). Já para o fator seletividade, valores cada vez mais próximos de zero ($S = 0,023$) demonstram que o K_e é menor que o K_p , permitindo concluir que houve separação entre enzima e demais proteínas em fases diferentes – inferior e superior, respectivamente para o tratamento em questão.

Dentro desse contexto, conclui-se que a utilização do sistema aquoso bifásico composto por isopropanol e sulfato de amônio na temperatura de 25°C é o melhor protocolo inicial de purificação da lipase extraída da amêndoa do pequi dentro das condições estudadas.

3.3 Identificação da proteína por eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE (Figura 2) foi realizada para acompanhar qualitativamente o processo de extração da lipase da amêndoa do pequi, além de auxiliar na estimativa da massa molar da lipase extraída.

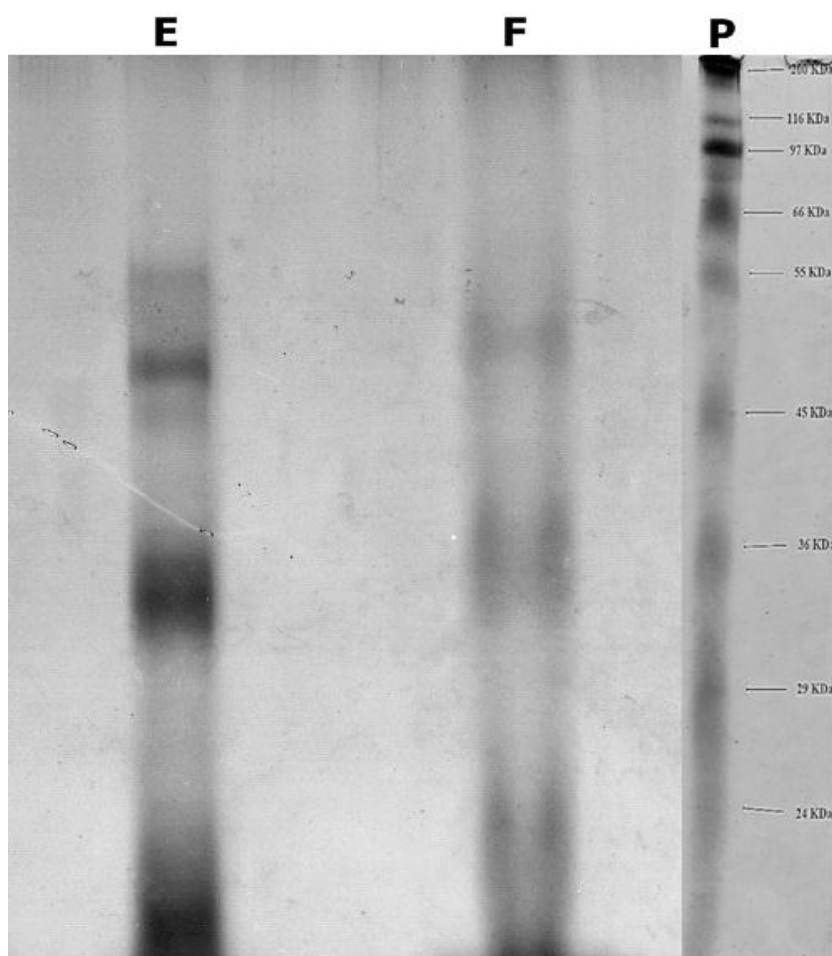


Figura 2: Eletroforese SDS-PAGE da lipase da amêndoa do pequi. (E) Extrato bruto da amêndoa do pequi; (F) Fase inferior do sistema isopropanol-sulfato de amônio a 25°C; (P) Marcador molecular de proteínas (24 a 200 kDa).

A Figura 2 verifica a presença de bandas similares no extrato bruto e na fase do sistema isopropanol-sulfato de amônio a 25°C em que a lipase foi preferencialmente concentrada (inferior). No entanto, percebe-se que a corrida do extrato apresentou melhor visualização e que essa amostra continha uma banda a mais (massa molecular de 55 kDa).

Os valores entre 24 e 55 kDa observados são condizentes com a faixa de peso molecular esperada para as lipases – entre 19 e 75 kDa (LEHNINGER, 2006). Contudo, a presença de mais de uma banda na fase permite concluir que: a amêndoa do pequi contém lipases de tamanhos distintos; ou o protocolo de purificação adotado não foi eficiente na eliminação de contaminantes de diferentes pesos moleculares. Nesse caso, o procedimento ainda deve ser repetido para o extrato enzimático purificado de etapas *downstream* posteriores que sejam capazes de aumentar a pureza do meio.

4. CONCLUSÕES

O diagrama de equilíbrio de fases determinado para o sistema Isopropanol-Sulfato de amônio a 35°C demonstrou que o ponto global selecionado para os sistemas é localizado dentro de sua região bifásica, sendo adequado utilizá-lo também para esse SAB. A partição da lipase em sistemas aquosos bifásicos indicou que o sistema composto por isopropanol e sulfato de amônio (extrato bruto) a 25°C obteve os melhores resultados para coeficiente de partição de atividade enzimática (K_e) e de proteínas (K_p), recuperação teórica (%Y), seletividade (S) e fator de purificação (FP), além da energia livre de Gibbs de transferência (ΔG) apontar que o particionamento da enzima dentro do mesmo foi espontâneo. A técnica de eletroforese SDS-PAGE verificou a presença de algumas bandas na fase do sistema que a lipase teve maior afinidade (inferior), concluindo-se que a amêndoa do pequi contém lipases de tamanhos distintos ou o protocolo de separação adotado não foi eficiente na eliminação de contaminantes de diferentes pesos moleculares. No segundo caso, será necessária uma nova etapa de purificação para aumentar a pureza do meio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, D. C. A.; FIGUEIREDO, K. C. Separação de proteínas de uma solução salina por membrana de diálise de acetato de celulose. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 7, p. 1023-1033, 2017.

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**. New York: John Wiley & Sons, 1971.

ANDRIOLI, A.; ALVES, L. A. O.; TEIXEIRA, M. F. S.; PINHEIRO, R. R.; DIAS, R. P. **Técnica de microfiltração seriada para purificação da proteína p28 do vírus da Artrite Encefalite Caprina**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos. 1. Ed. 2019.

ANVARI, M. Extraction of lipase from *Rhizopus microsporus* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 4, p. 723-731, 2015.

BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; FRICKS, A. T.; ZANIN, G. M.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of chromatography B**, Aracaju, v. 879, p. 3853-3858, 2011.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties - a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010.

BOLINELLI, R. C.; GULDVIK, I. J.; GRONBERG, H.; WIKLUND, F.; MILLS, I. G.; THIEDE, B. A differential protein solubility approach for the depletion of highly abundant proteins in plasma using ammonium sulfate. **The Analyst**, v. 140, n. 4, p. 8109-8117, 2015.

BORRELLI, G.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774–20840, 2015.

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.

CARDOSO, V. M. M.; LEMOS, V. P. Adsorção Simultânea do Cu (II), Zn (II) e Ni (II) em argilas da formação Solimões. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 169-189, 2014.

CASAS-GODOY, L.; GASTEAZORO, F.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; MARTY, A.; SANDOVAL, G. Lipases: an overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 1835. In: Springer Nature, 2018.

CASTIGLIONI, G. L.; COSTA, J. A. V.; ALEGRE, R. M. Estudo da produção de lipase por *Burkholderia cepacia*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 4, p. 637-644, 2018.

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.

COELHO, D. F.; SILVEIRA, E.; PESSOA Jr., A.; TAMBOURGI, E. B. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 185-192, 2013.

CUTLER, P. **Protein purification protocols**. 2 Ed. Totowa: Humana Press, 2004. 484p.

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

FEKETE, S.; GUILLARME, D.; SANDRA, P.; SANDRA, K. Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric methods for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 480-507, 2016.

GHOSH, R. **Principles of bioseparations engineering**. Singapore: World Scientific Publishing, 2006. 282p.

GONZÁLEZ-AMADO, M.; RODIL, E.; ARCE, A.; SOTO, A.; RODRÍGUEZ, O. The effect of temperature on polyethylene glycol (4000 or 8000) e (sodium or ammonium) sulfate Aqueous Two Phase Systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 428, p. 95-101, 2016.

HU, M.; ZHAI, Q.; LIU, Z.; XIA, S. Liquid-Liquid and Solid-Liquid Equilibrium of the Ternary System Ethanol + Cesium Sulfate + Water at (10, 30, and 50) °C. **Journal Chemical & Engineering Data**, v.48, n.6, p.1561-1564, 2003.

JIANG, B.; FENG, Z.; LIU, C.; XU, Y.; LI, D.; JI, G. Extraction and purification of wheat-esterase using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2878-2885, 2015.

KHAYATI, G.; ALIZADEH, S. Extraction of lipase from *Rhodotorula glutinis* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Fluid Phase Equilibria**, v. 353, p. 132-143, 2013.

LEVINE, I. N. **Físico-química**. 6 Ed. São Paulo: LTC, 2012. 189p.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química nova**, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013.

MATHIAZAKAN, P.; SHING, S. Y.; YING, S. S.; KEK, H. K.; TANG, M. S. Y.; SHOW, P. L.; OOI, C. W.; LING, T. C. Pilot-scale aqueous two-phase floatation for direct recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* strain ST8. **Separation and Purification Technology**, v. 171, p. 206-213, 2016.

MAZZEU, C. J.; RAMOS, E. Z.; DA SILVA CAVALCANTI, M. H.; HIRATA, D. B.; VIRTUOSO, L. S. Partitioning of *Geotrichum candidum* lipase from fermentative crude extract by aqueous two-phase system of polyethylene glycol and sodium citrate. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 158-164, 2015.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503-511, 2012.

MERCHUK, J. C., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B**, v. 711, n. 1, p. 285-293, 1998.

NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Liquid-liquid extraction of lipase using aqueous two-Phase system. **Food Processing Technology**, v. 4, p. 295-303, 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de**

Lehninger. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

NIAN, R.; ZHANG, W.; TAN, L.; LEE, J.; BI, X.; YANG, Y.; GAN, H. T.; GAGNON, P. Advance chromatin extraction improves capture performance of protein A affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1431, p. 1-7, 2016.

OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1083-108, 2009.

PADILHA, G. S.; OSÓRIO, W. R. Economic method for extraction/purification of a *Burkholderia cepacia* lipase with potential biotechnology application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2019. doi:10.1007/s12010-019-03041-x

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**, v. 101, p. 157-165, 2016.

PASSOS, H.; TRINDADE, M. P.; VAZ, T. S. M. DA COSTA, L. P.; FREIRE, M. G. F.; COUTINHO, J. A. P. The impact of self-aggregation on the extraction of biomolecules in ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 108, p. 174-180, 2013.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp.. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p.135-140, 2003.

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.

RAMAKRISHNAN, V.; GOVEAS, L. C.; SURALIKERIMATH, N.; JAMPANI, C.; HALAMI, P. M.; NARAYAN, B. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 19-27, 2016.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; SANTOS, J. C. S.; BERENQUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 746-770, 2019.

SANGLARD, M. G.; FARIAS, F. O.; SOSA, F. H. B.; SANTOS, T. P. M.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Measurement and correlation of aqueous biphasic systems composed of alcohol (1-propanol/2-propanol/tert-butanol) + (NH₄)₂SO₄ + H₂O at 298 K and a textile dye partition. **Fluid Phase Equilibria**, v. 466, p. 7-13, 2018.

SELVAKUMAR, P.; LING, T. C.; WALKER, S.; LYDDIATT, A. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: a

novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS. **Separation and Purification Technology**, v. 75, p. 323-331, 2010.

SHOW, P. L.; LING, T. C.; LAN, J. C. W.; TEY, B. T.; RAMANAN, R. N.; YONG, S. T.; OOI, C. W. Review of microbial lipase purification using aqueous two-phase systems. **Current Organic Chemistry**, v. 19, p. 19-29, 2015.

SHOW, P. L.; OOI, C. W.; ANUAR, M. S.; ARIFF, A.; YUSOF, Y. A.; CHEN, S. K.; ANUAR, M. S. M.; LING, T. C. Recovery of lipase derived from *Burkholderia cenocepacia* ST8 using sustainable aqueous two-phase flotation composed of recycling hydrophilic organic solvent and inorganic salt. **Separation and Purification Technology**, v. 110, p. 112-118, 2013.

SOUZA, R. L.; LIMA, R. A.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. **Separation e Purification Technology**, Aracaju, v. 155, p. 118-126, 2015.

SOUZA, R. L.; BARBOSA, J. M. P.; ZANIN, G. M.; LOBÃO, M. W. N.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 288-300, 2010.

TAN, Z.; LI, F.; ZHAO, C.; TENG, Y.; LIU, Y. Chiral separation of mandelic acid enantiomers using an aqueous two-phase system based on a thermo-sensitive polymer and dextran. **Separation and Purification Technology**, v. 172, p. 382-387, 2017.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 3, p. 663-670, 1979.

ZHANG Y. Y.; LIU J. H. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 909-912, 2010.

ANEXO – Tabelas de Análise de variância (ANOVA)

Análise de variância para a atividade enzimática total dentro dos testes iniciais de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando três soluções extratoras distintas. (CV =3,75%.)

FV	GL	SQ	QM	f	p
Tratamento	2	108396,179	54198,090	272,104	<0,0001
Resíduo	5	995,908	199,182		
Total	7	109392,088	15627,441		

Análise de variância para a atividade enzimática específica dentro dos testes iniciais de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando três soluções extratoras distintas. (CV =0,41%.)

FV	GL	SQ	QM	f	p
Tratamento	2	4,059	2,030	2282,894	<0,0001
Resíduo	5	0,004	0,0008		
Total	7	4,064	0,581		

Análise de variância para a recuperação de proteínas dentro dos testes iniciais de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando três soluções extratoras distintas. (CV =3,94%.)

FV	GL	SQ	QM	f	p
Tratamento	2	1095,114	547,557	200,163	<0,0001
Resíduo	5	13,678	2,736		
Total	7	1108,792	158,399		

Análise de variância para o modelo ajustado da atividade enzimática dentro do primeiro planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	4	370206,286	92551,571	48,794	<0,0001
Tratamento	15	639138,092	42609,206	22,464	<0,0001
Falta de ajuste	11	268931,807	24448,346	12,889	<0,0001
Erro	32	60697,223	1896,788		
Total	47	699835,315	14890,110		

CV =9,33% e R²= 57,92%.

Análise de variância para o modelo ajustado da recuperação de proteínas dentro do primeiro planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	3	9201,358	3067,119	798,103	<0,0001
Tratamento	15	11388,361	759,224	197,560	<0,0001
Falta de ajuste	12	2187,003	182,250	47,424	<0,0001
Erro	32	122,976	3,843		
Total	47	11511,337	244,922		

CV =2,68% e R²= 80,79%.

Análise de variância para o modelo ajustado da atividade enzimática dentro do primeiro planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	3	3858427,784	1286142,595	80042,637	<0,0001
Tratamento	15	7348687,842	489912,523	30489,535	<0,0001
Falta de ajuste	12	3490260,058	290855,005	18101,260	<0,0001
Erro	32	12267,264	383,352		
Total	47	7360955,105	156616,066		

CV =3,04% e R²= 52,51%.

Análise de variância para o modelo ajustado da recuperação de proteínas dentro do primeiro planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	4	10832,822	2708,205	168,544	<0,0001
Tratamento	15	14823,096	988,206	61,501	<0,0001
Falta de ajuste	11	3990,275	362,752	22,576	<0,0001
Erro	32	514,183	16,068		
Total	47	15337,279	326,325		

CV =5,43% e R²= 73,08%.

Análise de variância para o modelo ajustado da atividade enzimática dentro do segundo planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	4	457771,744	114442,936	601,528	<0,0001
Tratamento	15	517901,523	34526,768	181,477	<0,0001
Falta de ajuste	11	60129,778	5466,343	28,732	<0,0001
Erro	16	3044,060	190,254		
Total	31	520945,582	16804,696		

CV =2,19% e R²= 88,39%.

Análise de variância para o modelo ajustado da recuperação de proteínas dentro do segundo planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	4	2378,409	594,602	86,477	<0,0001
Tratamento	15	3341,950	222,797	32,403	<0,0001
Falta de ajuste	11	963,542	87,595	12,739	<0,0001
Erro	16	110,014	6,876		
Total	31	3451,964	111,354		

CV =3,23% e R²= 71,17%.

Análise de variância para o modelo ajustado da atividade enzimática dentro do segundo planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	4	9228971,329	2307242,832	9219,438	<0,0001
Tratamento	15	9475986,388	631732,426	2524,320	<0,0001
Falta de ajuste	11	247015,059	22455,914	89,731	<0,0001
Erro	16	4004,136	250,259		
Total	31	9479990,524	305806,146		

CV =2,0% e R²= 97,39%.

Análise de variância para o modelo ajustado da recuperação de proteínas dentro do segundo planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio + tween 80.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	4	1174,037	293,509	40,498	<0,0001
Tratamento	15	1463,664	97,578	13,464	<0,0001
Falta de ajuste	11	289,627	26,330	3,633	0,0098
Erro	16	115,959	7,247		
Total	31	1579,617	50,955		

CV =3,07% e R²= 80,21%.

Análise de variância para o modelo ajustado da atividade enzimática dentro do terceiro planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	3	565181,038	188393,679	1131,067	<0,0001
Tratamento	15	583417,316	38894,488	233,513	<0,0001
Falta de ajuste	12	18236,278	1519,690	9,124	<0,0001
Erro	16	2665,004	166,563		
Total	31	586082,319	18905,881		

CV =3,41% e R²= 96,87%.

Análise de variância para o modelo ajustado da recuperação de proteínas dentro do terceiro planejamento experimental no processo de extração de lipase a partir da amêndoa do pequi utilizando sulfato de amônio.

FV	GL	SQ	QM	f	p
Regressão	4	5567,698	1391,925	548,371	<0,0001
Tratamento	15	5808,801	387,253	152,565	<0,0001
Falta de ajuste	11	241,103	21,918	8,635	0,0001
Erro	16	40,613	2,548		
Total	31	5849,413	188,691		

CV =2,68% e R²= 95,85%.

Análise de variância para o coeficiente de partição de atividade enzimática de sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C. (CV =8,14%)

FV	GL	SQ	QM	f	p
Temperatura	1	0,150	0,150	326,08	<0,0001
Sistema	3	0,824	0,275	596,86	<0,0001
Temperatura*Sistema	3	0,178	0,059	129,06	<0,0001
Tratamento	7	1,152	0,164	357,69	
Resíduo	16	0,007	0,0005		
Total	23	1,159			

Análise de variância para o coeficiente de partição de proteínas de sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C. (CV =11,32%)

FV	GL	SQ	QM	f	p
Temperatura	1	4,217	4,217	914,41	<0,0001
Sistema	3	6,224	2,075	449,91	<0,0001
Temperatura*Sistema	3	5,071	1,690	366,54	<0,0001
Tratamento	7	15,512	2,216	480,54	
Resíduo	16	0,074	0,005		
Total	23	15,586			

Análise de variância para a recuperação teórica de sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C. (CV =2,79%)

FV	GL	SQ	QM	f	p
Temperatura	1	511,926	511,926	137,76	<0,0001
Sistema	3	3475,906	1158,635	311,78	<0,0001
Temperatura*Sistema	3	467,104	155,701	41,90	<0,0001
Tratamento	7	4454,936	636,419	171,26	
Resíduo	16	59,458	3,716		
Total	23	4514,395			

Análise de variância para a seletividade de sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C. (CV =8,55%)

FV	GL	SQ	QM	f	p
Temperatura	1	19,757	19,757	418,84	<0,0001
Sistema	3	186,021	62,007	1314,51	<0,0001
Temperatura*Sistema	3	37,399	12,466	264,28	<0,0001
Tratamento	7	243,177	34,739	736,46	
Resíduo	16	0,755	0,047		
Total	23	243,932			

Análise de variância para o fator de purificação de sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C. (CV =6,67%)

FV	GL	SQ	QM	f	p
Temperatura	1	0,249	0,249	11,49	0,0037
Sistema	3	5,025	1,675	77,19	<0,0001
Temperatura*Sistema	3	40,281	13,427	618,71	<0,0001
Tratamento	7	45,556	6,508	299,88	
Resíduo	16	0,347	0,022		
Total	23	45,903			

Análise de variância para a variação da energia livre de Gibbs de transferência de sistemas formados por PEG 4000/isopropanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25°C e 35°C. (CV =2,62%)

FV	GL	SQ	QM	f	p
Temperatura	1	2,452	2,452	184,45	<0,0001
Sistema	3	131,022	43,674	3285,26	<0,0001
Temperatura*Sistema	3	9,746	3,249	244,37	<0,0001
Tratamento	7	143,220	20,460	1539,05	
Resíduo	16	0,213	0,013		
Total	23	143,433			