



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



**EXTRAÇÃO DE PROTEASES DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* Miller) E
PURIFICAÇÃO PARCIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS
POR PEG+ FOSFATO DE SÓDIO+ÁGUA**

Autor: Annie Nolasco Alves
Orientador (a): Renata Cristina Ferreira Bonomo

ITAPETINGA
BAHIA– BRASIL

2020

ANNIE NOLASCO ALVES

**EXTRAÇÃO DE PROTEASES DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* Miller) E
PURIFICAÇÃO PARCIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS
POR PEG+ FOSFATO DE SÓDIO+ÁGUA**

Dissertação apresentada como parte integrante das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos, no Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientadora: DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Co-orientadores: DSc. Paulo Bonomo

DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

ITAPETINGA
BAHIA– BRASIL

2020

660.634

A477e Alves, Annie Nolasco

Extração de proteases de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) e purificação parcial em sistemas aquosos bifásicos formados por peg+ fosfato de sódio+água. / Annie Nolasco Alves. - Itapetinga: UESB, 2020.

65f.

Dissertação apresentada como parte integrante das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos, no Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Profª. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e coorientação do Prof. D.Sc. Paulo Bonomo e Prof. D.Sc. Rafael Ilhéu da Costa Fontan.

1. Extração de enzima - Ora-pro-nóbis. 2. Sistemas aquosos bifásicos - Partição. 3. Proteínas vegetais – Extração e purificação. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Bonomo, Paulo. IV. Fontan, Rafael Ilhéu da Costa. V. Título.

CDD(21): 660.634

Catlogação na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Extração de enzima - Ora-pro-nóbis
2. Sistemas aquosos bifásicos - Partição
3. Proteínas vegetais – Extração e purificação



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016



DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: EXTRAÇÃO DE PROTEASES DE ORA-PRO-NÓBIS (*Perezkia Aculeata* Miller) E PURIFICAÇÃO PARCIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR PEG+ FOSFATO DE SÓDIO + ÁGUA.

Autor (a): ANNIE NOLASCO ALVES

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

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

Prof. Dr. Paulo Bonomo

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. Leandro Soares Santos
UESB


Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior
UESB


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

Itapetinga-BA, 03 de março de 2020.

“Porque sou do tamanho daquilo que sinto, que vejo e que faço e não do tamanho que as pessoas me enxergam.”

(Autor desconhecido)

À Deus

À toda minha família

Dedico!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir trilhar este caminho e por ser meu amparo sempre.

À minha família por acreditarem em mim, pelo apoio e pelo carinho. Em especial a minha mãe, a quem devo tudo que sou, por todo o amor, cuidado, incentivo e apoio nos momentos difíceis.

Aos primos e amigos de infância Letícia, Filipe, Tabitta e Eduardo pelo companheirismo.

As minhas amigas, companheiras de guerra Gilmara, Ingrid, Isabela e Márcia, pela amizade, incentivo, conselhos, paciência e pelos bons e valiosos momentos ao longo desses anos. Levarei vocês para sempre comigo!

À Marjorie, Priscila, Mateus e Lucas pela amizade, auxílio, por sempre me ouvirem e pelos bons momentos que, com certeza, tornaram essa etapa mais fácil de se cumprir.

À Amanda, Heliara e Mariana muito obrigada por todo carinho e pela confiança em partilhar tantas coisas comigo!!

À professora Renata Bonomo pela confiança, orientação, conselhos, paciência e conhecimentos compartilhados durante a condução deste trabalho.

Aos professores Rafael Fontan e Paulo Bonomo, pela co-orientação e por contribuir positivamente para realização deste trabalho.

Ao Professor Leandro pela prestatividade durante o desenvolvimento deste trabalho e por aceitar fazer parte da banca examinadora.

Aos professores e colegas do LEP.

Ao Professor Evaldo Cardozo por ter aceitado o convite de fazer parte da banca examinadora e contribuir com este trabalho.

À UESB e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos que aqui não foram citados e que contribuíram de alguma forma.

MUITO OBRIGADA!

Sumário

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	4
Fonte: Próprio autor (2020).	7
2.2 ORA-PRÓ-NÓBIS	7
2.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS DO TECIDO VEGETAL	9
b. Precipitação por sais e por solventes orgânicos	12
c. Extração líquido-líquido: sistemas aquosos bifásicos	14
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
4. METODOLOGIA	23
a. Materiais utilizados.....	23
b. Caracterização físico-química das folhas de ora-pro-nóbis.....	23
• Umidade	23
• Cinzas	24
• Proteínas totais	24
• Lipídeos totais.....	24
c. Efeito da solução extratora na atividade proteolítica	25
• Efeito do pH e do tipo de solução na extração das proteínas em termos de atividade proteolítica.	25
• Efeito do tempo e da razão líquido/sólido na extração das proteínas em termos da atividade proteolítica	25
d. Análises relativas aos extratos.....	26
• Quantificação de proteínas solúveis	26

•	Determinação da atividade proteolítica	26
•	Preparo dos sistemas aquosos bifásicos	27
•	Determinação dos dados de equilíbrio e parâmetros dos sistemas.....	27
e.	Partição da protease em SAB	29
•	Determinação dos parâmetros de partição.....	30
5.	RESULTADOS.....	32
a.	Caracterização físico-química das folhas de ora-pro-nóbis.....	32
b.	Extração de proteases das folhas de ora-pro-nóbis	33
•	Efeito do pH da solução na extração.....	33
•	Efeito do tipo de solução na extração.....	34
•	Efeito da razão de solução extratora/soluto e do tempo	35
a.	Partição de proteases de ora-pro-nóbis em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG + fosfato de sódio + água.....	37
6.	CONCLUSÃO	44
7.	REFERÊNCIAS.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fontes e tipos de proteases vegetais	7
Tabela 2. Soluções utilizadas na extração de proteases de origem vegetal.....	11
Tabela 3. Sistemas aquosos bifásicos usados na separação de biomoléculas.	20
Tabela 4. Composições globais para os sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1500 e 4000 g.mol ⁻¹ + fosfato a 25°C de sódio utilizados para partição da protease de ora-pro-nóbis.	29
Tabela 5. Caraterização físico-química das folhas de ora-pro-nóbis em base seca.	32
Tabela 6. Estimativa dos parâmetros do modelo quadrático para proteína (mg) e atividade enzimática total do extrato (U) em função do pH de extração.	33
Tabela 7. Atividade proteolítica do extrato bruto de folhas de ora-pro-nóbis em diferentes tampões.....	35
Tabela 8. Estimativa dos parâmetros do modelo quadrático ajustado para atividade enzimática total do extrato (U).	35
Tabela 9. Parâmetros a, b, c, d e coeficiente de determinação (R ²) obtidos para os sistemas PEG+ fosfato pela equação de HU et al. (2003).....	37
Tabela 10. Volume de exclusão calculado de sistemas formados por PEG + fosfato de sódio + água, a 25°C.....	38
Tabela 11. Volume livre das fases superior e inferior (10 ⁻² mL.g ⁻¹) de SAB formado por PEG 1500 e 4000 g.mol ⁻¹ + fosfato de sódio +água.	38
Tabela 12. Dados das linhas de amarração em porcentagem mássica (%m/m) das fases de SAB formados por PEG (w1) e fosfato de sódio (w2).	39
Tabela 13. Coeficiente de partição de proteína (Kp) e atividade enzimática (Ke), recuperação (Y), fator de purificação (F.P.), seletividade (S) e energia livre de transferência (ΔtG) de sistemas formados por PEG + fosfato de sódio+água, a 25°C.....	40
Tabela 14. Parâmetros de partição de sistemas formados por PEG + fosfato de sódio+água, a 25°C de proteases extraídas com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH7,0.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação das endopeptidases e exopeptidases.	5
Figura 2. Arbusto de ora-pro-nóbis (<i>Pereskia aculeata</i> Miller).....	8
Figura 3. Diagrama de fases expresso em coordenadas triangular (A) e retangular (B).	16
Figura 4. Efeito do pH de extração no teor de proteínas (mg) e na atividade enzimática (U) (Dados experimentais (●); dados obtidos com modelo (—)).	34
Figura 5. Efeito do tempo de extração (min) e razão líquido/sólido (mL.g ⁻¹) na atividade enzimática.	36
Figura 6. Diagrama de fases (A) e linhas de amarração (B) de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG + fosfato de sódio + água a 25°C. (PEG 4000(●---●); PEG 1500(●---●)).	37

RESUMO

ALVES, A.N. **EXTRAÇÃO DE PROTEASES DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* Miller) E PURIFICAÇÃO PARCIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR PEG+ FOSFATO DE SÓDIO+ÁGUA.** Itapetinga-BA: UESB, 2020, 65p. Dissertação-Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Objetivou-se com este trabalho otimizar as condições de extração de proteases de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) e estudar o comportamento de partição desse grupo de enzimas em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (1500 ou 4000 g.mol⁻¹) e fosfato de sódio a 25°C. Inicialmente, foram avaliados o efeito do pH e do tipo de solução na extração de proteases. O efeito do tempo e da razão sólido/líquido foi estudado através de um esquema fatorial 5x4, em delineamento inteiramente casualizado. Os extratos obtidos foram avaliados em termo de concentração de proteína e de atividade enzimática. Para o estudo de partição em SAB, foram avaliados o efeito da composição dos sistemas e a massa molar do polímero sobre o volume de exclusão e volume livre das fases, e sobre os parâmetros de partição coeficientes de partição de proteína (K_p) e de atividade proteolítica (K_e), fator de purificação (F.P.), índice de recuperação (Y), seletividade (S) e energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_t G$). Os resultados obtidos dos estudos iniciais da extração mostram que as melhores condições para extração, em termos de atividade enzimática, foram obtidas quando realizadas com tampão fosfato de sódio pH 7,0. No que se refere ao efeito do tempo e razão líquido/sólido, foi observado que os maiores resultados de atividade enzimática foram encontrados quando os extratos eram obtidos com menor tempo de extração (60 min) e maior volume de solução foi utilizado (21 mL). Quanto aos resultados obtidos na partição em SAB, verificou-se que o K_p obtido em todos os sistemas foi inferior a 1. Já os resultados encontrados para K_e (1,990-2,485) indicam que proteínas com atividade proteolítica na fase permaneceram em maior concentração na fase superior. Foi observado que o aumento do volume de exclusão dos sistemas formados por PEG 4000, o que refletiu diretamente na redução do volume livre da fase polimérica, favorecendo a partição de atividade enzimática para a fase inferior. No que se refere ao efeito da composição, observou-se que aumento da concentração dos componentes do sistema reduziu o coeficiente de partição e atividade. Os sistemas apresentaram boa seletividade (5,942) e os índices de recuperação de atividade (73,204%) e o fator de purificação (1,116) indicam que o processo de purificação foi eficiente. Os valores encontrados de energia livre ($\Delta_t G < 0$) indicam que a partição de proteases para a fase superior nos SAB estudados é um processo espontâneo. A partição das proteases obtidas com tampão Tris-HCl também foi estudada, obtendo-se índice de recuperação de 75%, fator de purificação de 1,40 e seletividade de 6,8. Conclui-se que o processo de otimização foi eficiente e que sistemas formados por PEG + fosfato de sódio podem ser utilizados como uma boa alternativa no desenvolvimento de uma rota de purificação deste grupo de enzimas.

Palavras-chave: Enzimas, partição, proteínas vegetais

*Orientadora (a): Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB. Co-orientadores: DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSC. Paulo Bonomo.

SUMMARY

ALVES, A.N. **ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* Miller) PROTEASE EXTRACTION AND PARTIAL PURIFICATION IN PEG + SODIUM PHOSPHATE AQUEOUS TWO PHASE SYSTEMS.** Itapetinga-BA: UESB, 2020, 65p. Dissertation-Master's in Engineering and Food Science.

The objective of this work was to optimize the extraction conditions of ora-pro-nobis proteases (*Pereskia aculeata* Miller) and to study the partition behavior of this group of enzymes in two-phase aqueous systems formed by polyethylene glycol (1500 or 4000 g.mol⁻¹) and sodium phosphate at 25 ° C. Initially, the effect of pH and type of solution on the extraction of proteases was evaluated. The effect of time and the solid / liquid ratio was studied using a 5x4 factorial experiment, in a completely randomized design. The extracts obtained were evaluated in terms of protein concentration and enzyme activity. For the study of partition in SAB, the effect of the composition of the systems and the molar mass of the polymer on the exclusion volume and free volume of the phases, and on the partition parameters, protein partition coefficients (K_p) and activity were evaluated proteolytic (K_e), purification factor (FP), recovery index (Y), selectivity (S) and Gibbs free transfer energy ($\Delta_t G$). The results obtained from the initial extraction studies show that the best conditions for extraction, in terms of enzymatic activity, were obtained when carried out with sodium phosphate buffer pH 7.0. Regarding the effect of time and liquid / solid ratio, it was observed that the greatest results of enzymatic activity were found when the extracts were obtained with shorter extraction time (60 min) and greater volume of solution was used (21 mL). As for the results obtained in the SAB partition, it was found that the K_p obtained in all systems was less than 1. The results found for K_e (1,990-2,485) indicate that proteins with proteolytic activity in the phase remained in greater concentration in the phase higher. It was observed that the increase in the exclusion volume of the systems formed by PEG 4000, which directly reflected in the reduction of the free volume of the polymeric phase, favoring the partition of enzymatic activity to the lower phase. With regard to the composition effect, it was observed that an increase in the concentration of the system components reduced the partition and activity coefficient. The systems showed good selectivity (5,942) and the activity recovery rates (73,204%) and the purification factor (1,116) are similar to other results found in the literature and indicate that the purification process was efficient. The values found for free energy ($\Delta_t G < 0$) indicate that the partition of proteases to the upper phase in the studied SABs is a spontaneous process. It is concluded that the optimization process were efficient and that systems formed by PEG + sodium phosphate can be used as a good alternative to purify this group of enzymes. The protease partition extracted with Tris-HCl buffer was also studied, obtaining a high recovery rate (75%), purification factor (1.40) and selectivity (6.8). To conclude that the optimization process was efficient and that systems formed by PEG + sodium phosphate can be used as a good alternative in the development of a purification route for this group of enzymes.

Keywords: Enzymes, partition, vegetable proteins

INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas que atuam especificamente sobre as ligações peptídicas das proteínas e constituem o grupo de maior importância na indústria, uma vez que correspondem a 60% do comércio mundial de enzimas. Elas estão amplamente distribuídas nos organismos vivos (plantas, animais e microrganismos) onde desempenham importante papel nutricional e regulatório (CHINNADURAI; KRISHNAN; PERUMAL, 2018; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2018; FERNANDES; TECNICO; LISBOA, 2018). São aplicadas na indústria têxtil, de detergentes, de couro, farmacêutica, biotecnológica e de alimentos. Na indústria alimentícia elas são usadas para melhoria de propriedades funcionais e nutricionais de proteínas, fabricação de bebidas e tenderização de carnes. Sua aplicação mais expressiva é na fabricação de queijos na qual atua como coagulante (KOBILIZ, 2010; AFSHARNEZHAD et al., 2019).

Devido à importância das proteases para diversos setores da indústria, há uma demanda crescente nas pesquisas voltadas à obtenção de novas fontes, bem como nos processos de purificação e caracterização destas enzimas. As proteases de origem microbiana são usadas preferencialmente, devido rápido crescimento destes microrganismos e em quantidades relativamente grandes além da grande variedade catalítica destas enzimas. No entanto, recentemente, proteases de origem vegetal tem se mostrado cada vez mais atrativas, principalmente, devido às vantagens como a estabilidade em ampla faixa de pH, temperatura, presença de aditivos e compostos orgânicos.

Dentre as proteases vegetais, a papaína, bromelina e ficina são usadas há algum tempo na medicina convencional e na indústria de alimentos, em processos como fermentação, precipitação de leite, produção de hidrolisados proteicos altamente solúveis, produção de aminoácidos essenciais e tratamento de águas residuais (PAVAN et al., 2012; ALICI; ARABACI, 2018). Proteases já foram identificadas de diversas famílias de plantas como Cactaceae, Rosaceae, Sapotaceae, Moringaceae. A descoberta de proteases com diferentes propriedades permite o desenvolvimento de processos industriais, além de poder proporcionar ao produto final características diferentes das obtidas com as enzimas de fonte convencional, como acontece quando cardosinas da *Cynara cardunculus* são usadas na produção de queijos (AMID et al. 2014; MUTHU et al. 2017; SALEHI et al. 2017; FEIJOO-SIOTA et al. 2018).

Uma destas fontes alternativas é a *Pereskia aculeata* Miller, que é um cacto amplamente distribuído em regiões tropicais da América, e em países como Índia e Austrália. No Brasil, é conhecida popularmente como ora-pro-nóbis, podendo ser encontrada nas regiões nordeste e sudeste do país. Esta planta pertence à família Cactacea, e é caracterizada pelo alto

valor nutricional devido a presença significativa de proteínas, vitaminas, minerais (cálcio, fósforo, magnésio), fibras e compostos bioativos (TAKEITI et al., 2009; PINTO; SCIO, 2014; SOUZA et al., 2016). Além de ser usada na alimentação humana, estudos também evidenciam o uso da ora-pro-nóbis como fonte para extração de hidrocoloídes (LIMA JUNIOR et al., 2013; MARTIN et al., 2017), e no tratamento de processos inflamatórios (PINTO et al., 2015). Até o momento não consta na literatura trabalhos que relatem sobre a extração de proteases de ora-pro-nóbis. Visto a importância das proteases em diferentes processos industriais, o sucesso na obtenção dessas enzimas, associado à vantagens como a ampla distribuição geográfica e simples condições de cultivo da ora-pro-nóbis, podem fomentar o interesse da indústria de alimentos e farmacêutica nesta planta, cujo potencial ainda não foi devidamente explorado.

Ainda que as proteases vegetais apresentem propriedades que possibilitem sua aplicação em processos industriais, a sua viabilidade econômica está diretamente relacionada ao custo e eficiência dos processos de extração e purificação. Neste contexto, torna-se indispensável estudos prévios à cerca das condições para obtenção dessas biomoléculas antes de determina-las, visando maior rendimento e purificação possível, além da manutenção das suas características.

As dificuldades do processo de extração de enzimas vegetais estão associadas à presença de uma rígida parede celular e de contaminantes, como compostos fenólicos e polissacarídeos (celulose, lignina e hemicelulose) que dificultam a solubilização dessas proteínas. Proteases, assim como outras biomoléculas, são purificadas por uma sequência de técnicas como a precipitação com sulfato de amônio, diálise, ultrafiltração, cromatografia. A aplicação sucessiva dessas técnicas dificulta o aumento na escala operacional, aumenta o custo do produto final em 60 a 90%, e nem sempre resultam em alto rendimento e podem comprometer a estabilidade da biomolécula (ASENJO; ANDREWS, 2011; LIMA e SANTANA, 2017; SILVA et al., 2017;).

O uso de sistemas aquosos bifásicos (SAB) tem se tornado uma alternativa eficiente para os métodos convencionais para a purificação de diversas biomoléculas como as proteases (YAVARI et al., 2013; WU et al., 2017), peptídeos (SOUZA JR. et al., 2014), lipase (RAMAKRISHNAN et al., 2016), e α -amilase (NASCIMENTO et al., 2018). Os SAB são formados a partir da mistura de dois compostos hidrossolúveis (dois polímeros, um polímero e um sal, polímero e líquido-iônico ou sal e álcool) e a separação de fases ocorre acima da concentração crítica dos componentes. A partição em SAB tem como principal vantagem a biocompatibilidade. Eles são formados majoritariamente por água o que reduz a probabilidade de desnaturação e assim mantem as propriedades biológicas da molécula de

interesse. Além disso, trata-se de uma técnica de simples operação e permite a integração de processos como clarificação e concentração. Outros aspectos relevantes quando comparados aos métodos convencionais são a alta seletividade, boa viabilidade econômica e menor tempo de operação (ASENJO e ANDREWS, 2011; SILVA et al., 2013; SAMPAIO et al., 2016). ()

Portanto, neste contexto, objetivou-se com esse trabalho otimizar as condições de extração de proteases de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) e pré-purificá-las em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (1500 ou 4000 g.mol⁻¹) + sal (fosfato de sódio) + água.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

As proteases, peptidases ou proteinases, formam um grupo de enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas nas proteínas, convertendo-as em suas menores unidades, os peptídeos e aminoácidos (FERNANDES, 2018; DAMODARAN et al. 2018). Elas podem ser encontradas em todos os organismos, como os eucariontes, procariontes, animais e plantas, e representam 2% do total de proteínas. Nos seres humanos possuem papel importante no que se refere às atividades regulatórias e nutricionais e nos tecidos vegetais participam de processos de germinação e senescência (CHINNADURAI et al., 2018).

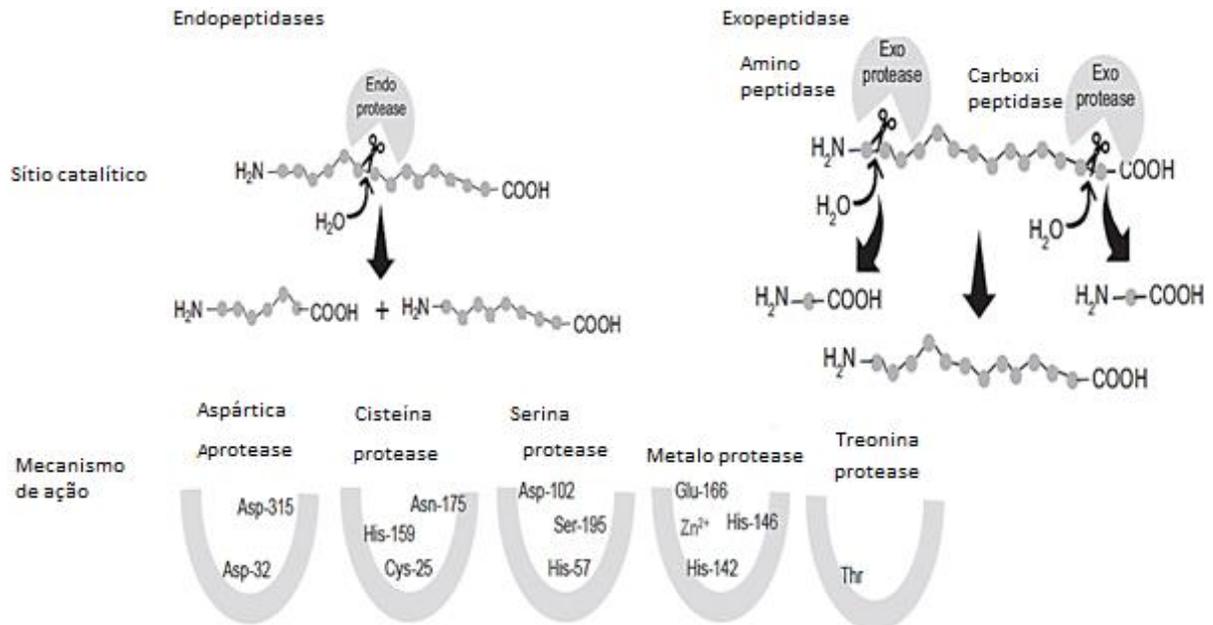
Convencionalmente, as proteases são classificadas de acordo a reação em que atuam e as propriedades químicas do substrato. Elas pertencem grupo das hidrolases (3), no qual são divididas em 4 subclasses. As exopeptidases atuam na extremidade da cadeia de polipeptídeos (E.C. No (3.4.11 -3.4.19)), e as endopeptidases clivam ligações no interior da cadeia (E.C. No (3.4.21-3.4.24, 3.4.99). As exopeptidases podem atuar de duas formas: as que atuam na região N-terminal da proteína são denominadas aminopeptidases, e as que atuam na região C-terminal são classificadas como carboxipeptidases. A ação dessas enzimas resulta na liberação de apenas um tipo de aminoácido (BON et al., 2008; GURUMALLESH et al. 2019).

As carboxipeptidases e endopeptidases ainda podem ser classificadas quanto à estrutura química presente no sítio ativo. Nesta classificação, as carboxiproteases são subdivididas em serina (EC 3.4.23), metalo (EC 3.4.17) e cisteína-carboxipeptidases (EC 3.4.18), e quanto as endopeptidases são divididas serina protease (EC 3.4.21), que possui um resíduo de serina no seu sítio ativo; cisteína protease (EC 3.4.22), apresenta um aminoácido cisteína no seu sitio ativo; a aspártica protease (EC 3.4.23) apresenta duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico; e as metaloprotease (EC 3.4.24), que possuem um íon metálico no seu mecanismo; treonina proteases (EC 3.4.25), que possuem um resíduo de treonina. As endopeptidases com mecanismo desconhecido são classificadas como EC 3.4.99 (GONZÁLEZ-RÁBADE et al. 2011; GURUMALLESH et al. 2019). O mecanismo de ação das diferentes classificações das proteases encontram-se na Figura 1.

As proteases desempenham um papel importante na indústria de biotecnologia, uma vez que a hidrólise pode alterar as propriedades químicas, físicas e imunológicas das proteínas. Elas correspondem a aproximadamente 25% das biomoléculas produzidas para fins industriais e 60% do comércio mundial de enzimas. Devido a sua versatilidade, são usadas principalmente na indústria farmacêutica, de detergentes, têxtil e de alimentos

(MEHRNOUSH et al., 2011; FERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2017; LI et al., 2018; FERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2017; SOARES et al., 2018).

Figura 1. Mecanismo de ação das endopeptidases e exopeptidases.



Fonte: FERNANDES et al., 2018.

Na indústria de alimentos, proteases são utilizadas em processos como tenderização de carnes, panificação, fabricação de bebidas e produção de hidrolisados proteicos. Uma das mais importantes aplicações das proteases é na indústria de laticínios na fabricação de queijos, como agente coagulante (KOBLOITZ 2010; AFSHARNEZHAD et al., 2019). As proteases de origem microbiana são usadas, preferencialmente, devido às questões econômicas, já que são facilmente produzidas em larga escala e em um curto espaço de tempo. Mudanças nas condições de fermentação podem proporcionar melhorias nas suas características e maior rendimento (KOBLOITZ et al., 2010; ALICI e ARABACI, 2018).

Apesar do uso das proteases de origem vegetal ainda ser limitado devido à restrições quanto a sua produção, como a pequena quantidade que pode ser extraída de uma grande massa de vegetal, elas possuem propriedades que são indispensáveis do ponto de vista industrial, como a estabilidade a uma ampla faixa de temperatura e pH, além de serem estáveis na presença de compostos orgânicos e aditivos (AMID et al. 2014; MUTHU et al. 2017; SALEHI et al. 2017; ALICI e ARABACI 2018)

Proteases vegetais, seja o extrato bruto ou a enzima purificada, já são usadas por um longo tempo em processos industriais (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). Proteases como

papaína, bromelina e ficina, são usadas na fabricação de cerveja, produção de hidrolisados proteicos para modificação de propriedades funcionais (solubilidade, capacidade espumante e emulsificante), na hidrólise do colágeno e de elastina, que auxiliam no amaciamento da carne (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011; RAWDKUEN et al., 2011; SUN et al. 2016). Extratos vegetais contendo quantidades elevadas de enzimas proteolíticas também vêm sendo usados na medicina tradicional a um longo tempo como antitumorais, no tratamento de câncer, desordens digestivas e distúrbios do sistema imunológico (PAVAN et al., 2012; CHINNADURAI et al., 2018).

Uma importante aplicação de proteases vegetais é como coagulante na fabricação de queijos. A maioria dessas enzimas pertencem ao grupo aspártico proteases, embora atividade coagulante já tenha sido identificada em cisteína e serina proteases (LI et al. 2018; PONTUAL et al. 2012; SALEHI et al. 2017). O uso dessas enzimas permite a obtenção de queijos com características sensoriais muito específicas, diferente das obtidas com coagulantes de origem animal e microbiana. Entretanto, a excessiva atividade proteolítica pode restringir sua aplicação devido a redução do rendimento e produção de sabor amargo no produto (LLORENTE et al., 2004; FEIJOO-SIOTA et al. 2018).

Embora a aplicação de proteases vegetais na indústria seja ampla, o potencial de produção de proteases a partir de uma determinada variedade de fruta ou vegetal ainda não foi totalmente explorado. Visando a obtenção de novas proteases de origem vegetal, a distribuição de proteases entre varias espécies de plantas deve ser detectada e estudada. Diversas famílias de plantas já foram investigadas como possíveis alternativas a extração de proteases, as quais se incluem *Solanum elaeagnifolium*, *Albizia lebbek*, *Helianthus annuus* e *Zingiber officinale* (SHARMA et al., 2017; FEIJOO-SIOTA, et al., 2018). Outras fontes de proteases vegetais encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Fontes e tipos de proteases vegetais

Fonte	Tipo de Protease	Referência
<i>Morrenia brachystephana</i> Griseb.	Cisteína	ARRILBÉRE et al. 1998
<i>Streblus asper</i>	Serina	MEHRNOUSH et al. 2011
<i>Moringa oleifera</i>	Aspártica	PONTUAL et al. 2012
<i>Artocarpus heterophyllus</i> latex	Serina	SIRITAPETAWEWE et al. 2012
<i>Camellia sinensis</i>	Serina	CHEN et al. 2016
Orange <i>Citrus aurantium</i> L.	Aspártica	MAZORRA-MANZANO et al. 2013
<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Serina	AMID et al., 2014
<i>Cissus quadrangularis</i> L.	Cisteína	SAKTHIVEL et al. 2017
<i>Vallaris solanacea</i>	Cisteína	SOMAVARAPU et al., 2018

Fonte: Próprio autor (2020).

2.2 ORA-PRÓ-NÓBIS

A *Pereskia aculeata* Miller pertence à família das cactáceas. As plantas pertencentes a essa família têm como característica caules finos, sublenhosos com ramos que podem atingir até 10m de altura, e com poucos espinhos no caule e a presença de flores terminais solitárias (SANTOS et al., 2012). No Brasil, essa planta também é popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, lobrobrô, groselha das Américas, rosa-madeira, jumbeba e trepadeira limão.

Figura 2. Arbusto de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller)



A ora-pro-nóbis é originária de regiões temperadas e tropicais da América Central e do Sul. Também pode ser encontrada em regiões tropicais de países como Índia, Austrália e África do Sul. No Brasil a ora-pro-nóbis é distribuída nas regiões nordeste (Bahia) ao sudeste e sul do país (Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Em Minas Gerais, seu consumo está associado ao turismo gastronômico (KINUPP, 2006; LIMA JUNIOR et al., 2013).

Sob o aspecto nutricional, as folhas de ora-pro-nóbis se destacam pelo alto teor de proteínas, fibras e minerais. Além disso, as folhas de ora-pro-nóbis são de baixa toxicidade e apresentam alto conteúdo mucilaginoso, o que permite a sua aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica (ALMEIDA-FILHO; CAMBRAIA, 1974; SILVA et al., 2019).

As folhas de ora-pro-nóbis são ricas em proteínas de alto valor biológico, podendo seu conteúdo variar de 15 a 28% (base seca), superior ao encontrado em outros vegetais comumente usados na alimentação humana como couve (1,3%), milho (7,5%) e alface (1,3%). As proteínas encontradas na ora-pro-nóbis são de alta digestibilidade (85%) e apresentam alto conteúdo de aminoácidos essenciais, associado principalmente a lisina que constitui 5-6% do teor total de proteína encontrado (MERCÊ et al., 2001; CONCEIÇÃO et al., 2014). As quantidades de proteína e aminoácidos relatados são superiores a mínima recomendada pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) para um indivíduo adulto (TAKEITI et al., 2009; MARTIN et al., 2017).

Em estudos realizados por Almeida et al. (2014) em folhas desidratadas de ora-pro-nóbis, a quantidade de fibras insolúvel e solúvel encontradas foram equivalentes a 19,17% e 2,43%, o respectivamente. A concentração de lipídeos encontrada foi em torno de 5,07%. O

baixo teor de lipídeos permite com que essa hortaliça seja usada na alimentação de indivíduos que precisam de uma dieta hipolítica. Também foi relatado a presença de elevados níveis de minerais como cálcio (1.346, 67 mg/100g), fósforo (320 mg/100g) e ferro (20,56 mg/100g).

Estudos realizados por Morais et al. (2019), Pinto e Scio (2014) e Souza et al. (2016) evidenciam a presença de compostos bioativos nas folhas de ora-pro-nóbis, que lhe conferem atividade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral. Também não foi verificado por Pinto et al. (2012) nenhuma citotoxicidade em células normais. A presença de conteúdo mucilaginoso permite sua aplicação na indústria de alimentos como agente emulsificante e estabilizante (LIMA JUNIOR et al., 2013), e também seu uso na medicina como emoliente no tratamento de processos inflamatórios (PINTO et al., 2015).

Mesmo com o importante papel na alimentação humana e o crescente interesse por parte da indústria de alimentos e farmacêutica, seu cultivo não está organizado como uma cultura agrícola, estando desprovida de um pacote tecnológico para sua produção e cultivada de forma rudimentar por apenas parte da população de certas localidades do país. Isso faz com que a ora-pro-nóbis seja classificada como uma hortaliça não convencional (KINUPP, 2006). Ainda com relação ao seu cultivo, é uma planta rústica como toda cactácea, caracterizada pela resistência à ausência de água e adaptação ao clima quente (ALMEIDA e CORRÊA, 2012).

2.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS DO TECIDO VEGETAL

A produção em escala industrial de enzimas e de outras biomoléculas depende diretamente das etapas de extração e purificação. Atualmente, estes processos correspondem até 60% do custo total da produção. Ao final do processo nem sempre é possível obter alto rendimento, além de ser comum modificações na estrutura da biomolécula, o que pode resultar na perda de atividade. Sendo assim, estudos direcionados a elaboração de um protocolo de extração e purificação economicamente viável para obtenção de enzimas é de grande interesse nos campos acadêmicos e industrial.

a. Extração

Partes da planta, como as folhas, são uma grande fonte de proteínas para indústria alimentícia embora sua aplicação seja limitada pela dificuldade de extração. As restrições a este tipo de fonte proteica ocorrem devido a presença de uma rígida parede celular que exige condições mais drásticas para o seu rompimento. Deve-se considerar também a presença de compostos como os polifenóis e polissacarídeos (celulose, lignina e hemicelulose) que se

encontram ligados a proteína, aumentando assim a sua hidrofobicidade (CUTLER, 2004; ZHANG et al., 2015; LIMA e SANTANA, 2017).

O índice de recuperação de proteínas deste tipo de material pode variar de 15 a 60% (ZHANG et al., 2014; CUTLER, 2004), embora os resultados possam ser muito inferiores, como os obtidos por Ghaly et al. (2010) ao avaliar a recuperação de proteínas da folha de abóbora (11,75%), batata do doce (7,85%) e repolho (5,60%). Vários procedimentos podem ser adotados para extração/solubilização, os quais podem ser divididos em físicos ou químicos.

- **Métodos físicos para extração de enzimas**

Os métodos físicos podem ser efetuados em uma sequência de técnicas que levam a diferentes graus de ruptura. Esse método engloba desde técnicas simples como a maceração, à novas técnicas como a extração por micro-ondas e ultrassom. A maceração consiste no uso de homogeneizador composto por um pistão que é inserido em um tubo de vidro muito próximo da parede deste. O rompimento da membrana ocorre pelo processo de fricção do tecido, obrigando as células a passarem pelo espaço entre o pistão e o vidro. Esta técnica pode ser aplicada em temperatura ambiente, a 4°C ou com nitrogênio líquido (LIMA e SANTANA, 2017).

A extração assistida por ultrassom se baseia no fenômeno de cavitação que se origina na criação, aumento e implosão de bolhas no meio, que geram efeitos de descamação superficial, degradação de partículas da parede celular, causando maior extração. Para o uso desta técnica é importante considerar o tempo de extração. Estudos realizados por Pradal et al. (2016) indicam que o ultrassom tem forte influência nos primeiros 30 minutos de extração e após esse período ocorre decréscimo na recuperação de biomoléculas, devido a sua decomposição.

Para o rompimento da parede celular, também, pode ser considerado o choque térmico, procedimento no qual as células são rompidas por variações bruscas de temperatura por meio de ciclos de congelamento e descongelamento (CUTLER, 2004; LIMA e SANTANA, 2017).

- **Métodos químicos para a extração de enzimas**

A solubilização das proteínas, geralmente, é feita com solução salina, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Soluções utilizadas na extração de proteases de origem vegetal

Fonte	Tipo de solução	Referência
<i>Cynara scolymus</i>	Tampão fosfato de Potássio 0,1M pH 6,0	LLORENTE et al., 2004
<i>Citrus aurantium L.</i>	Tampão Tris-HCl 0,02M pH 7,2	MAZORRA-MAZANO et al., 2013
<i>Ficus johannis</i>	Tampão fosfato de sódio 0,2M pH7,0	AFSHARNEZHAD et al, 2019
<i>Pyrus pyrifolia</i>	Tampão fosfato de sódio 0,05M pH6,5+Cisteína 0,01M	NAM et al., 2016
<i>Calotropis procera</i>	Tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,0	CHAIWUT et al., 2010
<i>Fragaria ananassa</i>	Tampão fosfato 0,1M pH 6,0	ALICI et al., 2018
<i>Mangifera Indica Cv.</i> <i>Chokanan</i>	Tampão fosfato de sódio pH 7,5	AMID et al., 2011

Fonte: Próprio autor (2020).

Os sais podem afetar a solubilidade da proteína de duas formas diferentes. A adição de sal em baixas concentrações favorece a solubilidade devido à interação preferencial entre íon e proteína o que resulta no aumento da carga líquida na superfície da proteína, sendo este efeito chamado de *salting in*. Com o aumento da concentração do sal, as moléculas de solvente passam a interagir mais com o íon. Com esta interação ocorre a redução na camada de solvatação das proteínas favorecendo as interações hidrofóbicas entre elas e consequentemente, redução da solubilidade (*salting out*) (DAMODARAN et al., 2018).

Embora alguns sais, como NaCl e KCl aumentem a solubilidade de proteínas (GERZHOVA et al., 2016; FETZER et al., 2018). Alguns podem afetar negativamente a atividade enzimática das mesmas. Sais de fosfato, por exemplo, podem inibir a atividade de kinases, uréases, mas podem aumentar a atividade de proteases (ZHAO, 2005). Chaurasiya et

al. (2013) avaliaram diferentes tipos de sal usados na extração de bromelina e observaram que o tampão fosfato de potássio extraiu maior quantidade de proteína, embora o melhor resultado de atividade enzimática foi alcançado quando usado tampão fosfato de sódio.

Em relação ao valor de pH, maior extração pode ser obtida pelo aumento do pH por meio da adição de agentes álcalis (ZHANG et al., 2014;ZHANG et al., 2015), que destroem a parede celular o que permite que maior quantidade de proteína seja liberada. Além disso, em pH alcalino a solubilização de proteínas vegetais é favorecida, uma vez que em valores extremos de pH o excesso de cargas de mesmo sinal provoca a repulsão entre as moléculas e consequentemente, aumentam a solubilidade. Entretanto, a forte repulsão eletrostática causada pela alta carga líquida resulta na expansão e no desdobramento e desnaturação da molécula de proteína. O desdobramento costuma ser maior em valores extremos de pH alcalino do que em valores extremos de pH ácido. Esse comportamento é atribuído á ionização dos grupos fenólicos, carboxílicos e sulfidrila, parcialmente inseridos, que leva a cadeia peptídica desenovelar-se á medida que eles tentam se expor ao ambiente aquoso (DASHEK e HARRISON, 2006; DAMODARAN et al., 2018).

À solução de extração também podem ser adicionados agentes caotrópicos, como ureia, que aumentam a solubilidade de substâncias apolares na água, rompendo interações hidrofóbicas responsáveis pela estabilidade da proteína, além de detergentes, como SDS, Triton X-100, Tween 20, que possuem a capacidade de solubilizar lipídeos da membrana e extrair proteínas integrantes da parede (CUTLER, 2004; AZRI et al., 2011;WIJESEKARA et al., 2017).

b. Precipitação por sais e por solventes orgânicos

A precipitação de proteínas com sais e solventes orgânicos é feita com o objetivo de concentrar e remover contaminantes não proteicos. De maneira geral, a solubilidade das enzimas depende da distribuição de grupos ionizáveis, zonas hidrofóbicas e hidrofílicas na superfície da molécula que são responsáveis por interações polares com o solvente aquoso, interações iônicas com os sais, e pela repulsão eletrostática entre as moléculas. O controle desses fatores permite maximizar a separação e recuperação de uma enzima (DAMODARAN et al., 2018).

A adição de sais como sulfato de amônio e cloreto de sódio em altas concentrações, de 1,5 a 3,0M, reduz a disponibilidade de água devido à hidratação preferencial dos íons e evita a solvatação da enzima. A concentração de sal necessária é dada pelo número e distribuição de

cargas, grupos ionizáveis, grupos polares não iônicos e de resíduos hidrofóbicos presentes na superfície da enzima (BOM et al., 2008).

Purwanto (2016) observou a redução da atividade específica e da recuperação quando adicionada a etapa de fracionamento com sulfato de amônio (60%) antes da cromatografia de troca iônica. Salehi et al. (2017) usaram diferentes concentrações de sulfato de amônio (20%-80%) para precipitação de proteases de *Withania coagulan*. O maior valor de atividade coagulante e proteolítica foi encontrado quando usado com concentrações de 20-50% de sulfato de amônio.

Zhang et al. (2017) avaliaram o desempenho da precipitação isoeletrica e da realizada com sulfato de amônio para obtenção de proteína da batata. Mais frações proteicas foram encontradas quando utilizada a precipitação isoeletrica, embora o teor de contaminantes dos concentrados proteicos precipitados com sulfato de amônio tenha sido 2,5 vezes menor.

A redução da solubilidade pela adição de solventes orgânicos como álcoois e acetona se deve a redução da constante dielétrica do meio que reduz a interação água-proteína e favorece as interações eletrostáticas intramoleculares. A precipitação dependerá do balanço das forças atrativas e repulsivas. A interação entre solvente-enzima pode causar desnaturação irreversível devido ao seu efeito sobre as interações que estabilizam as proteínas. As cadeias laterais são solubilizadas pelo solvente que também enfraquece as interações hidrofóbicas. Esse efeito pode ser minimizado por baixas temperaturas (BOM et al., 2008; DAMODARAN et al., 2010).

Soares et al. (2012) avaliaram o efeito da concentração de etanol na purificação de bromelina de resíduos do abacaxi. Foi observado que 30 % (v/v) de etanol não foi suficiente para precipitação da enzima, embora boa parte das proteínas contaminantes tenham sido precipitadas. O maior fator de purificação (2,28) foi alcançado com concentrações de 30 a 70% de etanol. Nessas condições, o índice de recuperação da atividade enzimática foi de 98,60%.

Chaurasiya et al. (2013) compararam o desempenho da precipitação com sulfato de amônio e com acetona na purificação de bromelina do abacaxi. Máximo índice de recuperação da atividade enzimática (85,97%) e fator de purificação (4,9) foram alcançados com precipitação com acetona (80%).

Ao comparar a precipitação com sulfato de amônio e com etanol para obtenção de proteínas de batata, Waglay et al., (2014) relatam que com o aumento na concentração de etanol até 20% foi possível obter 55,2% de recuperação e purificação de 3,79. O aumento da concentração de etanol para 30% reduziu a recuperação e purificação para 15% e 1,19, respectivamente. Foi observado o aumento na recuperação de proteína (70-98%) com o

aumento da concentração de sulfato de amônio (40-60%), embora tenha sido observado pequenas alterações no fator de purificação (2,99-3,31).

c. Extração líquido-líquido: sistemas aquosos bifásicos

Na extração líquido-líquido, processo comumente aplicado para obtenção de compostos oriundos de inúmeros processos tecnológicos, a separação do composto ocorre por meio do fluxo de massa dos solutos entre as fases formadas a partir do contato da mistura com um líquido imiscível ou parcialmente imiscível, o solvente (SILVA e LOH, 2006). Porém, a aplicação da extração líquido-líquido para obtenção de compostos de importância biotecnológica (proteínas, enzimas, vírus, entre outros) muitas vezes não é viável, uma vez que a maioria dos solventes utilizados são orgânicos e a eventual concentração do composto na fase orgânica pode levar à perda da sua estabilidade (SINHA, et al., 2000).

Nesse contexto a partição utilizando sistemas aquosos bifásicos é de interesse considerável na obtenção de produtos biológicos como proteínas, enzimas material genético, células entre outros, devido, principalmente, a sua biocompatibilidade (ASENJO e ANDREWS, 2011). A baixa tensão interfacial e maior concentração de água nas fases reduz a probabilidade de desnaturação, garantido assim a sua funcionalidade. Além disso, a partição em SAB também apresenta vantagens como a operação contínua, facilidade de integração entre processos de clarificação e purificação, o que pode, conseqüentemente, conduzir a melhoras no rendimento e redução no custo final do processo (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

Os SAB podem ser formados a partir da mistura de soluções aquosas de dois polímeros, um polímero e um sal (orgânico ou inorgânico), um solvente orgânico e um sal, ou ainda líquido iônico e sal inorgânico. Esta formação está atrelada à imiscibilidade entre soluções de seus constituintes e da quantidade das interações intermoleculares entre estes componentes do sistema. Portanto, a mistura dessas soluções leva à formação de duas fases com diferentes composições, e em equilíbrio termodinâmico, de forma que o composto de interesse se distribuirá entre fases, conforme a sua afinidade com cada uma delas (SILVA e LOH, 2006; ASENJO e ANDREWS, 2011).

Os sistemas aquosos bifásicos mais estudados são o formados por PEG-dextrana e PEG-sal. Entretanto a dextrana é de custo elevado o que inviabiliza seu uso em larga escala. Como alternativa, os sistemas formados por PEG e sal tem sido empregados na purificação de biomoléculas (ASENJO e ANDREWS, 2011; ALCÂNTARA et al., 2013; CARVALHO et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018). Sistemas aquosos bifásicos do tipo PEG-sal apresentam vantagens como alta seletividade, baixa viscosidade e rápida separação de fases.

Sua limitação mais relevante está associada a desnaturação de biomoléculas que ocorre em altas concentrações de sais (SILVA e LOH, 2006)

Portanto, a aplicação eficiente de SAB para a separação e purificação de biomoléculas está correlacionada com as propriedades das moléculas (hidrofobicidade, peso molecular, carga, conformação) e com as propriedades dos constituintes que formam os SAB (massa molar do polímero, pH, presença de ligantes ao longo da cadeia do PEG). Estas propriedades envolvem parâmetros físico-químicos além do econômico.

- ***Componentes do sistema***

Dentre os SAB utilizados na partição de proteínas, os formados por polímeros, principalmente PEG, sal (fosfato) e água tem sido recorrentemente estudados (BARBOSA et al., 2011; DIEDERICH et al., 2013; RAMAKRISHNAN et al., 2016; SILVA et al., 2013; WANDERLEY et al., 2017).

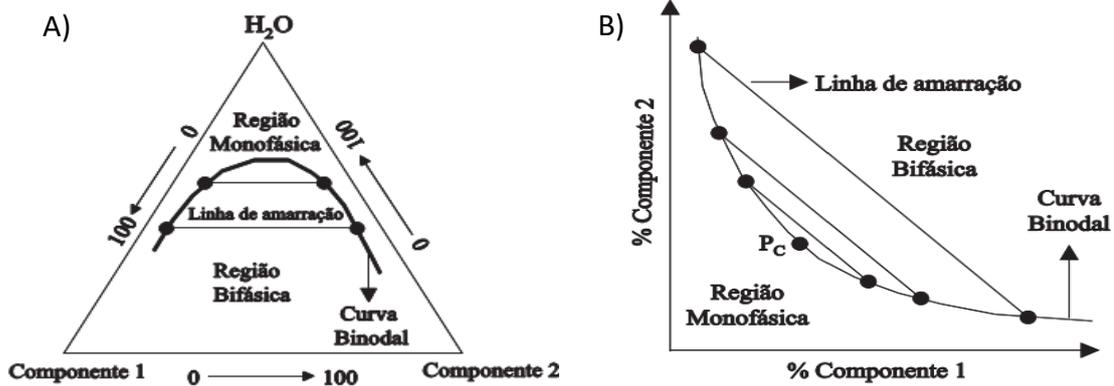
O polietilenoglicol (PEG) é um polímero de oxido de eteno, de fórmula geral $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$. A cadeia hidrofílica de polioxietileno forma polímeros higroscópicos e solúveis em água, além disso, seus grupos terminais (hidroxilas) são normalmente usados em ligações por afinidade com outros compostos. A variação da massa molecular permite a obtenção de produtos líquidos ou na forma de pó, com ampla faixa de viscosidade. Este polímero é ambientalmente seguro por ser biodegradável (LI, 2001).

Os sais de fosfato de sódio são sais inorgânicos obtidos a partir do ácido fosfórico e do hidróxido de sódio. Podem ser encontrados na forma de cristais incolores ou pó branco. O fosfato de sódio é utilizado no tampão fosfato salino (PBS), usado em procedimentos que incluem recuperação e manipulação de células, proteínas e enzimas. É comumente usado na indústria de alimentos como regulador de pH, estabilizante e suplemento mineral.

- **Diagrama de fases**

Os diagramas de fases de um SAB, que podem ser apresentados na forma triangular ou retangular (Figura 3), são utilizados para expressar a concentração dos constituintes do sistema, presentes em cada fase, nas quais ocorre a separação de fases. A região monofásica, no diagrama de fases, é separada da região bifásica pela chamada curva binodal. No ponto crítico P_c as duas fases possuem a mesma composição, e o coeficiente de participação da biomolécula é igual a 1 (ASENJO; ANDREWS, 2011).

Figura 3. Diagrama de fases expresso em coordenadas triangular (A) e retangular (B).



Fonte: SILVA e LOH, 2006

Os diagramas também contêm as linhas de amarração que unem as composições das fases no equilíbrio. Os pontos presentes em uma mesma linha de amarração possuem propriedades intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, entre outros) e propriedades extensivas (massa, volume, etc.) diferentes. O comprimento da linha de amarração (CLA) é um parâmetro que expressa a diferença entre as propriedades dos sistemas, e pode ser associado à sua seletividade. Quanto maior o comprimento da linha de amarração, maior a diferença entre as composições das fases, este fato pode favorecer as interações intermoleculares específicas entre os componentes das fases e o componente de interesse, levando a eficiência na partição do soluto. O CLA pode ser obtido a partir das concentrações dos componentes do sistema, conforme a Equação (1) (SILVA e LOH, 2006; MAGESTE et al., 2009).

$$CLA = \sqrt{(\Delta C_1)^2 + (\Delta C_2)^2} \quad (1)$$

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

Outra medida utilizada na caracterização dos SAB é a inclinação da linha de amarração (Equação 2). A ILA fornece uma medida de como a composição das fases podem variar com mudanças das propriedades físico-químicas, como temperatura, massa molar do polímero (SILVA; LOH, 2006; MAGESTE et al., 2009).

$$ILA = \frac{C_{2S} - C_{2I}}{C_{1S} - C_{1I}} \quad (2)$$

Onde, C_{1S} e C_{1I} são as concentrações do componente 1 na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto, C_{2S} e C_{2I} são as concentrações do componente 2 na fase superior e inferior, respectivamente.

- **Processo de partição em SAB**

A distribuição do composto de interesse nas fases é caracterizada pelo coeficiente de partição (K) (Equação 3). O coeficiente de partição é obtido a partir da razão entre a concentração do composto na fase superior e inferior (ALBERTSSON, 1986).

$$K = \frac{C_S}{C_I} \quad (3)$$

Onde C_S e C_I são a concentração da biomolécula na fase superior e na fase inferior, respectivamente.

Quando a molécula de interesse é uma enzima, é possível obter a seletividade (Equação 4) do sistema através da relação entre o coeficiente de partição de atividade enzimática (K_e), obtido pela razão entre a atividade enzimática na fase superior e inferior, e o coeficiente de partição de proteína (K_p). Este parâmetro indica o quanto foi possível separar a enzima de interesse das demais em uma das fases

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (4)$$

O fator de purificação indica quantas vezes foi possível purificar o extrato na fase para onde foi particionado no sistema estudado. O fator de purificação é obtido a partir da Equação 5 .

$$PF = \frac{AE}{AE_i} \quad (5)$$

Onde AE é atividade específica da protease na fase e AE_i é a atividade específica do extrato bruto.

O índice de recuperação teórica (Y%) estima quanto foi possível recuperar da atividade enzimática na fase para onde foi particionada, como demonstrado na Equação 6.

$$Y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_e)} \quad (6)$$

Sendo R à razão entre os volumes da fase superior e inferior e K_e o coeficiente de partição de atividade da protease.

Várias propriedades físico-químicas da biomolécula e o sistema influenciam a partição de uma biomolécula. As propriedades mais importantes associadas a biomolécula são a hidrofobicidade, tamanho, concentração, conformação e carga superficial. As propriedades associadas ao sistema envolvem a natureza química dos constituintes do sistema, a massa molar e concentração do polímero presença de ligantes na cadeia polimérica, pH (ASENJO e ANDREWS, 2011; SILVA e LOH, 2006; CHAIWUT et al., 2010).

A massa molar do polímero influencia na partição por alterações provocadas no diagrama de fases. Segundo Albertsson (1960), quanto maior a massa molar do polímero menor será a concentração de sal (ou do outro componente constituinte do sistema) requerida para a separação de fases. Este comportamento pode ser observado tanto para sistemas polímero-polímero-água assim como para sistemas polímero-sal-água. O mesmo comportamento foi observado por Sampaio et al., (2016) ao estudar sistemas formados por PEG+ sulfato de sódio. Sosa et al. (2017) obtiveram mesmo resultado ao avaliar sistemas formados por PEG 4000 e 6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ + sulfato de magnésio.

Portanto, o aumento da massa molar do polímero pode diminuir a partição da molécula de interesse para a fase polimérica. Quanto maior a massa molar do polímero menor quantidade de solvente disponível para solvatação de outras moléculas. A redução da solubilidade da proteína na fase rica em polímero reduz o coeficiente de partição. Entretanto, a modificação de outros parâmetros do sistema pode ser alterada visando favorecer a partição da molécula para a fase polimérica, como por exemplo a adição de ligantes (moléculas químicas ou biológicas) a cadeia do PEG que interagem especificamente com a molécula de interesse (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

A interação favorável entre PEG e a enzima diminui com aumento da massa molar ou concentração de PEG devido a redução de espaços intersticiais na fase superior ocasionando a perda de solubilidade da biomolécula e sua expulsão para a fase oposta, em um processo chamado de volume de exclusão. O efeito da massa molar do polímero também depende da

massa molar da biomolécula, uma vez que proteínas com maior peso molecular são mais influenciadas por essas mudanças do que proteínas de baixo peso molecular (ALBERTSSON, 1986; LIMA e SANTANA, 2017).

Estudos da partição da protease extraída do látex de *Calotropis procera* por Rawdkuen et al. (2011) em sistemas formados por PEG/MgSO₄ mostraram a redução do coeficiente de partição da enzima com o aumento da massa molar do PEG de 1000 para 3000 g.mol⁻¹, e como consequência a enzima foi particionada para a fase inferior. A redução do coeficiente de partição da enzima com o aumento da massa molar do PEG também foi observado por Ketnawa et al. (2011) ao estudar a partição da bromelina em sistemas formados por PEG/MgSO₄.

Com relação ao efeito do pH na partição de proteínas, este altera as cargas da superfície da proteína e produz alterações conformacionais na sua estrutura e afetando, consequentemente, o coeficiente de partição. Nascimento et al. (2018) observaram que o aumento do pH diminuiu as concentrações necessárias de PEG e sal em sistemas formados por PEG 1500 g.mol⁻¹+ citrato de sódio/ácido cítrico nos valores de pH 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0. No mesmo trabalho também foi avaliada a influência do pH no coeficiente de partição da α -amilase. Em valores de pH 4,0 e 5,0 a enzima apresentou uma forte tendência para a partição na fase polimérica, enquanto que em pH 5,0 os coeficientes de partição foram menores que um, indicando a tendência para a migração para a fase salina.

Assim como o pH, mudanças na temperatura provocam mudanças na estrutura da enzima, além de afetarem a composição das fases em equilíbrio, podendo variar de acordo o tipo de sistema. Para sistemas formados por PEG-sal, o aumento da temperatura favorece a formação de fase. O aumento da temperatura reduz a solubilidade do PEG e consequentemente a sua entropia conformacional. Consequentemente há menor interação dele com os outros constituintes do sistema. Também foi observado que o aumento da temperatura, para o mesmo tipo de sistema aumenta a concentração de PEG na fase superior. Com o aumento da temperatura há também o aumento da hidrofobicidade da cadeia polimérica, levando a exclusão de água para a fase mais hidrofílica. Porém, para sistemas formados por dois tipos de polímeros, efeito contrário pode ser observado, ou seja, maior é quantidade de polímero necessário para a formação de fases (ZASLAVSKY, 1995).

Regupathi et al., 2011 trabalhando com sistemas formados por PEG + citrato de amônio+ água verificaram que a quantidade de sal necessária para a formação de fase diminuiu com o aumento da temperatura. Gandolfi (2016) estudando o efeito da temperatura em sistemas formados por PEG-líquido iônico, observou que em temperaturas mais baixas a formação de duas fases é favorecida.

- **Aplicação de sistemas aquosos bifásicos na purificação de biomoléculas**

Os SAB vem sendo aplicado na purificação de diversas biomoléculas pois permitem a manutenção da atividade biológica. É possível encontrar diversos trabalhos que evidenciam o potencial de aplicação dos sistemas aquosos na separação de proteínas e que permitem identificar os sistemas adequados para biomoléculas específicas. Algumas aplicações dos sistemas aquosos bifásicos na partição de outras biomoléculas estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3. Sistemas aquosos bifásicos usados na separação de biomoléculas.

Biomolécula	SAB	K, Y e F.P.*	Referência
Celulase de <i>Bacillus velezensis</i> A4	PEG (1500, 4000, 6000 g.mol ⁻¹) + fosfato de potássio em pH 6,0; 7,0 e 8,0	0,741; Y= 67,8% e F.P. = 1,14 em sistemas formados por PEG 4000 g/mol + fosfato em pH 8,5.	Liu 2019
α-amilase	PEG (1500 g.mol ⁻¹) + citrato de sódio em pH 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0	K= 14,684 e Y= 95,373 % em pH 7,0	NASCIMENTO et al., 2018
Lipase	PEG (1500, 4000, 6000, 20000 g.mol ⁻¹) + fosfato de sódio em pH 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0	Ke = 0,02; Y = 98,5% e F.P. = 3,59 em sistemas formados por PEG 6000 + fosfato de sódio em pH 9,0	NANDINI e RASTOGI, 2011
Colagenase de <i>Penicillium aurantiogriseum</i>	PEG (550, 1500 e 4000 g.mol ⁻¹) + fosfato de potássio em pH 6,0	Ke = 1,01; Y = 242,0 e F.P. = 23,5 em SAB formados por PEG 555 g/mol	ROSSO et al., 2012
Protease de <i>Bacillus licheniformis</i>	PEG (1500 e 1000 g.mol ⁻¹) + fosfato de potássio em pH 7,5; 9,0 40,5+ NaCl	Ke = 5,4; Y= 93,3 e F.P. = 1,42 em SAB formados por PEG 10000 em pH 10,5	YAVARI et al., 2013
α- lactoalbumina e β- lactoglobulina	PEG (2000 g.mol ⁻¹) + fosfato de potássio	K _{α} = 7.8 e K _{β} = 0.02.	ALCÂNTARA et al., 2013

* Coeficiente de partição (K), recuperação (Y) e fator de purificação (F.P.)

González-González et al. (2011) estudaram o comportamento da partição de duas proteínas, a albumina soro bovina (BSA) e a ribonuclease (RNase) em sistemas formados por PEG 400, 2000 g.mol⁻¹ e fosfato de sódio. González-Mora et al. (2017) avaliaram o efeito de sistemas formados por PEG-fosfato de sódio e fosfato de potássio e líquido iônico-fosfato de potássio na recuperação de bacteriófagos de salmonela. Os autores relatam que o aumento da massa molar favorece a partição da molécula para a fase inferior, com um índice de recuperação de 60-90% na fase salina.

Chaiwut et al. (2010) estudaram a aplicação de SAB do tipo PEG/sal na separação de protease do látex de *Calotropis procera*. Os sistemas eram formados por PEG 4000, 6000 e 8000 g.mol⁻¹ e citrato de sódio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio, e sulfato de amônio. A maior recuperação da enzima foi obtida na fase rica em PEG nos sistemas formados por 12% PEG 4000–17% MgSO₄. Os autores também avaliaram a concentração de NaCl e pH. Os melhores resultados foram obtidos em pH neutro, e a adição de NaCl em 6,0% aumentou o recuperação em 107%.

Nam et al. (2016) avaliaram quatro técnicas para purificação cisteína proteases de pera (*Pyrus pyrifolia*). Sistemas formados por 15% de PEG 1000-20% MgSO₄ e cromatografia DEAE+MoNo Q mostraram-se eficientes na purificação de proteases, com recuperação de atividade de 91,83 e 98%, respectivamente.

A partição de proteases de *Aspergillus tamarisii* URM4634 em sistemas PEG+citrato foi estudada por Silva et al. (2017). Foram avaliados parâmetros como a massa molar do polímero, a concentração de sal e pH. Os autores verificaram que o aumento na concentração de sal, massa molar e do pH resultaram em efeitos positivos na recuperação da enzima para a fase rica em PEG. A melhor condição para o fator de purificação (3,95) foi obtida usando PEG 8000 g.mol⁻¹, 20% de citrato de sódio em pH 8,0.

Wu e colaboradores (2017) avaliaram o efeito da massa molar do PEG (4000, 6000, e 8000 g.mol⁻¹) e do tipo de sal (citrato de sódio e fosfato de potássio) na partição de bromelina. Verificou-se que os melhores resultados obtidos em termos de fator de purificação (7,0) e recuperação (54,5%) foi obtido em sistemas formados por PEG 4000 e fosfato de potássio.

Souza Jr. et al. (2014) estudaram a recuperação de hidrolisados da caseína em SAB formados por PEG 1500 g.mol⁻¹ e fosfato de sódio ou fosfato de potássio. Em termos de coeficiente de partição (266) e de recuperação (99,6), os sistemas formados por PEG e fosfato de potássio se mostraram mais eficientes na obtenção dos peptídeos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições de extração de protease de ora-pro-nóbis e purificá-la em sistemas aquosos bifásicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição físico-química das folhas de ora-pro-nóbis;
- Avaliar o efeito do pH na extração das proteínas;
- Avaliar o efeito de diferentes soluções na extração de proteínas de ora-pro-nóbis;
- Avaliar o efeito do tempo e da razão na extração por meio de um esquema fatorial em função das variáveis tempo (min) e razão solução extratora/soluto (mL.g^{-1});
- Determinar dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1500 e 4000 g.mol^{-1} fosfato de sódio e determinar os parâmetros de partição das proteases.

4. METODOLOGIA

Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Itapetinga - Bahia.

a. Materiais utilizados

Para realização deste trabalho foram utilizados albumina do soro bovino (BSA) com grau de pureza 98% (CAS: 232-936-2), tirosina com grau de pureza 98% (CAS:60-18-4) e o azul brilhante de Coomassie G-250 (CAS: 6104-58-1) com grau de pureza > 80%, adquiridos da Sigma Aldrich Brasil. Os demais reagentes utilizados estão descritos ao longo da metodologia e todos possuíam grau analítico PA-ACS. Para extração de proteases foram utilizadas folhas de ora-pro-nóbis, adquiridas em uma propriedade particular no município de Itapetinga-Ba.

b. Caracterização físico-química das folhas de ora-pro-nóbis

Antes que fossem realizadas as análises de caracterização físico-química e os estudos de extração e purificação as folhas de ora-pro-nóbis foram lavadas em água corrente e pré-selecionadas, sendo eliminadas folhas injuriadas, queimadas ou atacadas por insetos. Em seguida, as folhas foram secas em estufa de ventilação forçada (SOLAB, SL-102) a 50°C por 24h e trituradas em moinho de facas e peneiradas até uma granulometria de 40 mesh.

- **Umidade**

A determinação de umidade foi realizada por método gravimétrico em estufa na temperatura de 105°C, até peso constante, conforme os métodos da AOAC (2010). O cadinho contendo a amostra foi colocado em estufa a 105°C (Tecnal, modelo te-393) por 24 h após este período, as amostras foram retiradas e colocadas em dessecador e pesadas. O peso foi verificado até não ocorrer variação.

O teor de umidade foi calculado pela equação abaixo

$$\%Umidade = \frac{\text{massa de amostra seca (g)}}{\text{massa total da amostra (g)}} \times 100 \quad (7)$$

- **Cinzas**

A quantificação do teor de cinzas foi feita por método gravimétrico em forno mufla a 525 °C até a incineração total da amostra, indicada pelo aparecimento de cinzas brancas como descrito na AOAC (2010).

$$\% \text{Cinzas} = \frac{\text{massa de cinzas (g)}}{\text{massa total da amostra (g)}} \times 100 \quad (8)$$

- **Proteínas totais**

O teor de proteína total foi determinado pelo método de Semi-micro Kjeldahl, que determina a quantidade de nitrogênio da amostra seca, conforme a AOAC (2010). O fator de conversão nitrogênio/proteína foi de 6,25.

$$(\%) \text{ Proteínas totais} = \frac{V \times N \times 0,014 \times FC}{M} \times 6,25 * 100 \quad (9)$$

Onde V: volume de HCl gasto na titulação, N: normalidade da solução de HCl, M: massa da amostra.

- **Lipídeos totais**

Os lipídeos totais foram quantificados conforme metodologia proposta por Bligh; Dyer (1959). Foram pesadas 5,0g de amostra e acrescentado 10 mL de clorofórmio, 20mL de etanol e 8mL de água (1:2:0,8). A mistura foi agitada com auxílio de agitador magnético por 30min e adicionados 10mL de clorofórmio e 10 mL de solução sulfato de sódio 1,5% (m/m) e então tampada para agitação por 2 min, levando a separação total do clorofórmio na camada inferior no funil de separação. 5,0 mL da fase inferior foi transferido para uma placa de Petri previamente pesada e o solvente eliminado por aquecimento em estufa a 45°C até peso constante. O teor de lipídeos foi determinado pela equação abaixo.

$$(\%) \text{ Lipídeos totais} = \frac{A-B}{C} \times 100 \quad (10)$$

Onde: A é o peso da gordura + placa de Petri, B massa da placa de Petri e C a massa inicial da amostra.

c. Efeito da solução extratora na atividade proteolítica

- **Efeito do pH e do tipo de solução na extração das proteínas em termos de atividade proteolítica.**

Para avaliar o efeito do pH na obtenção das proteases de ora-pro-nóbis, a amostra foi homogeneizada em solução fosfato de sódio 0,1M (1:10) em diferentes valores de pH (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10;11) por 60 min a uma rotação de 35 rpm. com auxílio de um agitador orbital. O extrato obtido foi centrifugado a 7400g por 15 min (Centrífuga MPW, modelo 350) e o sobrenadante usado para estimar o teor de proteína e atividade proteolítica. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de regressão e a adequação do modelo foi verificada pela significância do modelo e dos parâmetros ($p < 0,05$), falta de ajuste ($p > 0,05$) e determinação do coeficiente de regressão (R^2).

O pH de extração que proporcionou maior atividade enzimática foi utilizada para avaliar a extração realizada com tampão Fosfato de sódio 0,1M, Fosfato de sódio + ureia 1M, Tris-HCl 0,1M, Tris-HCl 0,1M + ureia 3M. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias Tuckey, a nível de significância de 5,0 %.

- **Efeito do tempo e da razão líquido/sólido na extração das proteínas em termos da atividade proteolítica**

Após a determinação da melhor solução para a extração de proteases de ora-pro-nóbis, foi avaliado o efeito do tempo de extração (min) e da razão líquido/sólido (mL.g^{-1}) na atividade proteolítica total e específica. O efeito das variáveis independentes foram estudados através de um esquema fatorial 5x4, sendo cinco níveis do fator razão líquido/sólido (7,0; 10,5;14;17,5;21 mL.g^{-1}) e quatro variáveis do fator tempo (60, 70, 80 e 90 min).

As folhas de ora-pro-nóbis trituradas foram misturadas com solução tampão com o auxílio de um agitador orbital a uma rotação de 35 rpm. Após o período de agitação determinado no delineamento, as misturas foram centrifugadas a 7400g por 15 min, e o sobrenadante usado como extrato bruto enzimático para as análises seguintes. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de regressão múltipla adotando-se a equação polinomial descrita na equação abaixo.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (11)$$

Onde Y é a variável resposta, índice de recuperação, β_0 o intercepto, β_i o coeficiente linear, β_{ii} o coeficiente quadrático, β_{ij} o de interação, x_i as variáveis independentes e ε o erro. A adequação do modelo foi determinada pela significância do modelo e dos parâmetros ($p < 0,05$), falta de ajuste ($p > 0,05$) e determinação do coeficiente de regressão (R^2). Todas as análises estatísticas necessárias no presente estudo foram realizadas no pacote estatístico Statistical Analysis System® versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

d. Análises relativas aos extratos.

- **Quantificação de proteínas solúveis**

A quantificação do teor de proteínas foi feita segundo metodologia proposta por Bradford (1976) a 595 nm, em espectrofotômetro (UV-Vis Quimis - Brasil), utilizando a albumina sérica bovina como padrão para a curva de calibração.

- **Determinação da atividade proteolítica**

A atividade enzimática foi determinada segundo metodologia adaptada de Kunitz, (1947), utilizando caseína como substrato. O extrato enzimático (0,150 mL) foi adicionado a solução de caseína 1,0% (1,0 mL) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0. A mistura foi incubada a 37°C em banho termostático (Tecnal, modelo Te-184) por 10min. Para parar a reação foi utilizada solução de ácido tricloroacético 10% (1,0 mL), e a solução foi centrifugada a 5000 g por 15 min. A quantidade de aminoácido liberada foi determinada medindo a absorbância do sobrenadante a 280 nm, utilizando a tirosina como padrão para construção da curva de calibração.

Uma unidade de atividade enzimática (U) (Equação 12) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0 μmol de tirosina em 1 mL de meio reacional por minuto.

$$AP (U) = \text{Tirosina} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{\text{Fator de diluição}}{\text{Volume da enzima}} \right) \times \left(\frac{\text{Volume total do extrato}}{\text{Tempo de incubação}} \right) \quad (12)$$

- **Preparo dos sistemas aquosos bifásicos**

Para a pré-purificação das proteases extraídas de ora-pro-nóbis, os sistemas aquosos bifásicos foram preparados usando solução estoque de PEG 1500 e 4000 (50% m/m) e fosfato de sódio (30% m/m) preparado em pH 7,0. Para o preparo da solução estoque de fosfato, foram utilizados Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 na proporção de 1: 2,06 (m/m).

- **Determinação dos dados de equilíbrio e parâmetros dos sistemas**

Para obter as composições globais dos SAB utilizados na partição, primeiramente, foram construídos os diagramas de equilíbrio, utilizando o método turbidimétrico proposto por Albertsson (1986). O procedimento consistiu em pesar aproximadamente 1,0g de solução estoque de PEG em um tubo de ensaio, o qual foi levado ao banho termostático onde foi incubado até atingir o equilíbrio térmico na temperatura desejada. Foram adicionadas alíquotas de 10 μL de sal, com auxílio de uma pipeta automática, seguida de agitação em vortex (PHOENIX, modelo AP56), até alcançar a turbidez, sendo anotada a quantidade de sal que levou a turvação. Em seguida uma quantidade conhecida de água foi adicionada à mistura até a formação de uma solução límpida. O procedimento foi repetido até obtenção dos pontos necessários para montar o diagrama. Para o ajuste das curvas binodais foi utilizada a equação proposta por Hu et al. (2003) (Equação 13), usando o SigmaPlot v.11.0.

$$X_{PEG} = \exp(a + b(X_{sal})^{0,5} + cX_{sal} + d(X_{sal})^2) \quad (13)$$

O volume de exclusão foi determinado, usando os dados experimentais de massa e concentração das fases obtidos durante a construção da curva binodal. Os dados foram ajustados no programa Sigma Plot v. 11.0, utilizando o método numérico Levenberg-Marquadt através da equação (14), proposta por (GUAN; LILLEY; TREFFRY, 1993)

$$\ln\left(V_{213}^* \frac{w_2}{M_2} + f_{213}\right) + \left(V_{213}^* \frac{w_1}{M_1}\right) = 0 \quad (14)$$

Onde V_{213}^* e f_{213} indicam o volume de exclusão do sal e a fração volumétrica efetiva do sal na fase polimérica, M e w representam a massa molecular e a fração mássica

respectivamente, os índices "1" e "2" mostram referência ao PEG e sal respectivamente, nas fases.

As linhas de amarração foram obtidas utilizando método gravimétrico proposto por Merchuk e colaboradores (1998) que consiste em selecionar um ponto acima da região bifásica através do qual a linha de amarração irá passar. Foram utilizados quatro pontos globais para cada sistema PEG-sal, os quais estão apresentados na Tabela 4. Os pontos que deram origem a linha de amarração foram obtidos em tubos graduados com as quantidades adequadas de solução estoque de PEG (50 % m/m) e sal (25% m/m) e água. A mistura foi agitada com auxílio de um vortex (Phoenix, modelo AP-56) e centrifugada (SP LABOR, modelo Sp-701) a 5000g por 10 min. Em seguida, os sistemas foram incubados por 24 horas em estufa B.O.D (Tecnal, modelo TE-184) a 25°C.

Após atingir o equilíbrio, as fases foram separadas com auxílio de uma seringa e então pesadas. A concentração de cada componente em cada fase foi estimada por meio da regra da alavanca, que consiste na relação entre a composição, em massa, da fase e a composição do sistema. Para determinação dos componentes da linha de amarração foi utilizado um sistema de quatro equações e quatro incógnitas (15.1-15.4) (MERCHUK; ANDREWS; ASENJO, 1998).

$$X_{PEG}^s = \exp(a + b(X_{sal}^s)^{0,5} + cX_{sal}^s + d(X_{sal}^s)^2) \quad (15.1)$$

$$X_{PEG}^i = \exp(a + b(X_{sal}^i)^{0,5} + cX_{sal}^i + d(X_{sal}^i)^2) \quad (15.2)$$

$$\frac{X_{sal}^s - X_{sal}}{X_{sal} - X_{sal}^i} = \frac{m_i}{m_s} \quad (15.3)$$

$$\frac{X_{PEG}^s - X_{PEG}}{X_{PEG} - X_{PEG}^i} = \frac{m_i}{m_s} \quad (15.4)$$

Onde X_{PEG} e X_{sal} são as frações mássicas de PEG e sal na fase "s" superior e "i" inferior, e m a massa das fases.

O comprimento das linhas de amarração foi calculado segundo a equação abaixo:

$$CLA = \sqrt{(\Delta C_1)^2 + (\Delta C_2)^2} \quad (16)$$

Onde: (ΔC_1) e (ΔC_2) correspondem a diferença de concentração de PEG e sal, respectivamente, nas fases superior e inferior expressa em % m/m, respectivamente.

A inclinação da linha de amarração foi calculada conforme a equação abaixo

$$ILA = \frac{C_{2S} - C_{2I}}{C_{1S} - C_{1I}} \quad (17)$$

Onde, C_{1S} e C_{1I} são as concentrações de PEG na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto, C_{2S} e C_{2I} são as concentrações de sal na fase superior e inferior, respectivamente

Para o cálculo do volume livre (Equação 18), foi primeiramente determinada a massa específica de cada fase usando Densímetro Digital de Bancada Anton Paar DMA-5000 (Anton-Paar, Graz, Áustria).

$$V_F (\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}) = \left(\frac{1}{\rho} - \frac{1}{\rho_0} \right) \quad (18)$$

Onde ρ é a densidade da fase superior ou inferior e ρ_0 a densidade da água na temperatura de estudo (NANDINI; RASTOGI, 2011).

e. Partição da protease em SAB

As composições globais dos sistemas utilizados na partição das proteases estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Composições globais para os sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1500 e 4000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ + fosfato a 25°C de sódio utilizados para partição da protease de ora-pro-nóbis.

Linha de amarração	Composição global (%m/m)	
	SAL	PEG
1	11,5	12,0
2	12,0	13,0
3	12,5	14,0
4	13,0	15,0

Todos os sistemas foram preparados em tubos graduados, com uma massa final de 5,0g. Para todos os sistemas foi utilizada uma quantidade fixa de extrato bruto (1,0mL).

Baseado na concentração de sal e água presente no extrato obteve-se as quantidades necessárias de solução estoque PEG, sal e água a serem adicionados para a formação do sistema. Após a mistura em um vortex, os sistemas foram centrifugados (Centrífuga MPW, modelo 350) a 4000g por 10 min e incubados a 25°C por 12 horas em uma estufa B.O.D (Tecnal, modelo TE-184). Em seguida, as fases superior e inferior foram separadas com auxílio de seringas e agulhas longas. Com as alíquotas obtidas de cada fase foram determinadas a concentração de proteína e a atividade proteolítica.

- **Determinação dos parâmetros de partição**

O coeficiente de partição foi utilizado para avaliar a separação na extração. O coeficiente de partição para a atividade enzimática (U/ml) foi obtido pela razão da atividade enzimática na fase superior (A_{sup}) pela inferior (A_{inf}) do sistema (Equação 19).

$$K_e = \frac{[A]_{sup}}{[A]_{inf}} \quad (19)$$

O coeficiente de partição da proteína, que determina a concentração de equilíbrio da proteína entre a fase superior (C_{sup}) e na fase inferior (C_{inf}) foi obtido pela Equação (20).

$$K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (20)$$

A seletividade (S) foi calculada por meio da razão entre o coeficiente de partição da atividade da protease (K_e) e o coeficiente de partição da proteína total (K_p) (Equação 21).

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (21)$$

Para selecionar o SAB com melhor capacidade de extração das proteases, foi calculada também a recuperação teórica (Y %) do sistema, utilizando-se a Equação (22).

$$Y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_e)} \quad (22)$$

Onde R corresponde à razão entre os volumes da fase superior e inferior e K_e corresponde ao coeficiente de partição de atividade da protease. Os tubos de centrífuga utilizados foram previamente calibrados, partindo da relação entre volume de água e altura da coluna de água em cada tubo. Antes da retirada das alíquotas a altura das fases foi medida com auxílio de uma régua e o volume das mesmas foi calculado. A altura da fase inferior foi medida do fundo do topo até a interface e a altura da fase superior foi calculada pela diferença entre a altura total e a altura da fase inferior.

O fator de purificação (FP) foi calculado pela razão entre a atividade específica da protease na fase (AE) e a atividade específica do extrato bruto (AE_i), como mostrado na equação 23.

$$PF = \frac{AE}{AE_i} \quad (23)$$

A variação da energia livre de transferência de Gibbs ($\Delta_t G$) foi calculada conforme a equação 24.

$$\Delta_t G \text{ (kJ. mol}^{-1}\text{)} = -RT \ln K_e \quad (24)$$

Onde: T é a temperatura absoluta, em que o ensaio será realizado; R é constante dos gases ideais ($8,314 \times 10^{-3} \text{ J. (mol.K)}^{-1}$); e K_e é o coeficiente de partição de atividade.

5. RESULTADOS

a. Caracterização físico-química das folhas de ora-pro-nóbis

Os resultados obtidos para composição físico-química das folhas de ora-pro-nóbis, apresentados na Tabela 5, aproximam-se de outros valores apresentados na literatura.

O teor de proteína encontrado foi igual a 22,479%, semelhante ao encontrado por Rocha et al. (2008), que obteve resultado igual a 22,93%. Já Takeiti et al. (2009) encontraram teor de proteína de 28,4%. Segundo Almeida e Corrêa (2012), o teor de proteínas pode variar de 15 a 28%, o que depende das condições de cultivo como clima, solo e região. Verifica-se a partir dos resultados obtidos no presente estudo e com os encontrados na literatura que a ora-pro-nóbis é uma fonte de proteína e apresenta potencial para ser usada não apenas na alimentação humana, mas também como uma importante fonte de proteína na indústria de alimentos.

Tabela 5. Caraterização físico-química das folhas de ora-pro-nóbis em base seca.

Componentes	Concentração (%)
Umidade	4,560±0,150
Proteína	22,479±0,363
Cinzas	16,950±0,359
Lipídeos	6,495±0,467

Com relação ao teor de cinzas encontrado, 16,950%, foi superior ao obtido por Takeiti et al. (2009), de 16,1% e inferior ao obtido por Rocha et al. (2008) 18,7%. Em estudos realizados por Almeida et al. (2014) o conteúdo de cinzas das folhas de ora-pro-nóbis de duas diferentes espécies variou de 12,57% a 14,81%, o que evidencia a ora-pro-nóbis como uma importante fonte de minerais, como cálcio (1.346, 67 mg/100g), fósforo (320 mg/100g) e ferro (20,56 mg/100g) (ALMEIDA et al. , 2014).

O teor de lipídeos foi superior ao determinado por Martinevski et al. (2013), cujo valor foi 2,07%. Este parâmetro é relevante no processo de extração de proteínas, uma vez que a alta concentração de lipídeos pode dificultar o acesso da água e/ou da solução extratora aos grupos hidrofílicos das proteínas, e assim reduzir a quantidade de proteínas que podem ser extraídas (FEYZI et al., 2015).

b. Extração de proteases das folhas de ora-pro-nóbis

- Efeito do pH da solução na extração

Os extratos brutos obtidos das folhas de ora-pro-nóbis em diferentes valores de pH foram avaliados quanto quantidade de proteína (mg), atividade proteolítica total (U), e os resultados encontrados foram submetidos a análise de regressão. O resultado da ANOVA para o modelo quadrático indicou que o mesmo é significativo ($p < 0,05$) para as duas variáveis dependentes estudadas. O coeficiente de determinação encontrado, $R^2 = 84\%$ e 80% para atividade enzimática e a quantidade de proteínas extraída, respectivamente, demonstram que os modelos obtidos são adequados para explicar a extração de proteínas em função do pH. Na Tabela 6 estão representados a estimativa dos parâmetros do modelo de segunda ordem para o pH.

Tabela 6. Estimativa dos parâmetros do modelo quadrático para proteína (mg) e atividade enzimática total do extrato (U) em função do pH de extração.

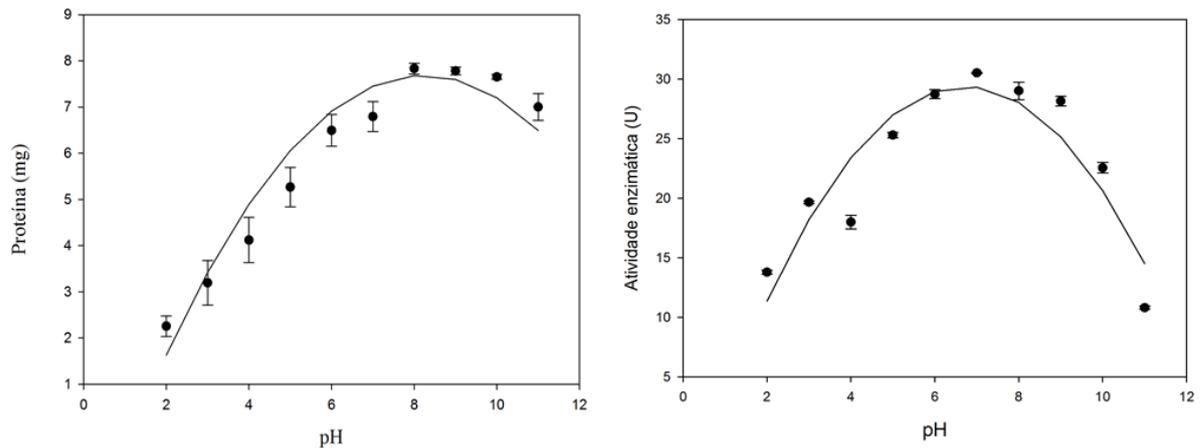
Parâmetro	Estimativa	t value	p	erro
Proteínas (mg)				
Intercepto	-2,88	-2,500	0,023	1,156
pH	2,568	6,350	0,001	0,398
pH²	-0,156	-5,200	0,001	0,030
Atividade enzimática (U)				
Intercepto	-7,188	-2,070	0,050	3,466
pH	10,892	9,130	0,001	1,193
pH²	-0,811	-9,000	0,001	0,090

Em processos de extração, a liberação de proteínas de uma matriz biológica está relacionada com o sistema tampão utilizado, bem como o pH correspondente (MUTHU et al., 2017). Como pode ser observado na Figura 4, a quantidade de proteína no extrato e atividade enzimática apresentaram comportamento semelhante. Isso indica que a maioria das proteínas extraídas possuem a atividade enzimática desejada.

Também pode ser observada a redução da quantidade de proteínas, e consequentemente de atividade enzimática, nos extratos obtidos em condição ácida e alcalina. Em condições extremas de pH a alta carga líquida pode levar a repulsão eletrostática intramolecular e como consequência há o desdobramento e desnaturação da cadeia proteica. A

solubilidade de proteínas alimentares é proporcional a eficiência da extração e geralmente é menor para proteínas desnaturadas. A redução da solubilidade ocorre devido ao exposição de aminoácidos hidrofóbicos como consequência do desdobramento, o que pode alterar o equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente, a favor da primeira (SGARBIERI, 1996; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2018).

Figura 4. Efeito do pH de extração no teor de proteínas (mg) e na atividade enzimática (U) (Dados experimentais (●); dados obtidos com modelo (—)).



A baixa solubilidade das proteínas de ora-pro-nóbis em pH ácido também pode ser atribuída ao seu ponto isoelétrico. Estudos realizados por Moraes et al. (2019) indicam que o ponto isoelétrico das proteínas do extrato bruto de ora-pro-nóbis ocorre em torno do pH 1,7.

Para obter o valor ótimo do pH de extração com maior atividade proteolítica o modelo obtido para atividade enzimática foi derivado. A melhor condição de extração foi obtida em pH 6,7. Portanto os estudos seguintes foram realizados em pH 7,0.

Segundo Buyel et al. (2015), a extração de proteínas de folhas costuma ser efetiva quando realizada na faixa de pH 7-8. Muthu et al. (2017) relataram a redução da atividade proteolítica em extratos de folhas de *Wrightia tinctoria* obtidos com tampão em pH ácido (2,0-4,5) e alcalino (9,0-10). Os melhores resultados foram encontrados em pH 5,5-8,5. Fu et al. (2010) também verificaram comportamento semelhante na extração de proteínas das folhas de *Nicotiana tabacum*. Os testes realizados na faixa de pH de 3,6 a 8,2 indicaram que condições de baixa alcalinidade (pH 7,7) seriam adequadas para maior índice de extração. Ao estudar as condições de extração de protease de folhas de *Streblus asper*, Mehrnoush et al. (2011), encontraram como condição ótima de extração pH 7,5.

- **Efeito do tipo de solução na extração**

Os resultados obtidos para o efeito do tipo de solução extratora no teor de proteína e na atividade enzimática encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Atividade proteolítica do extrato bruto de folhas de ora-pro-nóbis em diferentes tampões.

Solução extratora	Proteína (mg)	Atividade enzimática (U)
Fosfato de sódio 0,1M	5,875 ^A ±0,070	30,500 ^A ±0,200
Fosfato de sódio + Ureia 1M	5,246 ^A ±0,069	30,280 ^A ±0,163
Tris-HCl 0,1M	3,425 ^B ±0,082	30,399 ^A ±1,700
Tris-HCl + Ureia 3M	3,875 ^B ±0,045	33,320 ^A ±0,094

Médias seguidas de mesma letra não diferem a 5% de probabilidade.

As extrações realizadas com tampão fosfato de sódio resultaram em maior conteúdo de proteínas, embora não tenha sido observada diferença significativa nos resultados obtidos de atividade enzimática. Diante da possibilidade de utilizar o mesmo tipo de sal na etapa de purificação com sistemas aquosos bifásicos, o tampão fosfato de sódio 0,1 M foi utilizado para os estudos de otimização do processo de extração.

- **Efeito da razão de solução extratora/soluto e do tempo**

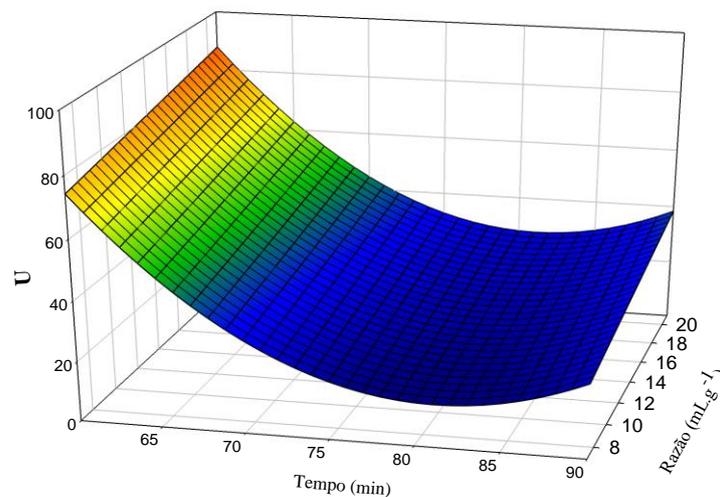
Os resultados obtidos experimentalmente por meio de um esquema fatorial em relação a atividade enzimática total dos extratos foram submetidos a análise de regressão múltipla. O resultado da ANOVA para o modelo quadrático indica que o mesmo é significativo, assim como a regressão. Segundo Amid et al. (2011), coeficientes de determinação acima de 80% ($R^2 = 88\%$) demonstra o bom ajuste do modelo. Também pode ser verificado que o coeficiente de variação obtido neste estudo foi menor que 10% (4,436%), o que indica que se trata de um experimento de alta precisão. Na Tabela 8 estão apresentadas as estimativas dos parâmetros para o modelo quadrático ajustado.

Tabela 8. Estimativa dos parâmetros do modelo quadrático ajustado para atividade enzimática total do extrato (U).

Parâmetro	Estimativa	erro	Valor t	Valor p
Intercepto	891,210	72,144	12,350	0,0001
Tempo	-21,781	1,954	-11,150	0,0001
Razão	0,965	0,263	3,680	0,0008
Tempo²	0,136	0,013	10,490	0,0001

Sabe-se que durante o processo de extração, parâmetros como pH, tipo e volume da solução extratora e tempo são parâmetros determinantes para extração de proteases, assim como no custo de produção (AMID et al., 2011; MEHRNOUSH et al., 2011; ZOHDI e AMID, 2013). Na Figura 5 encontra-se a representação gráfica dos resultados obtidos a partir do modelo.

Figura 5. Efeito do tempo de extração (min) e razão líquido/sólido (mL.g^{-1}) na atividade enzimática.



Como pode ser verificado, a extração de proteases é muito rápida inicialmente e diminui ao longo do tempo. Segundo Linares et al. (2010) esse comportamento está associado aos mecanismos envolvidos no processo de extração, que pode ser dividido em duas etapas: primeiramente os compostos solúveis e facilmente disponíveis na superfície são rapidamente lixiviados. Em seguida há redução da taxa de extração, que ocorre quando a matriz absorve água e incha e quando os compostos não estão facilmente acessíveis. Esta é a etapa de difusão e ela controla quase todo o processo de extração.

A baixa atividade enzimática após longo período de extração pode levar a solubilização de compostos não proteicos que podem interagir com as proteases e assim reduzir sua atividade enzimática. Quanto a variável razão solvente/soluto, verifica-se que apenas o termo linear foi significativo no modelo. O coeficiente positivo indica que o processo é favorecido pelo aumento do volume de solução usada. Esse fenômeno ocorre devido a quantidade insuficiente de líquido para penetração na matriz sólida e solubilização da enzima no extrato bruto.

a. Partição de proteases de ora-pro-nóbis em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG + fosfato de sódio + água

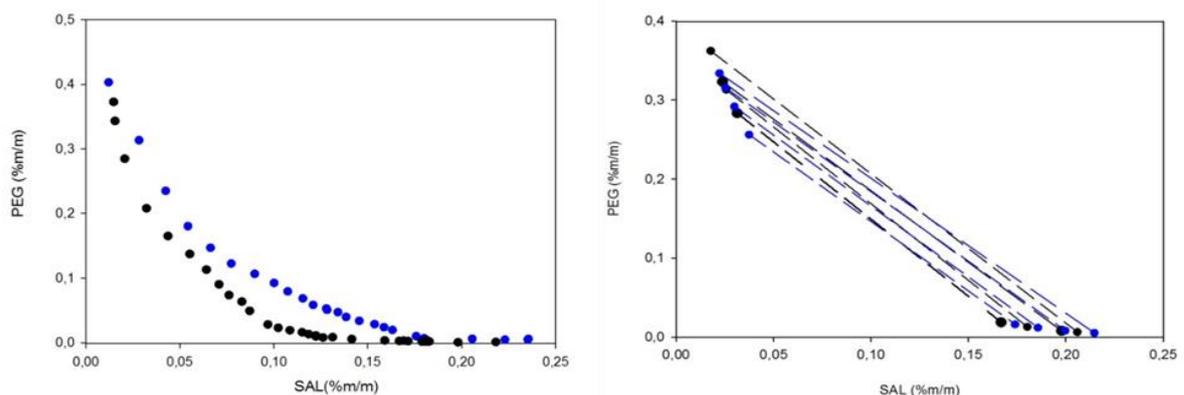
Aos dados obtidos experimentalmente das curvas binodais de sistemas formados por PEG (1500 e 4000 g.mol⁻¹), fosfato de sódio e água, na temperatura de 25°C, foi ajustado o modelo de regressão não-linear proposto por Hu et al. (2003) (Equação 13). Os resultados obtidos para os parâmetros a, b, c e d e os coeficientes de determinação (R²) encontram-se na Tabela 9. A partir dos valores de R² verifica-se que a equação se ajustou de forma adequada aos dados experimentais.

Tabela 9. Parâmetros a, b, c, d e coeficiente de determinação (R²) obtidos para os sistemas PEG+ fosfato pela equação de HU et al. (2003).

<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	R ²
PEG 1500				
-0,451	-3,550	-4,164	-48,225	0,998
PEG 4000				
-0,404	-4,249	-1,520	-65,997	0,995

Os diagramas de fases dos sistemas estudados estão apresentados na Figura 6. É possível verificar o aumento da região bifásica nos digramas obtidos com PEG 4000. Efeito semelhante foi encontrado por Pirdashti et al. (2019) para SAB formados por PEG (600, 1500, 3000 e 6000 g.mol⁻¹), formato de sódio e água, na temperatura de 35°C, e por Sosa et al. (2017) em sistemas formados por PEG (2000, 4000 e 6000 g.mol⁻¹) e sais de sulfato (sódio e sulfato de cobre) a 25°C.

Figura 6. Diagrama de fases (A) e linhas de amarração (B) de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG + fosfato de sódio + água a 25°C. (PEG 4000(●---●); PEG 1500(●---●)).



Esse comportamento é atribuído ao aumento da hidrofobicidade com o aumento da cadeia do PEG, o que leva a redução da sua entropia configuracional e assim há menos sítios disponíveis para a interação do PEG com sal e água. Por este motivo, a presença de um sistema homogêneo não é termodinamicamente favorável, e para a redução da energia livre, o sistema é separado em duas fases. Conseqüentemente, menor é quantidade de sal para a saturação do PEG e a para separação das fases, e a curva binodal se desloca para próximo dos eixos (ALBERTSSON, 1986; SAMPAIO et al., 2020).

Como pode ser observado na Tabela 10 existe uma relação entre os dados obtidos da curva binodal e o volume de exclusão, que mede os espaços vazios disponíveis para interações moleculares. Com o aumento da cadeia do polímero é observado o alargamento da região bifásica, assim como o aumento nos resultados obtidos para o volume de exclusão. Comportamento semelhante foi encontrado por Yu et al. (2019) ao estudar o efeito da massa molar do polímero em sistemas PEG (1000, 4000 e 6000 g.mol⁻¹) + cloreto de cézio + água.

Tabela 10. Volume de exclusão calculado de sistemas formados por PEG + fosfato de sódio + água, a 25°C.

PEG	V* ₂₁₃ (g.mol ⁻¹)	R ²
1500	90,181	0,850
4000	224,349	0,936

Este efeito ocorre porque como aumento da massa molar, a molécula de PEG se torna mais empacotada e isso diminui os espaços disponíveis para as moléculas de água interagirem com o PEG, e assim sua migração para a fase oposta (SOSA et al., 2017; PIRDASHTI et al., 2019). Os resultados encontrados para o volume de exclusão refletem diretamente nos resultados encontrados de volume livre (Tabela 11).

Tabela 11. Volume livre das fases superior e inferior (10⁻² mL.g⁻¹) de SAB formado por PEG 1500 e 4000 g.mol⁻¹ + fosfato de sódio + água.

Fase superior		Fase inferior	
1500	4000	1500	4000
-12,474	-12,645	-7,110	-6,800
-13,224	-13,578	-7,220	-6,997
-14,103	-14,474	-7,380	-7,300
-14,900	-15,367	-7,400	-8,000

Grossman e Gainer (1988) sugerem que a presença de “cavidades” é um fator importante na solubilidade de uma molécula. A quantidade de água disponível ou associada a molécula de PEG pode afetar o tamanho ou a quantidade desses espaços livres.

As composições de equilíbrio, CLA e ILA para os sistemas estudados estão presentes na Tabela 12. Foram determinadas quatro linhas de amarração para cada sistema. Como pode ser observado, para todos os sistemas o PEG é excluído da fase inferior, e o contrario é observado na fase superior, na qual o polímero está presente em grande concentração. Esse efeito é comumente observado em sistemas do tipo PEG-sal (SOUZA JR. et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2018; SAMPAIO et al., 2020).

Tabela 12. Dados das linhas de amarração em porcentagem mássica (%m/m) das fases de SAB formados por PEG (w1) e fosfato de sódio (w2).

LA	Composição global		Fase superior		Fase inferior		CLA	ILA
	w1	w2	w1	w2	w1	w2		
PEG 1500								
1	12,0	11,5	25,702	3,725	1,181	17,38	27,668	-1,762
2	13,0	12,0	28,937	3,032	1,181	18,652	31,849	-1,777
3	14,0	12,5	32,395	2,392	0,891	19,714	35,955	-1,819
4	15,0	13,0	33,41	2,219	0,545	21,465	38,086	-1,708
PEG 4000								
1	12,0	11,5	28,415	3,122	1,876	16,667	29,796	-1,923
2	13,0	12,0	31,165	2,59	1,298	18,062	33,637	-1,930
3	14,0	12,5	30,236	2,781	0,649	20,591	34,56	-1,664
4	15,0	13,0	37,342	1,625	0,692	20,299	41,137	-1,963

O aumento composição dos constituintes do sistema resultou no aumento dos valores obtidos para CLA. Segundo Silva e Loh (2006) o CLA está associado à seletividade do sistema. Quanto menor esse parâmetro, mais próximo de 1 poderá ser o coeficiente de partição da biomolécula (K), e menos seletiva será a extração. Entretanto, com o aumento nos valores de CLA, a biomolécula tende a ser transferida preferencialmente para uma das fases e o valor de K torna-se mais distante de 1. Isso acontece porque a diferença na composição das fases aumenta o efeito das contribuições entálpicas e entrópicas na transferência da molécula para uma das fases.

Quanto aos valores obtidos para ILA, verifica-se o aumento no seu valor absoluto à medida que aumenta a diferença entre a composição das fases e da massa molar do PEG. O aumento nos valores de ILA acontece devido à diferença de hidrofobicidade entre as fases.

Este efeito é intensificado pelo aumento da cadeia do PEG, que se torna mais hidrofóbica, levando a transferência de água da fase superior para a inferior, resultando na diminuição de sal na fase inferior e aumento da concentração de PEG na fase superior.

Os valores do coeficiente de partição de proteína (K_p) e de atividade (K_e), índice de recuperação teórica (%Y), fator de purificação (F.P.), energia livre de transferência ($\Delta_t G$) estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Coeficiente de partição de proteína (K_p) e atividade enzimática (K_e), recuperação (Y), fator de purificação (F.P.), seletividade (S) e energia livre de transferência ($\Delta_t G$) de sistemas formados por PEG + fosfato de sódio+água, a 25°C.

LA	K_p	K_e	Y	F.P.	S	$\Delta_t G$
PEG 1500						
1	0,984±0,010	1,990±0,093	65,247±0,834	0,546±0,071	2,022±0,115	-1,704
2	0,893±0,007	2,433±0,323	67,327±2,723	0,515±0,004	2,723±0,340	-2,192
3	0,451±0,024	2,485±0,457	73,204±2,852	1,116±0,035	5,942±0,722	-2,234
4	0,608±0,061	1,594±0,080	66,314±0,116	0,731±0,076	2,633±0,267	-1,155
PEG 4000						
1	0,617 ±0,025	2,119±0,351	64,988±1,118	0,547±0,071	3,427±0,432	-1,831
2	0,815±0,115	2,251±0,070	64,373±0,714	0,484±0,020	2,783±0,307	-2,009
3	1,315±0,047	2,217±0,094	68,028±2,480	0,463±0,004	1,691±0,284	-1,962
4	0,766±0,050	2,079±0,035	67,770±1,759	0,640±0,055	2,719±0,132	-1,813

Em todos os sistemas estudados o coeficiente de partição de proteínas foi inferior a 1, com exceção da linha de amarração 3 para o PEG 4000. O aumento dos valores de CLA e ILA favoreceu a partição das proteínas para a fase inferior nos sistemas formados por PEG 1500, porque a diferença entre a composição das fases aumenta os efeitos entálpicos e entrópicos responsáveis pela afinidade entre a biomolécula e os componentes de cada fase (SOUZA JR. et al., 2014).

Quanto aos SAB formados por PEG 4000, o aumento da massa molar pode ter favorecido a interação de entre a fase polimérica e as proteínas de caráter hidrofóbico, visto que o aumento da massa molar do polímero resulta no aumento da sua hidrofobicidade e expulsão das moléculas de água para a fase inferior. Este comportamento pode ter sido intensificado pelo aumento da concentração de polímero no sistema.

Embora os valores de K_p indicarem uma partição preferencial das proteínas para a fase inferior, verificou-se para todos os sistemas estudados, que as proteínas com atividade proteolítica permaneceram em maior concentração na fase superior ($K_e > 1$). Uma vez que a fase inferior apresenta maior hidrofiliabilidade, é possível inferir com este comportamento que as proteases extraídas da ora-pro-nóbis apresentam caráter hidrofóbico (COSTA et al., 2015). Observa-se o aumento de K_e com o aumento de CLA, uma vez que esse parâmetro pode favorecer entre a molécula e constituintes do sistema. Além disso também pode ser considerado que o aumento da concentração de sal na fase inferior tenha reduzido a atividade enzimática.

Ao comparar o efeito do PEG, os melhores resultados encontrados para o PEG 1500 foram superiores aos encontrados nos sistemas formados por PEG 4000. A partição de proteases em sistemas aquosos bifásicos também pode estar relacionada com os efeitos estéricos devido aos constituintes do sistema. Os sistemas formados por PEG 4000 apresentaram maior volume de exclusão (TABELA 10) e menor volume livre (Tabela 11), reduzindo assim os espaços disponíveis para interação entre PEG e biomolécula (ASENJO; ANDREWS, 2011; SILVA et al., 2013).

O baixos valores de K_e também foram encontrados por Shad et al. (2018) em estudos de partição da α -amilase, extraída da pitaita, com o aumento da massa molar do PEG de 4000 para 8000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ em sistemas formados por PEG e citrato de sódio. Zhu e Zhang (2019) ao estudar a partição da papaína em sistemas formados por líquido-iônico ([C4Py] Cl e [C6Py] Cl) e fosfato relataram a redução da recuperação da atividade e do coeficiente de partição, comportamento atribuído ao aumento da hidrofobicidade da cadeia do líquido-iônico.

O índice de recuperação de atividade quantifica quanto de atividade enzimática é recuperada na fase em relação a atividade inicial no sistema. De maneira geral, a recuperação em SAB de enzimas/proteínas varia de 60-90% (Ruiz-Ruiz et al., 2012). Verifica-se que os resultados encontrados para a recuperação dos sistemas formados por PEG 1500 (65,240-73,204%) foram superiores aos encontrados para os sistemas formados por PEG 4000 (64,373-68,080%), como relatado por Soares et al. (2017) na partição de proteases de *Aspergillus tamaritii* URM4634 em sistemas PEG+citrato. Segundo Silva et al. (2013) elevados valores de recuperação podem sugerir que a interação entre PEG e enzima não provoca alterações em sua estrutura nativa, e conseqüentemente não há variação na atividade. Os valores referentes ao fator purificação obtidos no presente estudo se aproximam de outros trabalhos que utilizaram sistemas aquosos bifásicos na purificação de proteases (AMID et al., 2012; YAVARI et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2016).

Rawdkuen et al. (2010) obtiveram recuperação de 74,6 % e fator de purificação de 4,08 usando PEG de massa molar 1000 g/mol e sulfato de magnésio 14% na partição de papaína. Em sistemas PEG+ fosfato, Rosso et al. (2012) relatam o aumento do fator de purificação e da recuperação de colagenase de *Penicillium aurantiogriseum*. Wu et al. (2017) estudaram o efeito do tipo de sal e da massa molar do PEG na partição de bromelina. O maior fator de purificação (7,0) e recuperação (54,5%) foram encontrados nos sistemas formados por PEG 4000 e fosfato.

A transferência de uma biomolécula para uma das fases exige o rompimento de interações entre os componentes da fase para que possam interagir com a biomolécula. Essas interações podem ser expressas em termos de energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_t G$) que é definida como a energia livre associada à transferência da biomolécula da fase salina para a fase polimérica. Termodinamicamente, $\Delta_t G$ é dividida em contribuições de natureza entálpica e entrópica (JOHANSSON et al., 1998; MAGESTE et al., 2009; COSTA et al., 2015).

Em todos os sistemas estudados a transferência das proteases da fase inferior para superior foi um processo espontâneo ($\Delta_t G < 0$). As forças entrópicas atuam para particionar biomolécula para a fase inferior, que apresenta maior densidade numérica devido a maior concentração de moléculas de água. Consequentemente, a transferência das proteases para a fase polimérica pode ter sido governada pela contribuição entálpica. Os menores valores obtidos para ΔG foram em sistemas formados por PEG 1500. Quanto menor a massa molar menos enovelada é a cadeia polimérica, o que favorece as interações específicas entre o PEG e a biomolécula.

Tendo em vista os resultados obtidos, verifica-se que LA 3 para o PEG 1500 mostrou-se eficiente na partição de proteases de ora-pro-nóbis, o que evidencia o uso de sistemas aquosos bifásico como etapa inicial dos processos de separação. O sistema em questão apresentou maior seletividade (5,942), índice de recuperação (73,204%) e fator de purificação (1,116) e maior espontaneidade ($\Delta_t G$).

Esta mesma composição global foi utilizada para avaliar a partição das proteases extraídas com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH7,0. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Parâmetros de partição de sistemas formados por PEG + fosfato de sódio+água, a 25°C de proteases extraídas com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH7,0.

Kp	Ke	Y(%)	F.P.	S	$\Delta_t G$
0,403±0,077	2,709±0,054	75,046±0,362	1,401±0,045	6,832±0,178	-2,468

Os resultados encontrados de K_p e K_e são semelhantes aos apresentados na Tabela 13. Os maiores valores encontrados para a recuperação, fator de purificação, seletividade, e energia livre de transferência, em valor absoluto, pode estar relacionado com o conteúdo de proteínas extraídas na condição referida. Embora, a quantidade de proteínas tenha sido menor, a atividade enzimática total foi alta, o que demonstra que a quantidade de proteínas que não são de interesse é menor em comparação aos outros extratos, o que favorece o processo de partição.

6. CONCLUSÃO

Foi possível observar com os estudos de otimização do processo de extração de proteases de ora-pro-nóbis que a melhor condição de extração em termos de atividade enzimática, foi obtida quando realizada com tampão fosfato de sódio pH 7,0 no menor tempo de estudo e maior razão líquido sólido. Quanto a partição das proteases em SAB, verificou-se que as proteases forma preferencialmente concentradas na fase superior, rica em PEG. É possível então afirmar portanto, que as proteases particionadas apresentam caráter hidrofóbico. Também foi observada a redução do coeficiente de partição com o aumento da massa molar do PEG e da concentração dos componentes do sistema. Quanto a energia livre de Gibbs de transferência, os resultados obtidos mostram que a transferência das proteases para a fase polimérica é um processo espontâneo. O maior índice de recuperação e fator de purificação obtidos foram de 73,204 e 1,116 com SAB formados por 14% de PEG 1500 e 12,5% de fosfato de sódio. A partição das proteases obtidas com tampão Tris-HCl foram avaliada, obtendo-se valores de índice de recuperação e fator de purificação equivalente a 6,832 e 1,401 respectivamente. Esse valor esta associado a relação atividade enzimática/quantidade de proteína.

7. REFERÊNCIAS

- AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 173–182, 2019.
- ALBERTSSON, P. Å. **Partition of cell particles and macromolecules: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology**. 3. ed. New York: Wiley, 1986.
- ALCÂNTARA, L. A. P. et al. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium polyacrylate. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. January, p. 1–7, 2013.
- ALICI, E. H.; ARABACI, G. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. **Biological Macromolecules**, n. 2017, p. 1295–1304, 2018.
- ALMEIDA-FILHO, J.; CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo do ‘ora-pro-nobis’ (*Pereskia aculeata* Mill.). **Revista Ceres**, v. 21, p. 105–111, 1974.
- ALMEIDA, M. E. F. DE et al. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3 SUPPL. 1, p. 431–439, 2014.
- ALMEIDA, M. E. F. DE; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 42, p. 7451–756, 2012.
- AMID, M. et al. Optimisation of serine protease extraction from mango peel (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan). **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 666–671, 2011.
- AMID, M. et al. Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) peel using an alcohol / salt aqueous two phase system. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1382–1386, 2012.
- AMID, M. et al. Purification and Characterization of Alkaline-Thermostable Protease Enzyme from Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Waste : A Potential Low Cost of the Enzyme. **BioMed Research International changes**, v. 2014, 2014.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. Gaithersburg (Maryland): AOAC, 2010.
- ARRILBÉRE, M. C. et al. Comparison of *Asclepiadaceae* latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. cysteine peptidases. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 267–273, 1998.
- 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.
- AZRI, W.; ENNAJAH, A.; JING, M. Comparative study of six methods of protein extraction for two-dimensional gel electrophoresis of proteomic profiling in poplar stems. **Canadian journal of plant science**, v. 93, p. 895–901, 2011.

- BARBOSA, J. M. P. et al. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 32, p. 3853–3858, 2011.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: UFRJ:CAPES:FAPER, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 5, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BUYEL, J. F.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 902–913, 2015.
- CARVALHO, T. et al. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259–266, 2017.
- CHAIWUT, P.; PINTATHONG, P.; RAWDKUEN, S. Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1172–1175, 2010.
- CHAURASIYA, R. S.; HEBBAR, H. U. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods Ram. **Separation and Purification Technology**, v. 111, p. 90–97, 2013.
- CHEN, Y. et al. Characterization of functional proteases from flowers of tea (*Camellia sinensis*) plants. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 149–159, 2016.
- CHINNADURAI, G. S.; KRISHNAN, S.; PERUMAL, P. Studies on detection and analysis of proteases in leaf extract of medicinally important plants. **Phytomedicine**, v. 40, n. January, p. 176–188, 2018.
- CONCEIÇÃO, M. C. et al. Thermal and microstructural stability of a powdered gum derived from *Pereskia aculeata* Miller leaves. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 104–114, 2014.
- COSTA, A. R. DA et al. Partitioning of bovine lactoferrin in aqueous two-phase system containing poly(ethylene glycol) and sodium citrate. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 118–124, 2015.
- CUTLER, P. **Protein Purification Protocol**. 2. ed. [s.l.] Human Press Inc., 2004.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimento de Fennema**. 5. ed. Porto Algre: Artmed, 2018.
- DASHEK, W. V.; HARRISON, M. **Plant Cell Biology**. [s.l.] Science Publishers, 2006.
- DIEDERICH, P. et al. Evaluation of PEG/phosphate aqueous two-phase systems for the purification of the chicken egg white protein avidin by using high-throughput techniques. **Chemical Engineering Science**, v. 104, p. 945–956, 2013.
- FEIJOO-SIOTA, L. et al. Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 268, p. 28–39, 2018.
- FERNANDES, P.; TECNICO, I. S.; LISBOA, U. DE. **Enzymatic Processing in the Food**

Industry. [s.l.] Elsevier, 2018.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 2017.

FETZER, A. et al. Industrial Crops & Products Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake. **Industrial Crops & Products**, v. 112, n. August 2017, p. 236–246, 2018.

FEYZI, S. et al. Fenugreek (*Trigonella foencem graecum*) seed protein isolate: Extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 511, p. 3165–3176, 2015.

FU, H. et al. Recovery of nicotine-free proteins from tobacco leaves using phosphate buffer system under controlled conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 2034–2042, 2010.

GERZHOVA, A. et al. Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and use of zeta-potential / turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions. **Food Chemistry**, v. 201, p. 243–252, 2016.

GHALY, A. E.; ALKOAİK, F. N. Extraction of protein from common plant leaves for use as human food. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 331–342, 2010.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Calorimetric protein quantification in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 413–417, 2011.

GONZÁLEZ-MORA, A. et al. Recovery and primary purification of bacteriophage M13 using aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 11, p. 2808–2816, 2017.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N. et al. Production of plant proteases in vivo and in vitro: A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 983–996, 2011.

GROSSMAN, P. D.; GAINER, J. L. Correlation of aqueous two-phase pof Proteins with changes in free volume. **Biotechnology Progress**, v. 4, n. 1, p. 6–11, 1988.

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

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 2018, p. 254–267, 2019.

HU, M. et al. 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, p. 1561–1564, 2003.

JOHANSSON, H. O. et al. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 711, n. 1–2, p. 3–17, 1998.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Aqueous two-phase extraction of bromelain from Pineapple Peels (*Phu Lae* cultiv.) and Its Biochemical Properties. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 20, n. 5, p. 1219–1226, 2011.

KINUPP, V. F. Plantas alimentícias alternativas no Brasil: uma fonte complementar de alimento e renda. **Cadernos de Agroecologia**, v. 1, 2006.

KOBLIZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KUNITZ, M. Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor II. General Properties. **The Journal of general physiology**, v. 30, n. 4, p. 291–310, 1947.

LI, J. **Syntesis of polyethyleneglycols (PEG): derivates and applications in biomaterials**. [s.l.] BME, 2001.

LI, Z. et al. Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. **Food Chemistry**, 2018.

LIMA, Á. S.; SANTANA, C. C. P. **Processos de Extração e purificação de Biomoléculas**. Aracaju-Se: Editora Universitária Tiradentes, 2017.

LIMA JUNIOR, F. A. et al. Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. **Food hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 38–47, 2013.

LINARES, A. R. et al. Modeling yerba mate aqueous extraction kinetics: Influence of temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 4, p. 471–477, 2010.

LLORENTE, B. E.; BRUTTI, C. B.; CAFFINI, N. O. Purification and aharacterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus L.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8182–8189, 2004.

MAGESTE, A. B. et al. Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7623–7629, 2009.

MARTIN, A. A. et al. Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 20–28, 2017.

MARTINEVSKI, C. S. et al. Use of bertalha (*Anredera Cordifolia* (Tem.) Steenis) e ora-pro-nóbis (*Pereskia Aculeata* Mill.) na elaboração de pães. **Braz. J. Food Nutr**, v. 24, n. 3, p. 3–8, 2013.

MAZORRA-MANZANO, M. A. et al. Sour Orange Citrus aurantium L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54.2, p. 325–330, 2013.

MEHRNOUSH, A. et al. Heat-Treatment aqueous two phase system for purification of serine protease from Kesinai (*Streblus asper*) Leaves. **Molecules**, v. 16, p. 10202–10213, 2011a.

MEHRNOUSH, A. et al. Optimization of the Conditions for Extraction of Serine Protease from Kesinai Plant (*Streblus asper*) Leaves Using Response Surface Methodology. **Molecules**, v. 16, p. 9245–9260, 2011b.

MERCÊ, A. L. R. et al. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} . **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 29–37, 2001.

MERCHUK, J.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B: Biomedical**

Sciences and Applications, v. 711, p. 285–293, 1998.

MORAIS, L. C. DE et al. Protein recovery from Barbados gooseberry (*Pereskia aculeata* Miller) leaves by salting out and isoelectric precipitation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. May, p. 419–430, 2019.

MUTHU, S. et al. Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 112, p. 161–172, 2017.

NAM, S.; WALSH, M. K.; YANG, K. Comparison of four purification methods to purify cysteine protease from Asian pear fruit (*Pyrus pyrifolia*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 86–93, 2016.

NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Liquid-Liquid Extraction of Lipase Using Aqueous Two-Phase System. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 2, p. 295–303, 2011.

NASCIMENTO, M. B. DO et al. Equilibrium data and thermodynamic studies of α -amylase partition in aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 463, p. 69–79, 2018.

NASCIMENTO, T. P. et al. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16–24, 2016.

PAVAN, R.; JAIN, S.; KUMAR, A. Properties and therapeutic application of bromelain: A Review. **Biotechnology research international**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

PINTO, N. D. C. C. et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330–337, 2015.

PINTO, N. DE C. C. et al. Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. **Pharmacologyonline**, v. 3, n. September, p. 63–69, 2012.

PINTO, N. DE C. C.; SCIO, E. The Biological Activities and Chemical Composition of *Pereskia* Species (Cactaceae)-A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 189–195, 2014.

PIRDASHTI, M. et al. Phase equilibria of aqueous mixtures of PEG with formate salt: Effects of pH, type of cation, polymer molecular weight and temperature. **Fluid Phase Equilibria**, v. 485, p. 158–167, 2019.

PONTUAL, E. V et al. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1848–1854, 2012.

PRADAL, D. et al. Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 32, p. 127–131, 2016.

PURWANTO, M. G. M. The role and efficiency of ammonium sulphate precipitation in purification process of papain crude extract. **Procedia Chemistry**, v. 56, p. 3643–3650, 2016.

RAMAKRISHNAN, V. et al. 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. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 1, p. 73–80, 2011.
- REGUPATHI, I.; SRIKANTH, C. K.; SINDHU, N. Liquid-liquid equilibrium of poly (ethylene glycol) 2000 + diammonium hydrogen citrate+water system at different temperatures. **Journal od chemical and engineering data**, v. 56, p. 3643–3650, 2011.
- ROCHA, D. R. DA C. et al. Macarrão Adicionado De Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 459–465, 2008.
- ROSSO, B. U. et al. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 335, p. 20–25, 2012.
- RUIZ-RUIZ, F. et al. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, n. August 2016, p. 1–13, 2012.
- SAKTHIVEL, M. et al. Antibacterial cysteine protease from *Cissus quadrangularis L.* **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 878–888, 2017.
- SALEHI, M. et al. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 847–854, 2017.
- SAMPAIO, D. DE A. et al. Aqueous two-phase (polyethylene glycol+ sulfate) system for caffeine extraction: Equilibrium diagrams and partitioning study. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 98, p. 86–94, 2016.
- SAMPAIO, V. S. et al. Thermodynamic modeling of aqueous two-phase systems composed of macromolecules and sulfate salts at pH 2.0. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 65, n. 1, p. 9–18, 2020.
- SANTOS, I. C. et al. Ora-pro-nóbis: da cerca à mesa. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais-EPAMIG.**, n. 177, 2012.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. 1. ed. São Paulo: Varela, 1996.
- SHAD, Z. et al. Aqueous two-phase purification of α -amylase from white pitaya (*Hylocereus undatus*) peel in polyethylene glycol /citrate system: optimization by response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 305–313, 2018.
- SHARMA, K. M.; KUMAR, R., PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115–126, 2017.
- SILVA, L. H. M. DA; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345–1351, 2006.
- SILVA, O. S. DA et al. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamaris* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168–173, 2017.
- SILVA, O. S. DA; ALVES, R. O.; PORTO, T. S. PEG-sodium citrate aqueous two-phase systems to in situ recovery of protease from *Aspergillus tamaris* URM4634 by extractive

fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 209–2016, 2018.

SILVA, G. M. DE M. E et al. Fluid Phase Equilibria Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 339, p. 52–57, 2013.

SILVA, S. H. et al. Extraction processes and characterization of the mucilage obtained from green fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111-716, 2019.

SINHA, R. J.; DEY, P. K.; PANDA, T. Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation. **Applied Microbiology and Biothechnology**, v. 54, p. 467–486, 2000.

SIRITAPETAWEE, J. et al. A novel serine protease with human fibrino(genolytic) activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 7, p. 907–912, 2012.

SOARES, O. et al. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, n. March 2016, p. 168–173, 2017.

SOARES, P. A. G. et al. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 389–395, 2012.

SOMAVARAPU, S.; VEMULA, S.; REDDY, I. B. Extraction, purification and characterization of a novel cysteine protease from the latex of plant *Vallisneria spiralis*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 186–198, 2018.

SOSA, F. H. B. et al. Measurement and correlation of phase equilibria in aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol (2000, 4000, and 6000) and sulfate salts (manganese sulfate and copper sulfate) at different temperatures (298.15, 318.15, and 338.15 K). **Fluid Phase Equilibria**, v. 449, p. 68–75, 2017.

SOUZA JR., E. C. DE et al. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 973, p. 84–88, 2014.

SOUZA, L. F. et al. *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) leaves: Chemical composition and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1–12, 2016.

SUN, Q. et al. Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. **FOOD CHEMISTRY**, v. 213, p. 708–713, 2016.

TAKEITI, C. Y. et al. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 148–160, 2009.

WAGLAY, A.; KARBOUNE, S.; ALLI, I. Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties. **Food Chemistry**, v. 142, p. 373–382, 2014.

WANDERLEY, M. et al. Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium spp.* UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **Protein Expression and Purification**, v. 133, p. 8–14, 2017.

WIJESEKARA, I. et al. Different extraction procedures and analysis of protein from *Ulva sp.*

in Brittany , France. **Journal of applied phycology**, v. 29, p. 2503–2511, 2017.

WU, W. et al. Single step purification of bromelain from *Ananas comosus* pulp using a polymer/salt aqueous biphasic system. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 0, p. 1–5, 2017.

YAVARI, M. et al. Partitioning of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* (ATCC 21424) using PEG-K₂HPO₄ aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 337, p. 1–5, 2013.

YU, X. et al. Phase equilibria of CsCl-polyethylene glycol (PEG)-H₂O at 298.15 K: Effect of different polymer molar masses (PEG1000/4000/6000). **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 135, p. 45–54, 2019.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical chemistry and bioanalytical applications**. New York: Marcel Decker, 1995.

ZHANG, C. et al. How Does Alkali Aid Protein Extraction in Green Tea Leaf Residue : A Basis for Integrated Biorefinery of Leaves. **Plos One**, v. 10, p. 1–14, 2015.

ZHANG, C.; SANDERS, J. P. M.; BRUINS, M. E. Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, n. 0, p. 466–472, 2014.

ZHANG, D. Q. et al. Comparative study of potato protein concentrates extracted using ammonium sulfate and isoelectric precipitation. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 2113–2127, 2017.

ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity , and its implication for biocatalysis using ionic liquids. **Journal of molecular catalysis**, v. 37, p. 16–25, 2005.

ZHU, X.; ZHANG, H. Optimization of [C_nPy] Cl (n = 2,4, 6) ionic liquid aqueous two-phase system extraction of papain using response surface methodology with box-behnken design. **Process Biochemistry**, v. 77, p. 113–121, 2019.

ZOHDI, N. K.; AMID, M. Optimization of extraction of novel pectinase enzyme discovered in red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Peel. **Molecules**, v. 18, p. 14366–14380, 2013.