



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**KLEBER VÂNIO GOMES BARROS**

**SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS NaPA/PEG APLICADO  
NA PURIFICAÇÃO DE PROTEASES PRODUZIDAS POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS**

BRASÍLIA  
2014

**KLEBER VÂNIO GOMES BARROS**

**SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS NaPA/PEG APLICADO  
NA PURIFICAÇÃO DE PROTEASES PRODUZIDA POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Área de concentração:** Fármacos, Medicamentos e Cosméticos.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

BRASÍLIA  
2014

**KLEBER VÂNIO GOMES BARROS**

**SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS NaPA/PEG APLICADO  
NA PURIFICAÇÃO DE PROTEASES PRODUZIDA POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

(Presidente)

Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

(Membro titular interno)

Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Luis Alberto Simeoni

(Membro titular interno)

Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

(Membro titular externo)

Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges

(Membro titular externo)

Universidade Católica de Goiás

BRASÍLIA

2014

Dedico este trabalho ao meu pai Luiz (*in memoriam*) e minha mãe Terezinha pelo amor e dedicação. A minha esposa Janaína por estar sempre ao meu lado e ser minha companheira incondicional. A nossa filha Sofia pelo sorriso e seu significado. As minhas irmãs Kelaine, Kilmara e Katiane, pelas palavras de apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Professora Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista pela orientação, ensinamentos e confiança depositada durante todo este projeto.

Aos professores Dra. Damaris Silveira, Dra. Yris Fonseca e Dr. Maurício Homem de Mello do Laboratório de Controle da Qualidade de Fármacos e Medicamentos pelo suporte na realização das minhas atividades.

Ao professor Dr. Adalberto Pessoa Junior e aos colegas Jorge Pereira e Sônia Ventura do Laboratório de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico da Universidade de São Paulo - USP pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Edivaldo Ximenes Ferreira Filho e o grupo de estudo do Laboratório de Enzimologia Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília pelo suporte dado para execução das atividades.

A todos os colegas do Laboratório de Controle da Qualidade de Fármacos e Medicamentos; Daniela, Diegue, Leonardo, Luana, Marcela, Márcia, Michelle, Monalisa, Patrícia, Paula, Raquel, Renata, Samuel e todos os demais que através da colaboração diária e troca de experiência tornaram possível este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio e acolhimento.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro concedido.

## RESUMO

O desenvolvimento de metodologias que permitam a purificação de biomoléculas de interesse industrial é alvo de estudo devido sua importância comercial. Foi avaliada a purificação de proteases produzidas pelos fungos isolados do Cerrado, *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* por extração líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas (ATPS), composto por polietilenoglicol (PEG) e poliácido acrílico de sódio (NaPA). As duas fases no ATPS NaPA/PEG foram formadas através da mistura dos polímeros com um sal (NaCl) e caldo fermentado de *P. fellutanum* ou *P. restrictum*. Para os sistemas formados com o caldo fermentado de *P. restrictum* foram estudados o efeito da massa molar de PEG (2000, 4000 e 6000 g.mol<sup>-1</sup>), concentração de PEG (4, 6, 8 e 10% p/p), concentração de NaPA (4, 6, 8, 10, 15 e 20% p/p) e concentração do caldo fermentado (25, 35 e 45% p/p) na partição da enzima a 25 °C. Os valores do coeficiente de partição (K) obtidos variavam de 0,06 a 37,73, mostrando a versatilidade do método para a purificação da biomolécula sob investigação. Na maioria dos sistemas analisados conseguiu-se a partição da biomolécula de interesse para a fase oposta àquela das proteínas totais, proporcionando assim efetiva purificação da enzima. O maior K (partição preferencial na fase rica PEG) foi obtido usando-se: concentração de NaPA igual a 20% p/p, concentração de PEG 2000g.mol<sup>-1</sup> igual a 4% p/p e concentração de caldo fermentado igual a 45% p/p. Para grande número dos sistemas analisados foram obtidos elevados valores referentes ao balanço de massa (BM) indicando a estabilidade da enzima em relação aos componentes do sistema. Diversos sistemas analisados apresentaram elevados níveis de rendimentos ( $\eta$ ) – alguns acima de 90%. Para os sistemas formados com o caldo fermentado de *P. fellutanum* foram analisados o efeito da massa molar de PEG (2000, 4000 e 6000 g.mol<sup>-1</sup>), a concentração de PEG (3, 6, 8 e 10 % p/p) e a concentração de NaPA (6, 8, e 10 % p/p) sobre o coeficiente de partição (K) a 25°C. Também foi analisada a influência da concentração de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5, 10 e 15% p/p) na reextração da enzima. Os valores do coeficiente de partição K obtidos variaram de 1,21 até 77,51. A partição na fase superior foi maior em sistemas com maior concentração de NaPA, maior massa molar de PEG e menor concentração de PEG. Usando a estratégia de reextração foi possível direcionar a partição da protease para a fase oposta às demais proteínas, proporcionando assim uma etapa de pré-purificação da biomolécula. Os resultados obtidos através dos ATPS NaPA/PEG e posterior reextração com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> demonstraram as potencialidades do método no processo de pré-purificação de proteases a partir dos caldos fermentados de *P. restrictum* e *P. fellutanum*.

Palavras-chaves: ATPS, protease, *Penicillium restrictum*, *Penicillium fellutanum*

## ABSTRACT

The development of methodologies allowing purification of biomolecules of industrial interest is target of study because of its commercial importance. The partition of proteases produced by fungi of the Brazilian Cerrado, *Penicillium fellutanum* and *Penicillium restrictum*, in aqueous two-phase system (ATPS) composed of polyethylene glycol (PEG) and sodium polyacrylate (NaPA) was evaluated. The two phases in ATPS NaPA/PEG were formed by mixing the polymers with a salt (NaCl) and fermented broth of *P. fellutanum* or *P. restrictum*. For those systems formed with fermented broth of *P. restrictum* were studied the effect of molecular size of PEG (2000, 4000 and 6000 g.mol<sup>-1</sup>), PEG concentration (4, 6, 8 and 10% w/w), concentration NaPA (4, 6, 8, 10, 15 and 20% w/w) and fermented broth concentration (25, 35 and 45% w/w) in partitioning of enzyme at 25°C. The values of partition coefficient (K) obtained varied from 0.064 to 37.73, showing the versatility of the method for the purification of the biomolecule under investigation. In most systems examined it was achieved the partition of biomolecule in the opposite phase to that of total proteins and thus provide effective enzyme purification. The highest K (preferential partitioning in PEG-rich phase) was obtained using: 20% w/w of NaPA concentration, 4% w/w of PEG 2000 g.mol<sup>-1</sup> and 45% w/w of broth concentration. For large number of systems analyzed, high values of BM were obtained indicating the stability of the enzyme in relation to system components. Several systems analyzed showed high levels of yield ( $\eta$ ) - some over 90%. For those systems formed with the fermented broth of *P. fellutanum* were analysed the effect of molecular size of PEG (2000, 4000 and 6000 g.mol<sup>-1</sup>), PEG concentration (3, 6, 8 and 10% w/w) and NaPA concentration (6, 8, and 10% w/w) over the partition coefficient (K) at 25°C. It was also analyzed the influence of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration (5, 10 and 15% w/w) in the re-extraction of the enzyme. The values of partition coefficient K obtained ranged from 1.21 to 77.51. The partition in the upper layer was greater in systems with higher NaPA concentration, higher PEG molecular weight and lower PEG concentration. By using the re-extraction strategy it was possible to partition the target protease to the opposite phase to the other proteins, thereby providing a pre-purification step of the biomolecule. The results obtained by ATPS NaPA/PEG/NaCl and subsequent re-extraction with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> demonstrated the potential of this method in the pre-purification of proteases from the fermentation broth of *P. restrictum* and *P. fellutanum*.

Key words: ATPS, protease, *Penicillium restrictum*, *Penicillium fellutanum*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Filograma com os principais grupos de fungos e relações filogenéticas - adaptada de Kanagawa, 2011. .... 4
- Figura 2 - Ciclo genérico de desenvolvimento morfológico de fungos filamentosos em cultivo - adaptada de Posch, 2013. .... 5
- Figura 3 - Fotos de colônia de *P. restrictum* (esquerda) e *P. fellutanum* em placa (meio PDA)... 6
- Figura 4 – Esquema de via secretora hipotética de fungos filamentosos (adaptada de Peberdy, 1994 com alterações). .... 7
- Figura 5 - Esquema de hidrólise de uma ligação peptídica - figura adaptada de Brix, 2013 com modificações, onde PN e PC representam os dois produtos formados a partir da hidrólise da ligação peptídica. .... 12
- Figura 6 - Esquema da classificação das proteases por especificidade - adaptada de Brix, 2013 com alterações. .... 13
- Figura 7 – Diagrama de fases de um sistema formado por PEG/Fosfato de Potássio - adaptado de Forciniti, 1991a, com alterações. Curva de coexistência ou curva binodal de um ATPS constituído por PEG/Fosfato de potássio a 20°C. B: composição inicial do sistema; A: composição do sistema na fase superior após equilíbrio; C: composição do sistema na fase inferior após equilíbrio. .... 19
- Figura 8 - Esquema simplificado do isolamento de fungos filamentosos. .... 24
- Figura 9 - Esquema para obtenção do caldo de cultivo contendo proteases expressas por fungos filamentosos. .... 25
- Figura 10 - Esquema do procedimento experimental para a partição a partir de caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* como ATPS NaPA/PEG/NaCl - adaptado de Perreira, 2008, com alterações. 1- Tubo de ensaio graduado contendo todos os componentes do sistema: NaPA, PEG, NaCl, tampão e caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum*; 2 – Agitação em orbital de tubo de ensaio durante 20 min e obtenção de sistema monofásico; 3 – Separação de fases e coleta das amostras (fase superior e inferior) para análises subsequentes. .... 27
- Figura 11 - Diagrama representativo da reextração realizada a partir da fase superior do ATPS NaPA/PEG/NaCl e caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* com a adição de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - adaptada de Perreira, 2008, com alterações. .... 28
- Figura 12 – Fotos do sistema bifásico aquoso obtido a partir do caldo fermentado de *Penicillium restrictum* com NaPA/PEG/NaCl. .... 32
- Figura 13 - Diagrama de Pareto para as variáveis de concentração NaPA, a concentração de PEG e o massa molar de PEG sobre o coeficiente de partição da protease. 1 = Concentração de NaPA (%p/p), 2 = Concentração de PEG (%p/p) e 3 = Massa molar de PEG (g.mol<sup>-1</sup>). .... 36

Figura 14 - Gráfico de contorno representando os valores do coeficiente de partição relacionados com concentração de NaPA e massa molar do PEG. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), MMPEG = Massa molar de PEG ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional). ..... 37

Figura 15 - Gráfico de contorno representando os valores do coeficiente de partição relacionados com concentração de NaPA e concentração de PEG. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional). ..... 38

Figura 16 - Gráfico de superfície de resposta relacionando o coeficiente de partição em função da variação da concentração de NaPA e concentração de PEG  $2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , em ATPS contendo 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a  $25^\circ\text{C}$ . [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional). ..... 39

Figura 17 - Gráfico de superfície de resposta relacionando o coeficiente de partição em função da variação da concentração de NaPA e da massa molar do PEG, em ATPS contendo 6% p/p de PEG e 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a  $25^\circ\text{C}$ . [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), MMPEG = Massa molar de PEG ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional). ..... 40

Figura 18 - Diagrama de Pareto para as variáveis de concentração NaPA, a concentração de PEG e concentração de caldo fermentado de *Penicillium restrictum* sobre o coeficiente de partição da protease. 1 = Concentração de NaPA (%p/p), 2 = Concentração de PEG (%p/p) e 3 = Concentração do caldo (%p/p). ..... 45

Figura 19 - Gráfico de contorno representando os valores do coeficiente de partição relacionados com concentração de NaPA e concentração de PEG em sistemas com concentração de 45% p/p de caldo fermentado de *Penicillium restrictum*. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional). ..... 47

Figura 20 - Gráfico de contorno representando os valores do coeficiente de partição relacionados com concentração de NaPA e concentração de caldo fermentado de *Penicillium restrictum* em sistemas com concentração de 4% p/p de PEG. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [Caldo] = Concentração do caldo fermentado (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional). ..... 48

Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta relacionando o coeficiente de partição em função da variação da concentração de NaPA e concentração de PEG  $2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , em ATPS contendo 45% p/p de caldo de *Penicillium restrictum* e 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a  $25^\circ\text{C}$ . [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional). ..... 49

Figura 22 - Gráfico de superfície de resposta relacionando o coeficiente de partição em função da variação da concentração de NaPA e concentração de caldo fermentado de *Penicillium restrictum*, em ATPS contendo 4% p/p de PEG e 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a  $25^\circ\text{C}$ . [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [Caldo] = Concentração de caldo fermentado (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional). ..... 50

Figura 23 – Fotos do sistema bifásico aquoso obtido a partir do caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* com NaPA/PEG/NaCl. .... 51

Figura 24 - Diagrama de Pareto para as variáveis de concentração NaPA, a concentração de PEG e massa molar de PEG sobre o coeficiente de partição da protease. 1 = Concentração de NaPA (p/p %), 2 = Concentração de PEG (p/p %) e 3 = massa molar de PEG ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )..... 54

Figura 25 - Gráfico de resposta de superfície relacionando o coeficiente de partição (K) em função da concentração de NaPA e concentração de PEG ( $6000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) em ATPS contendo com 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a 25°C. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional). .... 56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Importantes produtos de aplicação industrial obtidos de fungos filamentosos - adaptada de Gibbs et al., 2000 com alterações.....	10
Tabela 2 - Classificação de proteases de acordo com seu sítio catalítico (Zanin e Morais, 2004). .....	14
Tabela 3 – Níveis e valores referentes às variáveis independentes utilizadas na avaliação da partição da protease expressa por <i>Penicillium restrictum</i> . Concentração de NaPA, concentração de PEG e massa molar de PEG. ....	32
Tabela 4 - Resultados obtidos para o planejamento fatorial $2^3$ com os parâmetros: concentração de NaPA (6-10% p/p), concentração de PEG (6-10% p/p) e massa molar de PEG (2000-6000g.mol <sup>-1</sup> ). ....	35
Tabela 5 - Níveis e valores referentes às variáveis independentes utilizadas na avaliação da partição da protease expressa por <i>Penicillium restrictum</i> . Concentração de NaPA, concentração de PEG e concentração de caldo fermentado. ....	41
Tabela 6 - Resultados obtidos para o planejamento fatorial $2^3$ com os parâmetros: concentração de NaPA (10-20% p/p), concentração de PEG (4-8% p/p) e concentração de caldo fermentado de <i>Penicillium restrictum</i> (25-45% p/p).....	44
Tabela 7 - A análise de variância (ANOVA) que representa a partição da protease expressa por <i>Penicillium restrictum</i> em ATPS NaPA/PEG/NaCl. ....	46
Tabela 8 – Níveis e valores referentes às variáveis independentes utilizadas na avaliação da partição da protease expressa por <i>Penicillium fellutanum</i> . Concentração de NaPA, concentração de PEG e massa molar de PEG. ....	51
Tabela 9 - Resultados obtidos para o planejamento fatorial $2^3$ com os parâmetros: concentração de NaPA (6-10% p/p), concentração de PEG (6-10% p/p) e massa molar de PEG (2000-6000 g.mol <sup>-1</sup> ). ....	53
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) que representa a partição da protease expressa por <i>Penicillium fellutanum</i> em ATPS NaPA/PEG/NaCl.....	55
Tabela 11 - Resultados obtidos para o coeficiente de partição (K), balanço de massa (BM), razão volumétrica (R) e rendimento ( $\eta$ ), utilizando 7% p/p de NaPA e 3% p/p de PEG6000g.mol <sup>-1</sup> ....	57
Tabela 12 – Resultados da reextração realizada a partir da fase superior do sistema bifásico aquoso NaPA (10% em p/p)/PEG 2000g.mol <sup>-1</sup> (6% em p/p)/NaCl (1,05% em p/p) com diferentes concentrações de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ....	57

## ABREVIATURAS

ATPS – Sistema de duas fases aquosas

BM - balanço de massa (%)

Cs - Atividade da protease na fase superior (U -  $\mu\text{mol/mL/mim}$ )

Ci - Atividade da protease na fase inferior (U -  $\mu\text{mol/mL/mim}$ )

Co - Atividade da protease no caldo fermentado adicionado ao sistema (U -  $\mu\text{mol/mL/mim}$ )

CRt - Atividade da protease na fase onde é extraída em maior proporção (U -  $\mu\text{mol/mL/mim}$ )

CLA - comprimento da linha de amarração

$C_{C2}^S$  - concentração do componente 2 na fase superior

$C_{C2}^I$  - concentração do componente 2 na fase inferior

$C_{C1}^S$  - concentração do componente 1 na fase superior

$C_{C1}^I$  - concentração do componente 1 na fase inferior

Pf – Fator de purificação (adimensional)

NaPA - poliacrilato de sódio

K - coeficiente de partição (adimensional)

Kp – coeficiente de partição das proteínas totais (adimensional)

$K_{\text{eletro}}$  - fator eletroquímico (adimensional)

$K_{\text{hifob}}$  - fator de afinidade hidrofóbica (adimensional)

$K_{\text{bioesp}}$  - fator de afinidade bioespecífica (adimensional)

$K_{\text{tam}}$  - fator tamanho (adimensional)

$K_{\text{conf}}$  - fator de conformação (adimensional)

$K^0$  - valor inicial de K (adimensional)

PEG - polietilenoglicol

R - razão volumétrica (adimensional)

SBA – Sistema bifásico aquoso

S – Seletividade (adimensional)

STL - “tie-line slope”

TMF – linha de amarração ou “tie-line”

TLL - “tie-line length”

Vs - volume da fase superior (mL)

Vi - volume da fase inferior (mL)

Vo - volume do caldo fermentado adicionado ao sistema (mL)

VT - volume total da fase na qual a protease é extraída em maior proporção (mL)

$X_i$  - variável independente

$y$  - variável dependente

$\eta$  - rendimento (%)

$\beta$  - coeficiente de regressão

$\varepsilon$  - erro observado

## SUMÁRIO

1 - Introdução .....	1
2.1 Cerrado .....	3
2.2 Fungos .....	4
2.3 – Produtos de aplicação industrial obtidos a partir de fungos. ....	6
2.4 – Proteases .....	12
2.5 - Sistemas de Duas Fases Aquosas .....	17
3 - Objetivos .....	23
4 – Material e Métodos.....	24
4.1 - Fungos filamentosos.....	24
4.2 - Manutenção das cepas .....	25
4.3 - Obtenção da protease para avaliação do coeficiente de partição. ....	25
4.4 - Quantificação da atividade proteolítica .....	26
4.5– Quantificação de proteínas totais.....	26
4.6 - Cálculo do coeficiente de partição, balanço de massa, razão volumétrica, rendimento fator de purificação e seletividade.....	26
4.7 - Desenho experimental .....	30
4.8 - Otimização da partição.....	30
5 - Resultados e Discussão .....	31
5.1. Produção de proteases .....	31
5.2 - Purificação de protease expressa por <i>Penicillium restrictum</i> .....	31
5.3 - Purificação de protease expressa por <i>Penicillium fellutanum</i> . ....	50
6 – Conclusões .....	59
6.1 – Partição da protease expressa por <i>Penicillium restrictum</i> . ....	59
6.2 – Partição de protease expressa por <i>Penicillium fellutanum</i> . ....	59
7 – Referências bibliográficas .....	61

## 1 - Introdução

As enzimas possuem elevado grau de especificidade por seus substratos, acelerando reações químicas específicas. As enzimas têm se convertido em ferramentas importantes, não apenas na medicina como também na indústria química, alimentícia e farmacêutica (Hsiao et al., 2014).

As proteases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. A ligação peptídica é a ligação que une os aminoácidos para formar peptídeos e proteínas. A hidrólise das ligações peptídicas é fundamental para a determinação da composição em aminoácidos das proteínas (Lehninger, 2007). São classificadas como peptídeo-hidrolases ou peptidases (EC 3.4) e constituem uma grande família, dividida em endopeptidases (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada. Também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que apresentam maior atividade: ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,0-8,0) e básicas (pH 8,0-13,0) (Rao, Tanksale et al., 1998)

As proteases apresentam ampla aplicação industrial, com emprego em diversos processos biológicos, químico-farmacêuticos, alimentícios e têxteis. Na indústria química, por exemplo, são utilizadas em detergentes para limpeza de materiais proteináceos sem entretanto, alterarem a cor e demais características dos tecidos (Santos, 1995; Deng et al., 2010). O mercado mundial de enzimas industriais está estimado em torno de 1,7 a 2,0 bilhões de dólares e acredita-se que a comercialização mundial dessas substâncias movimente aproximadamente 225 milhões de dólares anualmente (Satyanarayana et al., 2006). Em 2010 o mercado mundial de enzimas foi estimado em 3,3 bilhões de dólares podendo chegar em 4,4 bilhões em 2015 (Sanatan et al., 2013).

Os microorganismos representam uma fonte atraente de proteases uma vez que podem ser cultivados em grandes quantidades, em um período de tempo relativamente curto por meio estabelecido de métodos de fermentação, produzindo uma quantidade abundante e regular do produto desejado. Além disso, as proteínas microbianas podem ser armazenadas durante semanas sem perda significativa de atividade. Em geral, as proteases microbianas são de natureza extracelular e são diretamente segregadas para o caldo de fermentação, diminuindo as etapas para a purificação da enzima em comparação com as proteases obtidas a partir de plantas e animais (Gupta et al., 2002).

A pesquisa, desenvolvimento e otimização de métodos eficientes e econômicos para a purificação de macromoléculas é uma das áreas de maior interesse dentro da biotecnologia.

Biomoléculas podem ser separadas e purificadas por meio da partição entre duas fases de polímeros imiscíveis. Através deste método as macromoléculas podem ser separadas de acordo com as suas propriedades de superfície e características dos componentes do sistema. A separação pode ser baseada no tamanho, carga elétrica e características hidrofílicas (Padilha, 2010; Mazzola et al. 2008; Santana, 2006; Asenjo, 1990).

Diante deste cenário, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos de purificação que sejam eficientes, práticos e que apresentem custo reduzido é de grande interesse em diversas áreas industriais (Pereira, 2005; Mazzola et al., 2008). Desta forma propõe-se o estudo de sistemas bifásicos aquosos (ATPS) compostos por polietilenoglicol (PEG) e poliacrilato de sódio (NaPA). Os sistemas bifásicos aquosos (ATPS) apresentam-se como uma opção na purificação de proteínas em comparação aos sistemas formados por solventes orgânicos e outras técnicas de pré-purificação.

## 2 – Revisão da literatura

### 2.1 Cerrado

O Cerrado está localizado na região central do Brasil, estendendo-se pelos Estados do Pará, Piauí, Maranhão, Bahia, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Minas Gerais e Distrito Federal (Klink e Machado, 2005; Sano et al., 2008).

Devido a sua grande extensão – cerca de 2,00 milhões de quilômetros quadrados – o Cerrado é considerado o segundo maior bioma do Brasil. O bioma amazônico ocupa a primeira posição. O Cerrado ocupa mais de 20 graus de latitude e 10 graus de longitude e contém uma das mais ricas floras dentre as savanas mundiais, com 11.000 espécies já devidamente catalogadas (Mendonça et al. 1998; MMA, 2011). Sua importância também se baseia no fato de conter em seu território as três maiores bacias hidrográficas sul-americanas, além de possuir diversas nascentes de rios e contribuir para grande parte das bacias hidrográficas brasileiras (Mittermeyer et al. 1999; MMA, 2005).

O Brasil apresenta grande biodiversidade representada pela sua riqueza em relação à fauna e flora. O país detém cerca de 10% do número total de espécies conhecidas na Terra, apresentando grande diversidade de plantas, fungos e animais (Hogan et al, 2002; Alho, 2008).

Um terço da biodiversidade brasileira e cerca de 5% da flora e fauna mundiais encontram-se no Cerrado, sendo desta forma considerada como a savana de maior diversificação no mundo (Hogan et al, 2002; Sawyer, 2002). Dentre as espécies encontradas, destacam-se fungos, insetos e angiospermas que são apontados como responsáveis por 87% do montante geral (Dias, 1992; Ratter e Ribeiro, 1996).

Grande parte destas espécies se encontram abrigadas em zonas específicas, sem disseminação mais ampla, tornando elevado o risco de extinção em caso de destruição do Cerrado (Janzen, 1988; Hogan et al, 2002; Sawyer, 2002; Klink e Machado, 2005).

O Cerrado, além da mata atlântica, é considerado uma das 25 “*hotspots*” mundiais (Myers et al; 2000), regiões com elevada concentração de espécies endêmicas e uma expressiva perda de seus *habitats* devido à destruição ambiental (Myers et al; 2000; MMA, 2005).

De clima predominantemente tropical e sazonal - invernos secos e verões chuvosos – o Cerrado apresenta solo de baixa fertilidade, rico em alumínio e com pH ácido. Dispõe de vegetação composta por árvores de médio porte, arbustos, plantas herbáceas e gramíneas (Zafred, 2011). O Cerrado apresenta temperatura média anual entre 20°C e umidade relativa do ar em

torno de 60%. Apresenta índice pluviométrico anual em torno de 800 a 1.800 mm disposto entre uma estação chuvosa e uma seca que pode se estender de três, quatro ou até sete meses (Nimer e Brandão, 1989; Ledru, 2002).

## 2.2 Fungos

São conhecidas em torno de 75.000 espécies de fungos que atuam como os principais agentes decompositores naturais nos mais diversos ambientes. Entretanto, algumas estimativas indicam que possam existir em torno de 1,5 milhão de espécies (Hawksworth et al., 1995; Kanagawa, 2011). Os fungos podem ser classificados em quatro grupos: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e Chytridiomycota (Kanagawa, 2011). A Figura 1 apresenta a relação filogenética entre os grupos, demonstrando a proximidade entre Ascomycota e Basidiomycota (Kanagawa, 2011).

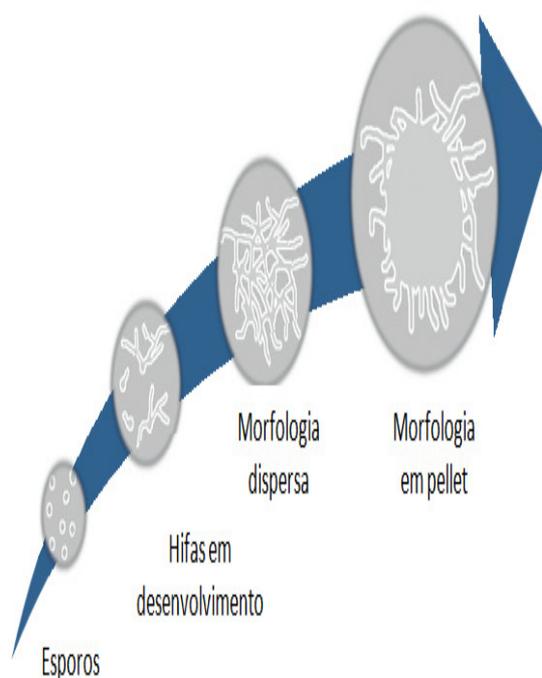


**Figura 1** - Filograma com os principais grupos de fungos e relações filogenéticas - adaptada de Kanagawa, 2011.

O gênero *Penicillium* pertence ao filo *Ascomycota* e pode colonizar diversos ambientes diferentes tais como; solo, ar e alimentos (Leitão, 2009; Banke, 1997). Embora sua classificação taxonômica já tenha sido alvo de vários estudos, o assunto ainda é matéria de discussão. Com o avanço dos estudos na área, diversas abordagens têm sido utilizadas na classificação do gênero, como a análise combinada de características macroscópicas, tais como cor e textura das colônias e aspectos micromorfológicos, análise de imagens, padrões de isoenzimas, sistemas de ubiquinonas e técnicas baseadas na análise do DNA (Raper, 1949; Chistensen, 1994; Dorge, 2000; Leitão, 2009 e Houbraken, 2014). A taxonomia polifásica baseada na aplicação combinada

de diversos destes métodos tem sido implementada na classificação entre diferentes espécies (Houbraken, 2014).

Morfologia e características de crescimento fúngico podem explicar em grande parte a sua versatilidade na rápida colonização de diversos substratos (Leitão, 2009). Fungos podem formar *pellets* de acordo com vários fatores, tais como composição do meio, concentração do inóculo, intensidade de agitação, fontes de carbono e nitrogênio, entre outros (Cox, 1998; Posch 2013). Estudos têm procurado demonstrar que a densidade de empacotamento dos pellets pode limitar a disponibilidade de nutrientes e oxigênio no centro da estrutura de fungos do gênero *Penicillium* (Cronenberg, 1994). A Figura 2 apresenta o ciclo genérico de desenvolvimento morfológico de fungos filamentosos em cultivo. A Figura 3 apresenta fotos de colônias dos fungos *P. restrictum* e *P. fellutanum* em placa (meio PDA - batata, dextrose e ágar).



**Figura 2** - Ciclo genérico de desenvolvimento morfológico de fungos filamentosos em cultivo - adaptada de Posch, 2013.



**Figura 3** - Fotos do crescimento do fungo *P. restrictum* (esquerda) e *P. fellutanum* em placa (meio PDA).

Existem diferentes estimativas sobre a diversidade mundial de fungos. O número total de espécies varia desde; 712 mil até 5,1 milhões (Hawksworth, 2001; O'Brien et al., 2005; Schmit e Mueller, 2007). Em relação ao número de espécies de fungos nativos que foram identificados ou recolhidos no Brasil não existem registros precisos. Alguns pesquisadores apontam a existência de 4.325 espécies de fungos brasileiros (Minter e Silva, 2007). Forzza e colaboradores por sua vez registram 78 ordens, 924 gêneros e 3.608 espécies (Forzza et al., 2010).

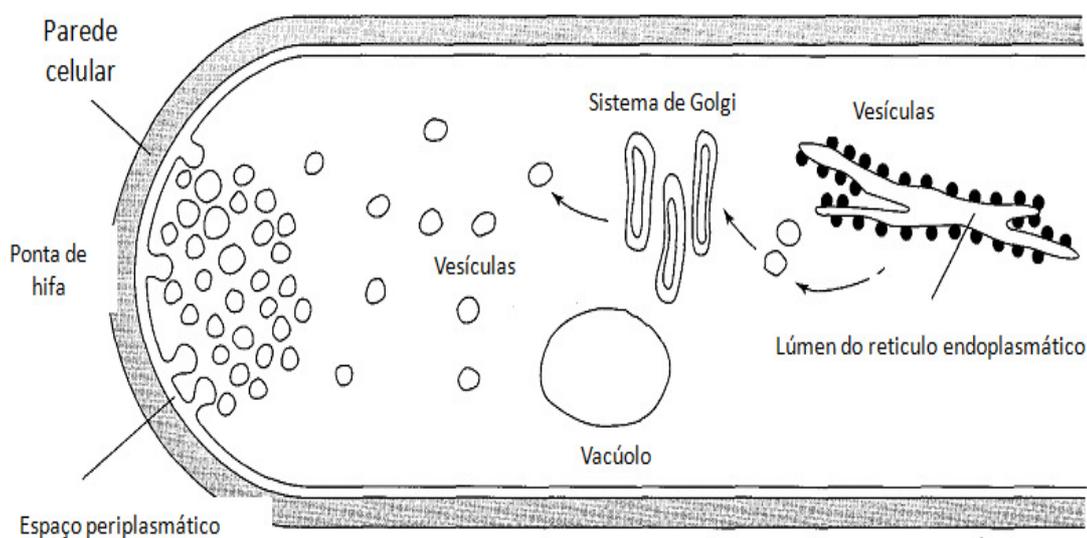
### **2.3 – Produtos de aplicação industrial obtidos a partir de fungos.**

Vários produtos de importância industrial derivam do metabolismo dos fungos. Podem ser citados alimentos, aditivos diversos usados na indústria alimentícia, bebidas fermentadas, pigmentos aplicados em diversas áreas, enzimas de aplicação industrial, vitaminas, antibióticos, biocombustíveis, ácidos graxos e ácidos orgânicos (Kavanagh, 2005; Posch, 2013).

Os fungos filamentosos têm crescente papel na obtenção e produção em larga escala de enzimas com diversas aplicações que se estendem desde a fabricação de ração animal até branqueamento da celulose (Eggins, 2001; Nevalainen, 2003; Bueno et al., 2003).

A Figura 4 apresenta uma via secretora hipotética em fungos filamentosos. Inicialmente as proteínas a serem secretadas são transportadas para o lúmen do retículo endoplasmático (RE). Logo em seguida são transportadas por vesículas até o complexo de Golgi, ou estrutura equivalente. No final do processo, novas vesículas transferem as moléculas para a ponta das hifas onde ocorre a fusão com a membrana plasmática e liberação de seu conteúdo para o espaço periplasmático (Peberdy, 1994).

Fungos filamentosos produzem diversos ácidos orgânicos, polissacarídeos, reguladores do crescimento de plantas, enzimas, alcalóides, pigmentos e antibióticos. Além dos  $\beta$ -lactâmicos, classicamente obtidos a partir das espécies *Penicillium* e *Cephalosporium*, atualmente diversas classes de antibióticos são produzidas por outros fungos tais como Ciclosporinas por *Tolypocladium inflatum* e ácido fusídico por *Acremonium fusidiodes* (Hesham, 2007). Cerca de dez antibióticos, produzidos comercialmente, são provenientes de fungos (Valsechi, 2008). A gama de produtos derivados do metabolismo de fungos com aplicação comercial é ampla (Hesham, 2007). Além disso, tem crescido o interesse em desenvolver e aperfeiçoar estratégias que possibilitem o melhor controle e predição de resultados em bioprocessos que envolvam fungos filamentosos e a produção de enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos (Porsch, 2013).



**Figura 4** – Esquema de via secretora hipotética de fungos filamentosos (adaptada de Peberdy, 1994 com alterações).

O interesse na obtenção de substâncias produzidas por fungos e que apresentem aplicação prática é crescente e tem demonstrado resultados animadores. A obtenção da aspartil protease extracelular Eap1 a partir de *Sporisorium reilianum* foi caracterizada tanto em meio sólido como em líquido (González, 2013).

Cepas dos fungos filamentosos *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Graphium* sp. após serem isoladas do efluente de indústria de aço, foram testados quanto a capacidade de degradar fenol. Os resultados demonstraram atividade de catecol 1,2-dioxigenase e fenol hidroxilase nos extratos de células livres. Diversos são os processos industriais nos quais seus efluentes apresentam derivados fenólicos, tais como aqueles derivados de petroquímicas, refinarias, indústrias de cerâmicas e de resinas fenólicas. As cepas dos fungos filamentosos demonstraram perspectiva promissora de sua aplicação na biodegradação de áreas poluídas devido a estas atividades econômicas (Santos, 2004).

Alguns fungos expressam sistemas enzimáticos lignolíticos extracelulares que além de degradarem lignina também tem capacidade de quebrar anéis fenólicos (Sánchez, 2009). A bioconversão como forma alternativa de tratamento de resíduos de destilarias, mostrou-se como uma alternativa promissora em comparação com outros métodos clássicos (Perdih et al., 1991).

Várias enzimas podem degradar a lignina, tais como lacases, lignina-peroxidase (LiP) e manganase-peroxidase (MnP) (Hamman, 2004; Steffen et al, 2007; Couto, 2007; Peng et al, 2008, Kunamneni, 2008). A produção de lacase em bioreatores foi avaliada a partir da fermentação de fungos filamentosos. Lacases apresentam aplicações no tratamento de efluentes, biorremediação de pesticidas, deslignificação na indústria de papel, descoloração têxtil, branqueamento de celulose e como aditivo na indústria de cosméticos (Couto, 2007; Kunamneni, 2008).

A crescente demanda de lacases destinadas à biorremediação, processos oxidativos indústrias e biodeslignificação necessita da produção de grandes quantidades de enzimas com custos baixos (Lettera, 2011). Estas enzimas têm sido alvo de estudos devido ao fato de usarem oxigênio molecular como acceptor eletrônico, ao invés de peróxido de hidrogênio como ocorre com as peroxidases (Couto, 2007). A produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* alcançou níveis próximos a 80 U/L (Lettera, 2011).

Diversos fungos filamentosos secretam de modo eficiente enzimas no meio onde se encontram (Bollag e Leonowicz, 1984; Agematu et al., 1993; Nevalainen, 2003). Algumas espécies expressam sistemas enzimáticos que podem ser utilizados para degradar materiais lignocelulolíticos e, por isto, uma grande variedade de poluentes (Junghanns et al., 2005; Sette et al., 2008; Mohammad, 2012). A expressão de hidrolases capacita determinadas cepas de fungos a decomporem polissacarídeos complexos (Sánchez, 2009).

Espécies de fungos filamentosos demonstraram aplicação na biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Mucor racemosus* apresentou significativos níveis de

degradação para benzopireno enquanto *Aspergillus sclerotiorum* demonstrou capacidade de depleção para o mesmo composto e adicionalmente para pireno (Passarini, 2011). O mecanismo de hidroxilação promovido por estas espécies de fungos filamentosos para ser mediado pelo citocromo P-450 monooxigenase, seguido posteriormente por uma conjugação com sulfato (Passarini, 2011).

A biodegradação dos efluentes de indústrias de óleos vegetais através de fungos filamentosos com atividade lignolítica foi analisada demonstrando resultados animadores. Alguns dos resíduos encontrados nestes efluentes são potencialmente danosos ao meio ambiente e requerem altos investimentos para seu tratamento usual (Mohammad, 2012).

*Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* var. *awamori* são fungos filamentosos que apresentam elevada produção de proteínas extracelulares. Sua utilização como biocatalisadores em diversos seguimentos industriais remonta a várias décadas (Nevalainen, 2003).

*Aspergillus níger* var. *awamori*, *A. oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, *Fusarium venenatum* e *Chrysosporium lucknowense* são algumas das espécies de fungos filamentosos usados para obtenção em larga escala de enzimas de aplicação industrial (Blinkovsky et al., 1999; van Zeijl et al., 2001; Nevalainen, 2003).

Os fungos filamentosos produzem diversas enzimas capazes de degradar material amiláceo em açúcar fermentável durante a fermentação de bebidas. Em estudo recente, *P. variotii* demonstrou atividade glucoamilase ( $3252 \pm 526$  U/g) e *A. oryzae* apresentou significativa ação  $\alpha$ -amilase ( $1491 \pm 324$  U/g) durante fermentação de licor (*Maotai*) que é consumido na China há séculos. Adicionalmente, durante a fermentação, a variação nas concentrações de amido e de açúcares redutores mostrou-se consistente com o crescimento de *P. variotii* e *A. oryzae* indicando que ambos podem desempenhar considerável papel na expressão de amilase (Chen, 2014).

Espécies do gênero *Penicillium* apresentam-se como meso e termofílicas além de boas produtoras de enzimas extracelulares, tais como lipases, proteases, celulasas e xilanases (Li e Zong, 2010).

A importância econômica dos fungos, entretanto, não está limitada à gama de produtos de seu metabolismo. Também é alvo de estudos o desenvolvimento e comercialização de novos produtos obtidos a partir da engenharia genética. O *Aspergillus niger* tem sido avaliado como importante espécie para a produção de diferentes proteínas de uso industrial (Hesham, 2007). A Tabela 1 apresenta uma lista de produtos obtidos a partir da fermentação com fungos filamentosos.

**Tabela 1-** Importantes produtos de aplicação industrial obtidos de fungos filamentosos - adaptada de Gibbs et al., 2000 com alterações.

Produtos	Microorganismos
Antibióticos	
Penicilinas G e V	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cefalosporina C	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium patulum</i>
Penicilina N	<i>Emericellopsis sp.</i>
Pleuromutilina	<i>Pleurotus mutilus</i>
Ciclosporina A	<i>Tolepocladium inflatum</i>
Ciclosporina A e B	<i>Cylinrocarpum lucidum</i>
Enzimas	
Glicose-oxidase, pectinase e fitase	<i>Aspergillus niger</i>
Xilanase e invertase	<i>Aspergillus awamori</i>
$\alpha$ -amilase e glucoamilase	<i>Aspergillus oryzae</i>
Celulase e hemicelulase	<i>Trichoderma reesei</i>
Proteases	<i>Aspergillus níger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. sojae</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Chaetomium sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Eladia sacculum</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium janthinellum</i> , <i>Penicillium griseoroseum</i> , <i>Rhizopus chinensis</i> , <i>Rhizopus oligosporous</i> .
Micotoxinas	
Aflatoxinas, ocratoxina e citrinina	<i>Aspergillus sp.</i>
Tricotecenos e zearalanona	<i>Fusarium sp.</i>
Citrinina, ocratoxina	<i>Penicillium sp.</i>
Outros produtos	
Riboflavina	<i>Ashbya gossypii</i>
Ácido cítrico e glicônico	<i>Aspergillus niger</i>
Ácido kójico e biotina	<i>Aspergillus oryzae</i>
Ácido itacônico	<i>Aspergillus terreus</i>
Pululano	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Biotina	<i>Fusarium culmorum</i>
Alcaloides de Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
Ácido giberélico	<i>Giberella fujikuroi</i>
Ácido linoleico	<i>Martierella isabellina</i>
$\beta$ -caroteno	<i>Phycomyces blakesleanus</i>

Classicamente algumas espécies de fungos filamentosos são produtores de proteases e testes foram desenvolvidos para sua detecção (Cowan and Daniel, 1982; Montville, 1983; Green, 1991; Leger et al., 1997; Ten et al., 2005).

Cepas de *Aspergillus sp.*, *A. flavus*, *Alternaria*, *Chaetomium* e *Cladosporium* demonstraram expressar proteases (Barthomeuf, 1988; Pourrat, 1979; Das et al., 1997). Fermentação em estado sólido foi utilizada para obtenção de proteases a partir de *Aspergillus oryzae* (Battaglino, 1991). Aspartil proteases, por exemplo, podem ser expressas por *Endothia parasitica*, *Rhizopus chinensis* (Subramanian et al., 1977), *Penicillium janthinellum* (Hsu et al., 1977) e *Mucor miehei* (Bech e Foltmann, 1981). Cepas de *Aspergillus niger* isoladas do solo demonstraram expressão de proteases ácidas durante fermentação em estado sólido (Mukhtar, 2009). Proteases ácidas também são produzidas por *A. oryzae* e *A. sojae* (Narahara et al., 1982; Yang e Hsing, 1998). Algumas cepas de *Aspergillus sp.*, *A. niger*, *A. flavus* e *A. terreus* mostraram-se produtoras de proteases alcalinas (Heneri et al., 1988; Gomma, 1989; Malathi e Chakraborty, 1991; Chakraborty et al., 2000). Estudo de Tunga (2003) detectou considerável atividade proteolítica para *Aspergillus parasiticus*.

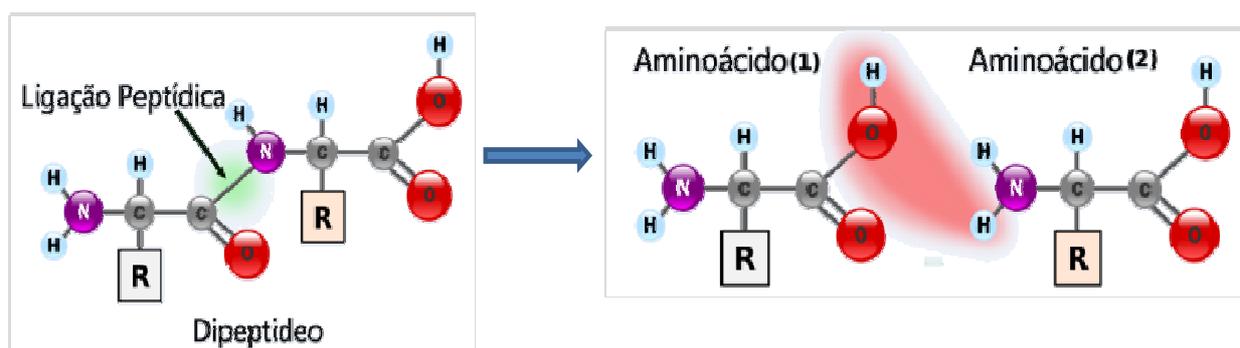
O subproduto agrícola, farelo de soja, foi utilizado para a produção de proteases a partir de *Penicillium griseoroseum* (Haq, 2004). Farelo de arroz foi utilizado para obtenção de proteases durante a fermentação com cepas de *Rhizopus oligosporus* (Ikasari, 1994). Fontes de carbono e nitrogênio mostraram influência sobre a expressão de proteases por *A. niger* em fermentações utilizando farelo de girassol como substrato (Mukhtar, 2009).

Foi realizada a caracterização de proteases e amilases produzidas por diversos gêneros de fungos filamentosos - *Eladia sacculum*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Alternaria* - utilizados na indústria da celulose. A purificação parcial enzimática foi realizada para a macromolécula expressa por *Eladia sacculum*, obtendo-se uma protease básica com ponto isoelétrico igual a 8,9 (Rojas, 2009).

Uma protease queratinolítica extracelular foi purificada e caracterizada a partir de *Aspergillus parasiticus* (Anitha, 2013). Estas enzimas apresentam ampla aplicação em biotecnologia e indústria farmacêutica. Queratina forma um importante componente da epiderme e seus apêndices, tais como pêlos, penas, unhas, chifres, cascos e lã. Deste modo, proporcionar a degradação das penas de galinhas é uma de suas principais aplicações, reduzindo a poluição ambiental (Grazziotin, 2006; Anitha, 2013). Estudos recentes têm demonstrado que muitas espécies de *Aspergillus*, tais como *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. terreus* secretam queratinases (Santos, 1996; Kim, 2003; Farag, 2004).

## 2.4 – Proteases

Proteases (peptidases ou peptídeo hidrolases) são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas existentes em molécula de proteína, dando origem a peptídeos menores e aminoácidos livres (Rao et al., 1998). A Figura 5 apresenta o esquema da hidrólise da ligação peptídica. Neste processo o peptídeo (substrato) reage com a água formando dois produtos;  $P_N$  e  $P_C$ , referindo-se respectivamente aos peptídios gerados com extremidades N e C terminal (Schechter and Berger 1967; Brix, 2013). As proteases constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada. Também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que apresentam maior atividade: ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,1-8,0) e básicas (pH 8,1-13,0) (Rao et al., 1998; Vermelho et al., 1996; Felix, 2004).



**Figura 5** - Esquema de hidrólise de uma ligação peptídica - Figura adaptada de Rao et al., 1998.

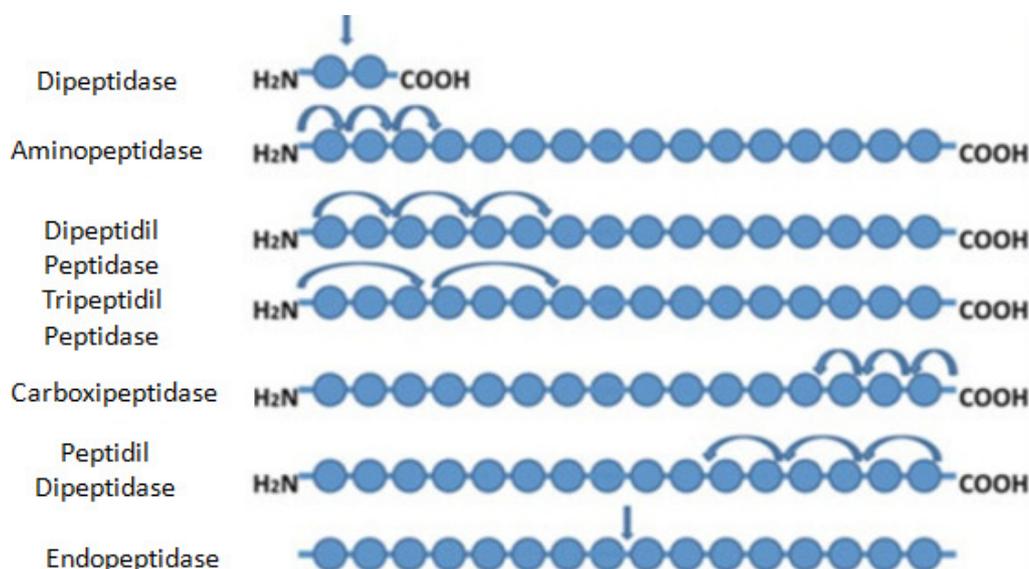
Endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal, e as exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal, removendo um único aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo de uma ou outra região terminal. Além disso, as exopeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses de acordo com os grupos químicos do sítio ativo envolvido no mecanismo catalítico (Rao et al., 1998).

As exopeptidases caracterizam-se por hidrolisarem ligações peptídicas próximas aos terminais carboxílicos (carboxipeptidases) e amina (aminopeptidases) do substrato. As carboxipeptidases podem ser subdivididas em serinoproteases (EC 3.4.16), metaloproteases (EC

3.4.17), cisteínoproteases (3.4.18), peptidil dipeptidases (EC 3.4.15) e dipeptidase (EC 3.4.13). Já as aminopeptidases compreendem as dipeptidil peptidases e as tripeptidil peptidases (3.4.14). Existem ainda exopeptidases que removem resíduos de aminoácidos substituídos, denominadas omega peptidases (EC 3.4.19) (Rao et al., 1998; Gupta, Beg e Lorenz, 2002; Vermelho et al., 1996).

As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico-proteínases (EC 3.4.23) e metaloproteínases (EC 3.4.24). Serina peptidases possuem um resíduo de serina em seu sítio ativo, enquanto as aspártico-proteínases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteína-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metaloproteínases necessitam de íon metal no seu mecanismo catalítico (Rao et al., 1998; Vermelho et al., 1996).

A Figura 6 apresenta a classificação por especificidade, demonstrando a atividade catalítica de diferentes peptidases de acordo com as suas subclasses de nomenclatura. No esquema os substratos são representados por circunferências em azul, indicando cada resíduo de aminoácido. As posições de clivagem são indicadas pelas setas (Brix, 2013).



**Figura 6** - Esquema da classificação das proteases por especificidade - adaptada de Brix, 2013 com alterações.

As proteases podem também ser classificadas com base na estrutura química de seus respectivos sítios ativos catalíticos (Zanin e Morais, 2004). A Tabela 2 apresenta esta classificação, além de agrupar enzimas cujos mecanismos de ação não se encontram completamente elucidados, em um grupo específico.

**Tabela 2** - Classificação de proteases de acordo com seu sítio catalítico (Zanin e Morais, 2004).

Peptidases	EC subclasses
Carboxipeptidases	
Serina-carboxipeptidases	3.4.16
Metalo-carboxipeptidases	3.4.17
Cisteína-carboxipeptidases	3.4.18
Endopeptidases	
Serina-endopeptidases	3.4.21
Cisteína-endopeptidases	3.4.22
Aspártico-endopeptidases	3.4.23
Metalo-endopeptidases	3.4.24
Treonina-endopeptidases	3.4.25
Endopeptidases com mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99

Atualmente com o avanço nos estudos das estruturas de proteína das enzimas, uma nova proposta de classificação foi criada agrupando as enzimas de acordo com sua estrutura química, ou seja, de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos. A classificação e nomenclatura de todas as proteases podem ser encontradas no banco de dados MEROPS (acessível em [www.merops.sanger.ac.uk/](http://www.merops.sanger.ac.uk/)). Considerando principalmente a estrutura terciária da proteína e os seus sítios catalíticos, as proteases são inicialmente classificadas em aspártico, cisteína, glutâmica, metalo, asparagina, serina, treonina e proteases com mecanismo catalítico não reconhecido. Cada protease é então atribuída a uma família que é um conjunto de enzimas homólogas. A homologia é mostrada por uma similaridade significativa na sequência de aminoácidos do tipo de enzima da família. Estas famílias são identificadas por uma letra maiúscula que representa o tipo de catalisador que a enzima possui, juntamente com um número único. Subfamílias são marcadas com uma segunda letra maiúscula (Brix, 2013).

Os microrganismos são uma das principais fontes da produção de proteases, por permitirem o cultivo em grandes quantidades e em tempo relativamente curto, baixando os custos da produção de metabólitos (Rao, 1998). Em geral, as proteases microbianas são extracelulares na natureza e são diretamente segregadas para o caldo de fermentação pelo microrganismo, simplificando assim o processamento de purificação da enzima em comparação com as proteases obtidas a partir de plantas e animais (Savitha et al. 2011). As proteases microbianas de espécies

do gênero *Aspergillus* têm sido bastante estudadas, uma vez que são conhecidas pela sua capacidade de secretar níveis elevados de enzimas no ambiente de crescimento. Várias destas enzimas secretadas, produzidas numa fermentação submersa em grande escala, têm sido amplamente utilizadas na indústria ao longo de décadas (Wu et al., 2006). Exemplo de espécies são *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* (Vishwanatha, Appu Rao e Singh, 2010; Kranthi, Rao e Jaganmohan, 2012).

As proteases têm aplicação na fabricação de queijos, no amaciamento de carnes, no processo de tratamento do couro, na preparação de hidrolisados protéicos, no preparo de cervejas, na produção do aspartame, no processamento de subprodutos industriais e resíduos, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, entre outros (Borracini, 2006; Felix et al., 2004; Freiman, 2001; Santos, 1995). As proteases possuem um papel crítico em muitos processos fisiológicos e patológicos (Rawlings et al., 2007). Estão também envolvidas em uma infinidade de reações fisiológicas e na sinalização celular (Shivanand e Jayaraman, 2009).

O uso de enzimas como aditivos detergentes representa a maior aplicação de enzimas industriais. Proteases em detergentes para a roupa respondem por aproximadamente 25% do total de vendas mundiais de enzimas (Demain e Adrio, 2008). A utilização de enzimas em formulações detergentes melhora a capacidade detergente para remover manchas difíceis. Hoje em dia, muitos produtos detergentes de lavanderia contêm conjuntos de enzimas incluindo proteases, amilases, celulasas e lipases (Hmidet et al., 2009). As proteases alcalinas adicionadas aos detergentes de lavanderia permite a libertação do material proteico a partir das manchas. O desempenho de protease alcalina em detergente é influenciado por vários fatores tais como pH e temperatura da solução de lavagem, bem como a composição detergente. Idealmente, as proteases utilizadas em formulações de detergentes devem ter elevada atividade e estabilidade dentro de uma ampla gama de pH e temperatura, e também devem ser compatível com os vários componentes do detergente, juntamente com agentes oxidantes e sequestrantes (Kumar e Takagi 1999; Savitha et al., 2011; Jaouadi et al., 2008).

Outro processo industrial que tem recebido atenção é a enzima auxiliando a depilação de peles de animais na indústria do couro. As proteases alcalinas podem desempenhar um papel vital nestes tratamentos por substituição de produtos químicos perigosos, especialmente envolvidos na imersão, depilação e purga. Aumento do uso de enzimas para depilação não só previne problemas de poluição, mas também é eficaz na economia de tempo com melhor qualidade de couro (Zambare et al., 2011).

Nas indústrias farmacêutica e cosmética, as proteases podem ser utilizadas na eliminação de queratina na acne ou psoríase, na eliminação do calo humana e na degradação de pele queratinizada e na depilação (Brandelli et al., 2010;. Vignardet et al., 2001). Além disso, estas queratinases podem remover a cicatriz e regenerar os epitélios, acelerar os processos de cura, e podem atuar também na medicina de trauma (Chao et al., 2007). Em produtos cosméticos, proteases podem hidrolisar as ligações peptídicas de queratina, colágeno e elastina da pele. Enzimas como a papaína, bromelina e outras proteases têm sido usados sobre a pele para a realização de alisamento e descamação. A ação destas proteases está relacionada com a renovação das células, exercendo atividade queratinolítica, promovendo a remoção das células mortas da epiderme e restaurando a mesma (Sim et al., 2000). É um *peeling* mais suave e seguro, comparado ao tradicional *peeling* químico (Racine, 2004). São também utilizadas como auxiliares digestivos, em combinações com antibióticos, para tratamentos de lesões, e no tratamento de neoplasias (Cruz et al., 2008).

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de biomoléculas tais como proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana, porém existem muitas dificuldades, do ponto de vista técnico, e exige um elevado número de etapas (Mazzola, 2008).

No entanto, ao iniciar um processo de purificação de uma enzima deve-se saber qual é o grau de pureza exigido. Enzimas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para as enzimas que serão aplicadas em outros processos industriais. Em uma purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína, utilizando-se das etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento final (Azevedo, 2009).

A escolha das técnicas a serem empregadas no processo de purificação está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada enzima; sendo assim, a combinação correta de várias etapas que exploram estas propriedades permitirá a purificação a partir de uma mistura. Nas primeiras etapas quase sempre é desejável reduzir o volume, e para isto é frequentemente utilizada a precipitação fracionada com sais ou solventes orgânicos. Posteriormente são utilizadas técnicas que exploram interações eletrostáticas (cromatografia de troca iônica) pela sua relativa alta capacidade. Para as etapas finais, o objetivo quase sempre é um aumento de resolução, e para isto utilizam-se técnicas como cromatografia em gel filtração e cromatografia de afinidade. Uma

estratégia geral é desaconselhável, desde que os materiais disponíveis e as necessidades para cada caso são diferentes. Frequentemente são necessários vários testes para se estabelecer as condições ideais, o método mais efetivo para o rendimento e o número de vezes de purificação almejadas. Análise via eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) pode indicar a pureza e o número de contaminantes presentes. Além disso, a massa molar da amostra e dos contaminantes pode ser determinada, e assim, auxiliar na escolha da técnica para a separação dos contaminantes.

É importante ressaltar que geralmente é necessária uma concentração ao final ou entre etapas de purificação. Isso porque um volume menor de solução é mais fácil de manusear em etapas subsequentes, tais como precipitação ou cromatografias que exigem volumes pequenos. Além disso, concentrações proteicas mais altas minimizam perdas por adsorção não específica em recipientes e matrizes. A concentração pode ser obtida por remoção de água através da liofilização e por remoção do solvente através de uma membrana semi-permeável que não permite a passagem da enzima de interesse (Lima, 2001).

## **2.5 - Sistemas de Duas Fases Aquosas**

Uma técnica de fundamental importância para a purificação de enzimas, que podem ser separadas de acordo com o seu tamanho, carga, hidrofobicidade e afinidade bioespecífica é a extração líquido-líquido através de sistemas de duas fases aquosas. A extração líquido-líquido é um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira. Esta forma de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos processos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas dependendo da aplicação final do produto a ser purificado (Silva, 2006). Deste modo essa técnica vem sendo muito utilizada, pois ajuda a reduzir os custos de produção.

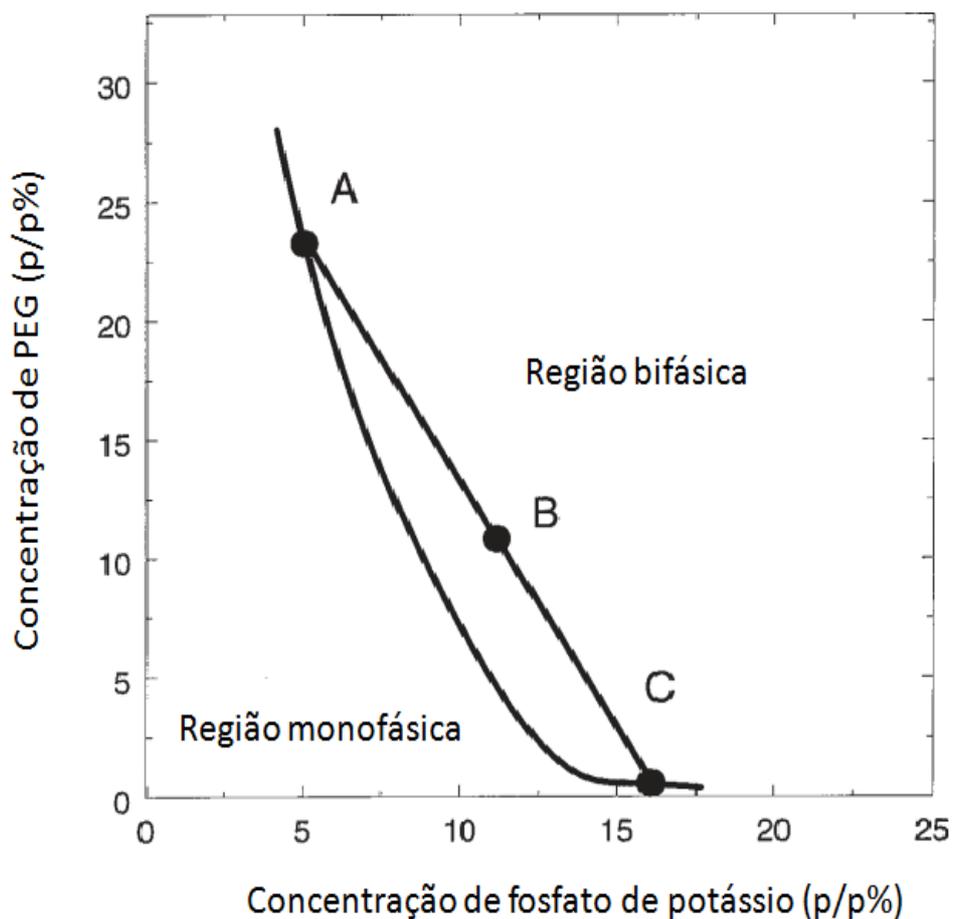
Os sistemas duas fases aquosas têm se tornado um instrumento poderoso de separação e purificação de uma grande variedade de biomoléculas, inclusive de células derivadas de plantas e animais, microrganismos, fungos e os seus esporos, vírus, cloroplastos, mitocôndrias, proteína e ácidos nucleicos. O processo de separação depende de muitos fatores, como o tipo de polímero utilizado, seu massa molar, a composição iônica e características da substância a ser extraída (Asenjo, 1990; Padilha, 2010; Ferreira, 2014).

Sistemas de duas fases aquosas podem ser formados quando dois polímeros são dissolvidos juntos acima de certas concentrações. A mais importante característica destes

sistemas é que ambas as fases são aquosas (de 85 a 99% de água), permitindo a separação de biomoléculas de diversas origens, em um ambiente não desnaturante (Pessoa e Kilikian, 2005). O PEG é biodegradável e atóxico. O fosfato de potássio por sua vez, apresenta alto coeficiente de partição de biomoléculas. Devido ao seu baixo custo, sistemas de PEG/sal têm sido utilizados na extração de enzimas (Ferreira, 2001; Sharma et al., 2002; Pessoa e Kilikian, 2005).

A curva binodal ou curva de equilíbrio informa em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo. A posição da binodal varia de acordo com o tipo e a massa molar do polímero, a natureza química do sal, a temperatura e o pH do meio. Os dados de equilíbrio apresentados nesses diagramas são importantes para os mecanismos de compreensão dos fatores que governam o processo de transferência de um determinado soluto no Sistema Bifásico aquoso - ATPS (Albertsson, 1986). No diagrama de fase também são representadas as linhas de amarração. A obtenção das linhas de amarração é de grande importância, pois todas as misturas com composições globais representadas por pontos, pertencentes a uma mesma linha de amarração, fornecerão fases superiores e inferiores com propriedades termodinâmicas intensivas idênticas, como a composição, porém com propriedades extensivas diferentes, como o volume (Silva et al., 2006).

O diagrama de fases delinea o comportamento de um determinado sistema bifásico e é único para cada sistema em condições determinadas de pH, temperatura e concentração de sal. A formação das duas fases aquosas depende da concentração dos componentes do sistema. O diagrama de fases mostra a região monofásica e bifásica de acordo com a concentração de cada componente expressa em % p/p. O diagrama fornece informações importantes como as concentrações necessárias dos componentes para formar um sistema bifásico em equilíbrio, as subseqüentes concentrações dos componentes nas fases, superior e inferior, como também a proporção entre os volumes das fases. A curva que separa a região de duas fases da região de uma fase é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada bifásica e abaixo monofásica. A Figura 7 mostra um exemplo esquemático de um diagrama de fases.



**Figura 7** – Diagrama de fases de um sistema formado por PEG/Fosfato de Potássio - adaptado de Forciniti, 1991a com alterações. Curva de coexistência ou curva binodal de um ATPS constituído por PEG/Fosfato de potássio a 20°C. B: composição inicial do sistema; A: composição do sistema na fase superior após equilíbrio; C: composição do sistema na fase inferior após equilíbrio.

A composição inicial do sistema é dada pelo ponto B e a composição final de cada fase após atingir o equilíbrio é dada pelos pontos A (fase superior ou de topo) e C (fase inferior ou de fundo). O segmento ABC é chamado de “tie-line” ou linha de amarração, e todos os sistemas cuja composição inicial está contida nessa linha possuem a mesma composição de fases após o equilíbrio, porém com diferentes razões de volumes entre as fases, superior e inferior (Ferreira, 2007).

A “tie-line” por sua vez, conecta os pontos que indicam a concentração final dos componentes do sistema nas fases, superior e inferior. Os sistemas que se encontram ao longo de uma mesma “tie-line” apresentam diferentes composições totais e diferentes proporções volumétricas entre fases, no entanto apresentam a mesma concentração final dos componentes

nas fases, superior e inferior. A curva binodal apresenta também um ponto crítico; onde a composição e o volume de ambas as fases são praticamente iguais (Rajni, 1999)

Um parâmetro termodinâmico comumente utilizado para medir a diferença das propriedades intensivas entre as fases em equilíbrio é o comprimento da linha de amarração (CLA). Este parâmetro é calculado em função das diferenças nas concentrações dos componentes em cada fase (Equação 1).

$$CLA = \{(C_{C2}^S - C_{C2}^I) - (C_{C1}^S - C_{C1}^I)^2\}^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

Em que  $C_{C2}^S$  e  $C_{C2}^I$  são as concentrações do componente 2 e  $C_{C1}^S$  e  $C_{C1}^I$  são as concentrações do componente 1 nas fases superior e inferior, respectivamente. À medida que o valor do CLA aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases, elevando, conseqüentemente, a eficiência na extração ou partição do soluto de interesse (Silva et al., 2006).

Ao se usar polímeros de alta massa molar, concentrações mais baixas desses polímeros para a formação de fases são necessárias (Cabral, 1993; Kula, 1982). No entanto, as propriedades físicas dos ATPS podem ser alteradas ao explorar a concentração e composição dos polímeros e sais na partição de biomoléculas (Diamond e Hsu, 1992).

A diminuição da massa molar de um dos polímeros leva a um aumento da partição do soluto para a fase rica nesse polímero. O efeito da massa molar do polímero na partição do soluto, não pode, no entanto ser separado do efeito da concentração do polímero. Porém, este efeito é tanto mais significativo quanto maior for a massa molar do soluto a separar (Pereira, 2005).

O coeficiente de partição (K) é uma grandeza que representa a relação de concentração da substância de interesse na fase superior e inferior depois de atingido o equilíbrio do sistema. O coeficiente de partição mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse, pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar estes valores. Diversos tipos de interações podem ocorrer entre as substâncias de interesse e os componentes do sistema, tais como: interações de cargas, interações entre as ligações de hidrogênio, força de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Portanto, existe uma série de fatores que podem influir na eficiência da partição (Albertsson, 1986), tais como interação entre a macromolécula e os componentes do sistema (Schmidt et al., 1996), massa molar da molécula a ser purificada (Johansson, 1994; Yang et al., 1994; Forciniti et al., 1991b),

concentração dos componentes do sistema (Minami, 1997), potencial hidrogeniônico (Forciniti et al., 1991b; Sebastião et al., 1994), entre outras.

De modo geral sistemas contendo PEG/sal possuem um tempo de separação das fases muito menor que os sistemas PEG/dextrana devido à densidade e viscosidade do sistema. Em sistemas dextrana/ficoll, o tempo varia de 1 a 6 horas pela ação da gravidade, enquanto em sistemas PEG/dextrana esse valor cai para 5 a 30 minutos dependendo da concentração e da massa molar dos polímeros. Nos sistemas PEG/fosfato, o tempo de separação entre as fases é inferior a 5 minutos (Coimbra, 1995). O desenvolvimento de equações específicas que possam prever o valor de K tem sido alvo de estudo (Asenjo, 1994; Eiteman, 1994). A influência de diversos fatores sobre o valor final de K foi expressa pela equação 3:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{\text{eletro}} + \ln K_{\text{bioesp}} + \ln K_{\text{tam}} + \ln K_{\text{conf}} + \ln K_{\text{hifob}} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

$K_{\text{eletro}}$  o fator eletroquímico. Surge quando o potencial elétrico existente entre as fases do sistema é usado para separar as moléculas de acordo com a sua carga elétrica;

$K_{\text{hifob}}$  o fator de afinidade hidrofóbica. É a utilização das propriedades hidrofóbicas do sistema de fases para separar as moléculas em função da sua hidrofobicidade;

$K_{\text{bioesp}}$  o fator de afinidade bioespecífica. Baseia-se na afinidade entre os locais da molécula como ligantes do polímero para a separação e fator de conformação, que é considerado quando a conformação da molécula é o fator predominante.

$K_{\text{tam}}$  o fator do tamanho. Atua quando a partição depende do tamanho da molécula ou da área superficial das partículas.

$K_{\text{conf}}$  o fator de conformação. Baseia-se na alteração da estrutura terciária da proteína, de modo a tornar mais ou menos expostos grupos carregados que podem interagir com os componentes do sistema.

$K^0$  o valor inicial do K.

O sistema bifásico aquoso composto por poliacrilato de sódio (NaPA) e polietilenoglicol (PEG) vem sendo estudado desde 2006 por Johansson e seus colaboradores. Foram determinados os rendimentos para extrações de várias biomoléculas de interesse industriais, tais como hemoglobina, lisozima e proteína verde fluorescente (Johansson et al, 2008).

O sistema aquoso NaPA/PEG apresenta certas vantagens tais como baixa viscosidade, fases claras bem definidas, possibilidade de reciclagem, além do fato de que ambos os polímeros são relativamente baratos e quimicamente inertes (Tjerneld, 1992, Johansson et al., 2008).

As curvas binodais para o sistema PEG6000/NaPA 2100 já foram determinadas usando uma concentração mínima total de polímero de 25% (p/p) e separado sem adição de sal (Saravan et al., 2006). A adição de sal ao sistema diminui a penalização entrópica devido à compartimentalização do polieletrólito altamente carregado em uma das fases. Ainda assim para que ocorra a separação de fases no sistema PEG/NaPA é necessário que as moléculas de NaPA estejam totalmente dissociadas, o que ocorre com o  $\text{pH} > 7$  (Johansson, 2006).

A cadeia principal do poliacrilato de sódio é hidrofóbica e a sua solubilidade é devida aos grupos carboxílicos nas porções laterais (Guoqiang et al., 1993). A separação bifásica entre PEG e NaPA se dá devido ao caráter fortemente hidrofílico que estes grupos apresentam quando carregados. O NaPA entretanto apresenta-se hidrofóbico quando os grupamentos carboxilas estão descarregados. Deste modo a modulação nos valores de pH acima ou abaixo de 5,0 permite respectivamente a formação de um sistema bifásico e um sistema polímero-água (Johansson, 2006, Johansson et al, 2008).

A possibilidade de recuperação dos polímeros é uma das vantagens do método. A separação do PEG pode ocorrer por meio de pequenas alterações na temperatura ou por meio da adição de sal ao sistema. Enquanto que o NaPA pode ser recuperado através de variações nos valores de pH que afetam diretamente a sua solubilidade (Johansson, 2006, Johansson et al, 2008).

O efeito “salting-out” ocorre quando a concentração de sal atinge valores elevados. A solvatação dos íons ocasiona o deslocamento das moléculas de água diminuindo, desta forma, a quantidade de moléculas de água ordenadas em torno das regiões proteicas hidrofóbicas. As proteínas agregam-se entre si possibilitando a recuperação do PEG (Lopes, 2006). Após a partição da biomolécula alvo na fase rica em PEG o efeito “salting-out” pode ser obtido por meio da adição de sal a esta fase. O efeito resulta na formação de um novo sistema bifásico PEG/sal, onde a biomolécula é direcionada para a fase salina (Johansson et al., 2008).

### 3 - Objetivos

Objetivo Geral: Avaliar a purificação de proteases derivadas de fungos filamentosos (*Penicillium fellutanum* e *Penicilium restrictum*) através de extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas NaPA/PEG

Objetivos específicos:

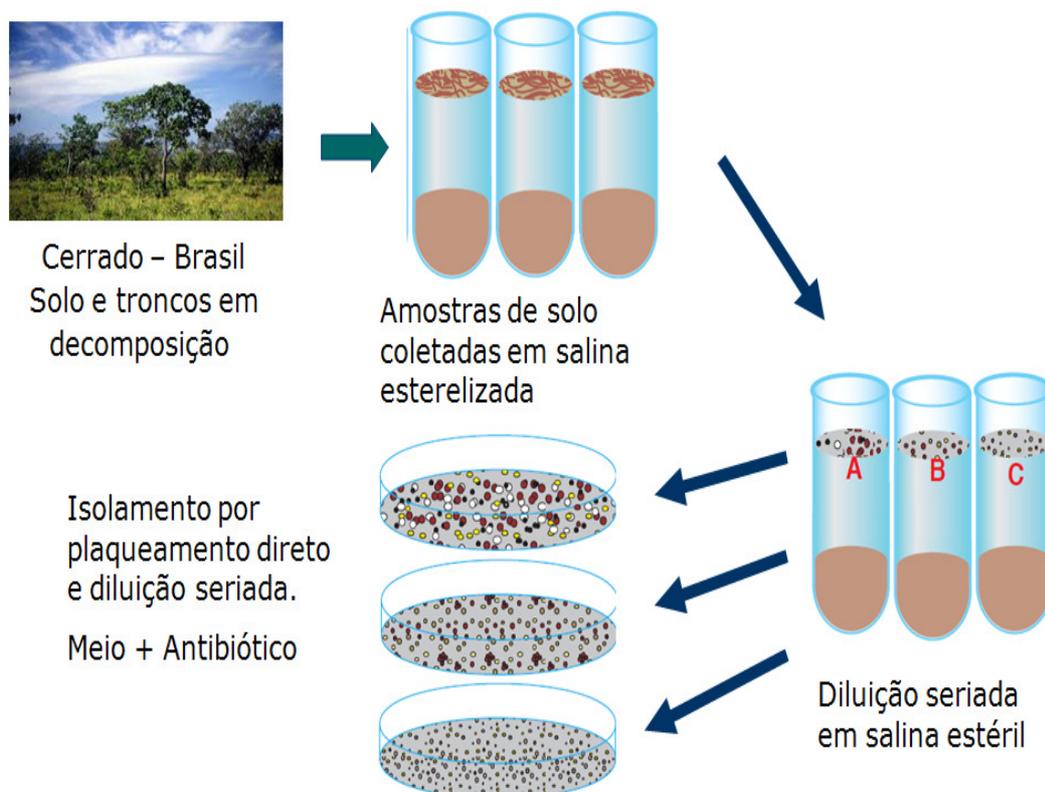
- ✓ Averiguar a influencia dos seguintes parâmetros na partição de proteases produzidas por *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum*:
  - ✓ Massa molecular de PEG;
  - ✓ Concentração de NaPA;
  - ✓ Concentração de PEG;
  - ✓ Concentração de caldo fermentado;
  - ✓ Re-extração com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
  - ✓ Determinar modelo estatístico para a partição das proteases alvo.

## 4 - Material e Métodos

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB).

### 4.1 - Fungos filamentosos

As cepas dos fungos filamentosos *Penicillium fellutanum* e *Penicilium restrictum* foram isoladas do solo de Brasília identificadas por biologia molecular e gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, coordenador do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB). A Figura 8 apresenta o esquema simplificado do procedimento de isolamento dos fungos filamentosos. Este projeto possui autorização de acesso ao patrimônio genético brasileiro por estar dentro do âmbito da rede SISBIOTA de fungos filamentosos em colaboração com o professor Edivaldo: AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010770/2013-5.



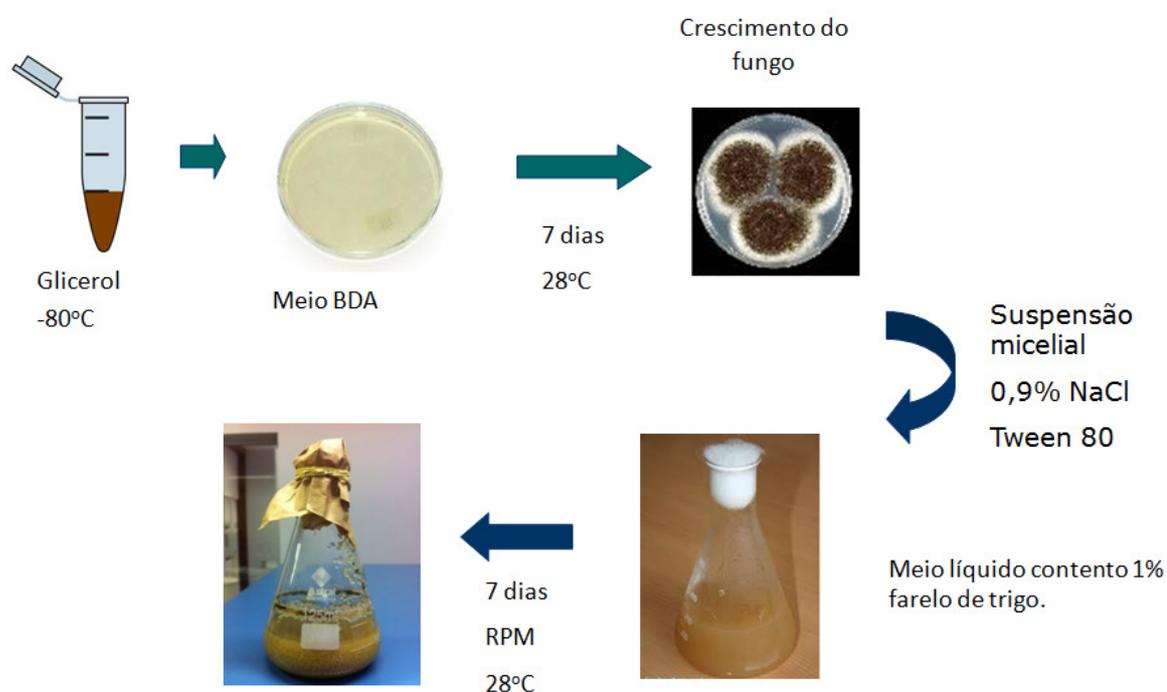
**Figura 8** - Esquema simplificado do isolamento de fungos filamentosos.

#### 4.2 - Manutenção das cepas

Os fungos previamente armazenados em glicerol a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foram reativados em tubos de ensaio e placa de Petri contendo ágar batata dextrose 4% (BDA), e incubados a  $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 7 dias até crescimento.

#### 4.3 - Obtenção da protease para avaliação do coeficiente de partição.

O inóculo foi preparado adicionando-se 5 mL de solução esterilizada composta de 0,9% NaCl e Tween 80 (1mL) nos tubos de ensaio contendo a cultura estoque das espécies de fungos. A suspensão foi homogeneizada em agitador de tubos. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota para contagem dos esporos em câmara de Neubauer ( $10^8$  esporos/mL). Uma suspensão fúngica contendo  $10^8$  esporos/mL foi inoculada em meio mínimo de cultivo contendo 1% de farelo de trigo como fonte de carbono. Os cultivos foram conduzidos em agitador orbital a 150 rpm e à temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  e amostras foram retiradas após 7 dias para determinar a produção de protease. O extrato foi separado da biomassa por filtração a vácuo com papel de filtro Whatman n°1. A Figura 9 apresenta o esquema para obtenção do sobrenadante contendo enzimas extracelulares.



**Figura 9** - Esquema para obtenção do caldo de cultivo contendo enzimas expressas por fungos filamentosos.

#### **4.4 - Quantificação da atividade proteolítica**

Para medida da atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por Kunitz, 1947 e Walter, 1984 modificada. A reação foi iniciada com a incubação de 50  $\mu$ L de caldo a 37°C com 0,625mL de caseína 2% (m/v) por 10 minutos. Depois foi adicionado 1,25mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,3 mol/L. Após 10 minutos de repouso as amostras foram centrifugadas a 4000g durante 20 minutos. O branco da amostra foi obtido com a utilização de 0,625mL de HCl 0,05M em substituição à solução de caseína. Foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante, contendo os produtos da hidrólise enzimática, em espectrofotômetro a 280nm. A leitura obtida foi analisada frente a uma curva padrão de tirosina (mM) em função da absorbância. A atividade proteolítica foi definida como equivalente a 1 $\mu$ mol de tirosina por minuto.

#### **4.5- Quantificação de proteínas totais.**

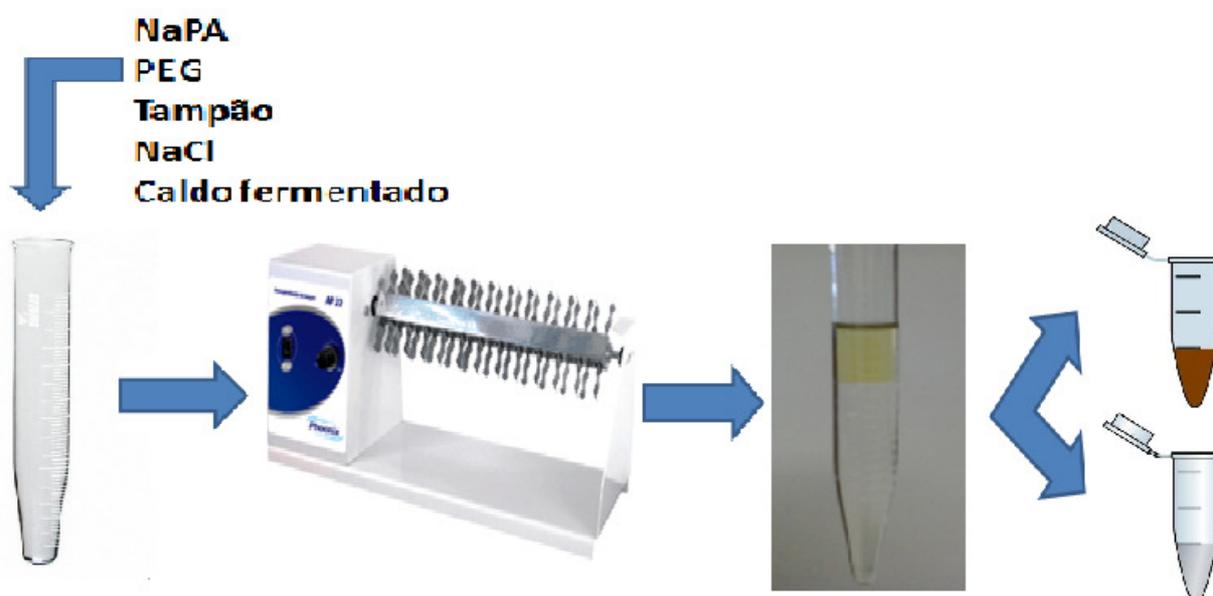
O teor de proteínas foi determinado como descrito por Bradford (1976). A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL de amostra a 1 mL do reagente. Após 5 minutos foi feita a leitura a 595 nm. Como curva padrão utilizou-se concentrações de albumina de soro bovino (5-200  $\mu$ g/mL). O reagente foi preparado pela dissolução de 100 mg de azul de Comassie G-250 em uma mistura de 100 mL de ácido fosfórico a 85% e 50 mL de metanol a 95%. Depois de completa dissolução do corante, adicionou-se água até completar o volume para 1 litro.

#### **4.6 - Cálculo do coeficiente de partição, balanço de massa, razão volumétrica, rendimento, fator de purificação e seletividade.**

Para estudar o sistema, obtendo os melhores resultados em menor tempo e maior produtividade foi utilizado o planejamento experimental, a fim de otimizar os experimentos. Este tipo de processo baseia-se em princípios estatísticos, que tornam os experimentos menos repetitivos, fazendo interação entre todas as variáveis e observando não só a influência destas sobre o resultado como também a interação entre as mesmas, levando à obtenção do modelo que mais se ajusta às condições do sistema em estudo (Barros, 1995). O software STATÍSTICA 7.0 foi utilizado para delinear o planejamento experimental.

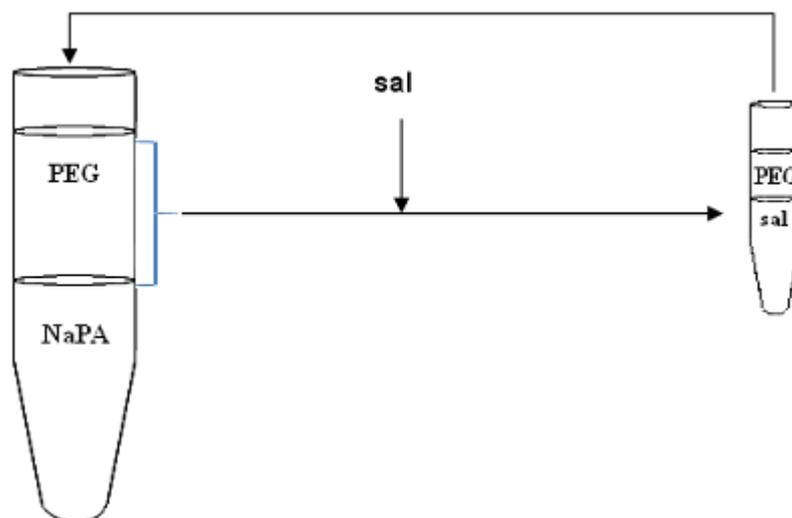
Os sistemas de duas fases aquosas foram preparados em tubos de ensaio graduados de 15 mL, pela adição de poliacrilato de sódio (NaPA), polietilenoglicol (PEG), cloreto de sódio (NaCl), tampão McIlvaine (pH 6,5) e caldo fermentado dos fungos filamentosos *Penicillium fellutanum* e *Penicilium restrictum*. Concomitantemente a cada sistema estudado também foi

analisado um sistema idêntico, porém com água milli-Q no lugar do caldo fermentado para evitar-se qualquer interferência de leitura relativo às fases dos sistemas. Os componentes do sistema foram acrescentados por pesagem e posteriormente homogeneizados em agitador orbital (Phoenix AP 22) a 8 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, os sistemas foram deixados em repouso por 20 minutos para separação de fases. Foram coletadas amostras de ambas as fases com as quais foram realizadas as análises em triplicas. A Figura 10 apresenta o esquema seguido durante a partição com ATPS NaPA/PEG.



**Figura 10** - Esquema do procedimento experimental para a partição a partir de caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* como ATPS NaPA/PEG/NaCl - adaptado de Perreira, 2008, com alterações. 1- Tubo de ensaio graduado contendo todos os componentes do sistema: NaPA, PEG, NaCl, tampão e caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* e *Penicilum restrictum*; 2 – Agitação em orbital de tubo de ensaio durante 20 min e obtenção de sistema monofásico; 3 – Separação de fases e coleta das amostras (fase superior e inferior) para análises subsequentes.

Para a partição realizada com o caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* foi utilizada a estratégia da reextração com a adição de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Foram adicionadas à fase superior diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  induzindo desta forma a formação de um novo sistema bifásico polímero/sal. Foi analisada a correlação entre a concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  adicionada e a razão volumétrica (R). A Figura 11 apresenta o diagrama representativo da reextração realizada.



**Figura 11** - Diagrama representativo da reextração realizada a partir da fase superior do ATPS NaPA/PEG e caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* com a adição de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  - adaptada de Perreira, 2008, com alterações.

A atividade proteolítica foi determinada para cada fase em todos os sistemas, sendo assim obtido o coeficiente de partição (K).

$$K = \frac{C_s}{C_i} \quad \text{Equação 3}$$

Os balanços de massa são importantes para verificar que não ocorrem significativas perdas da biomolécula de interesse durante o processo. Os balanços de massa foram calculados de acordo com a expressão:

$$BM = \frac{C_s V_s + C_i V_i}{C_o V_o} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que:  $C_0$  refere-se às atividades da protease no caldo fermentado inicialmente adicionada ao sistema.  $V_s$ ,  $V_i$  e  $V_0$  são os volumes da fase superior (s), inferior (i) e da solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente.

A razão volumétrica (R) entre ambas as fases do sistema será determinada através da expressão:

$$R = \frac{V_s}{V_i} \quad \text{Equação 5}$$

Do ponto de vista de aplicabilidade industrial é primordial determinar-se o rendimento resultante da partição da protease. O rendimento em todos os sistemas será obtido a partir da equação abaixo:

$$n = \frac{(V_t)(C_{rt})}{(V_o)(C_o)} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Em que:  $V_T$ = volume total da fase na qual a protease foi extraída em maior proporção;  $C_{Rt}$ = atividade da protease na fase na qual é extraído em maior proporção;  $V_0$ = volume de caldo sujeito a extração;  $C_0$ = atividade da protease na amostra original.

O fator de purificação (Pf) foi calculado pela razão entre a atividade na fase superior em relação a atividade no caldo fermentado (Rabelo, 2004).

$$Pf = \frac{(A_t/C_t)}{(A_o/C_o)} \quad \text{Equação 7}$$

Em que;  $A_t$  e  $A_o$  referem-se respectivamente a atividade enzimática em units/mL na fase superior e no caldo fermentado inicialmente adicionado no sistema, e  $C_t$  and  $C_o$  referem-se à concentração total de proteínas em  $\mu\text{g/mL}$ , na fase superior e no caldo fermentado, respectivamente.

Seletividade (S) foi calculada como a relação entre o coeficiente de partição (K) e o coeficiente de partição das proteínas totias ( $K_p$ ) (Maciel, 2014):

$$S = \frac{K}{K_p} \quad \text{Equação 8}$$

#### 4.7 - Desenho experimental

Para verificar a influência da massa molar do PEG - MMPEG, a concentração de PEG - [PEG], concentração de NaPA - [NaPA] e concentração do caldo fermentado [Caldo] na partição protease, um desenho fatorial  $2^3$  e três repetições no ponto central foi utilizado para analisar estes parâmetros e interações. O planejamento fatorial com 02 níveis supõe-se uma linearidade nos efeitos dos fatores. Entretanto o modelo de superfície proposto pela equação 9 foi utilizado para a investigação de curvatura (Calado, 2003).

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Equação 9}$$

Em que:  $y$  = variável dependente,  $\beta_0$  (coeficiente de regressão não associado a variável independente),  $\beta_j$  (coeficiente de regressão associado a variável independente),  $\beta_{ij}$  (coeficiente de regressão associado à interação entre variáveis independentes),  $X_i$  e  $X_j$  = variáveis independentes e  $\varepsilon$  = erro observado.

#### 4.8 - Otimização da partição

Foram avaliadas as variáveis; a massa molar do PEG (2000, 4000 e 6000g.mol<sup>-1</sup>); a concentração de PEG, de caldo fermentado, de NaPA e a utilização de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na estratégia de reextração.

## 5 - Resultados e Discussão

### 5.1. Produção de proteases

As cepas dos fungos filamentosos *Penicillium fellutanum* e *Penicilium restrictum* isoladas do solo do Cerrado Brasileiro, foram avaliadas quanto à atividade proteolítica em meio mínimo contendo 1% de farelo de trigo. Após 7 dias de cultivo, nas condições previamente estabelecidas, a atividade proteolítica quantificada foi de 71,91 UI/mL e 72,98 UI/mL em pH 5,0, para os fungos *Penicillium fellutanum* e *Penicilium restrictum*, respectivamente. Espécies de *Penicillium* possuem grande potencial biotecnológico para a produção de proteases e outras enzimas.

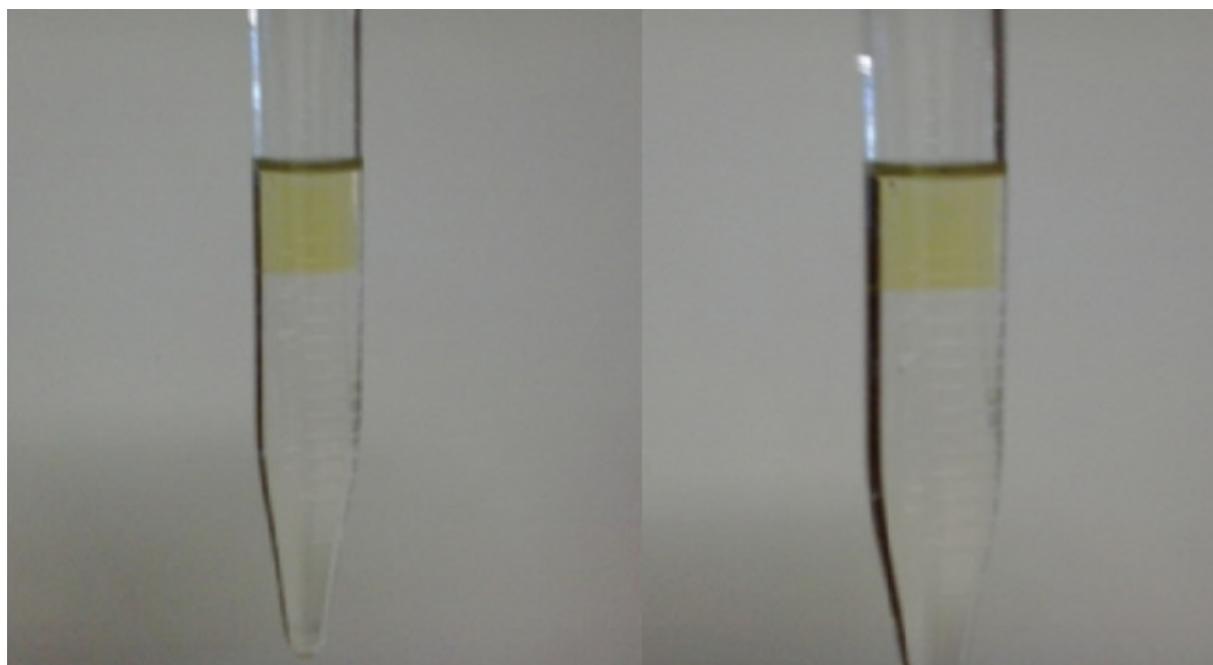
Valores de atividade enzimática podem variar devido a muitos fatores, incluindo a metodologia adotada. Sendo desta forma difícil realizar comparações direta entre diferentes estudos. Rodarte e colaboradores, relataram uma atividade proteolítica igual a 10,89 UI/mL para a espécie *Penicillium citrinum* em pH 5,0 (Rodarte et al., 2011). Outros estudos também verificaram a produção de protease pela espécie *Penicillium citrinum* (Yamaguchiet al., 1993; Yamamoto et al., 1993). O fungo *P. restrictum* quando cultivado em meio sólido apresentou atividade proteolítica igual a 7,8 UI/mL (Gombert et al., 1999). O fungo *Penicillium fellutanum* quando cultivado em pH 8,5 apresentou uma atividade de 25 UI/mL (Manivannan e Kathiseran, 2007). Apesar da espécie *Penicillium roqueforti* apresentar baixa atividade (0,56 UI/mL) em condições de pH ácido, essa espécie é bastante descrita em relação à produção de uma aspártico-protease extracelular (Houmard e Raymond, 1979; Durand-Pousseread e Fevre, 1996; Larsen, Kristiansen e Hansen, 1998).

Desta forma considerou-se relevante a continuidade do trabalho estudando a melhor estratégia para purificar as proteases presentes no meio utilizando técnica de purificação de baixo custo.

### 5.2 - Purificação de protease expressa por *Penicillium restrictum*.

A partição através de sistemas bifásicos aquosos PEG/NaPA das proteases produzidas extracelularmente pelos fungos *P. restrictum* foi baseada nos diagramas de fase descritos por Johansson e colaboradores (Johansson, 2011). Neste estudo verificou-se a influência da concentração dos polímeros, a massa molar de PEG e a concentração do caldo fermentado na

eficiência dos sistemas. A Figura 12 apresenta fotos dos sistemas bifásicos aquosos obtidos a partir do caldo fermentado de *Penicillium restrictum* com NaPA/PEG.



**Figura 12** – Fotos do sistema bifásico aquoso obtido a partir do caldo fermentado de *Penicillium restrictum* com ATPS NaPA/PEG.

Para verificar a influência da massa molar do PEG - MMPEG, a concentração de PEG - [PEG] e a concentração de NaPA - [NaPA] na partição das proteases, um desenho fatorial  $2^3$  com três repetições no ponto central foi utilizado. Neste estudo os fatores de baixas e altas configurações foram codificados como -1 e +1, o ponto médio foi codificado como 0. Os ajustes dos parâmetros foram apresentados sob a forma de valores codificados e de valores reais descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** – Níveis e valores referentes às variáveis independentes utilizadas na avaliação da partição da protease expressa por *Penicillium restrictum*. Concentração de NaPA, concentração de PEG e massa molar de PEG.

Variáveis independentes	Símbolos	Níveis e valores		
		-1	0	+1
[NaPA] %p/p	$X_1$	6,0	8,0	10,0
[PEG] %p/p	$X_2$	6,0	8,0	10,0
MMPEG (g.mol <sup>-1</sup> )	$X_3$	2000	4000	6000

$X_1$  = Concentração de NaPA (%p/p),  $X_2$  = Concentração de PEG (%p/p),  $X_3$  = Massa molar de PEG (g.mol<sup>-1</sup>),

O coeficiente de partição (K) da protease foi considerado como a variável dependente (resposta) do desenho experimental.

A partição da protease expressa por *Penicillium restrictum* foi determinada experimentalmente em sistemas bifásicos aquosos de PEG/NaPA a 25°C em tampão McIlvaine pH 6,5 e 1,05% em peso de NaCl. Foram utilizados 30% p/p de caldo fermentado. Para avaliar o efeito da massa molar de PEG na partição da enzima foram utilizados PEG com diferentes massas molares 2000, 4000 e 6000 g.mol<sup>-1</sup>.

Os valores obtidos no desenho experimental para o coeficiente de partição de enzima (K), o coeficiente de partição de proteínas totais (Kp), o balanço de massa (BM), razão volumétrica (R), rendimento ( $\eta$ ), fator de purificação (Pf) e seletividade (S) estão mostrados na Tabela 4.

Os menores valores da razão volumétrica (sistemas de 3 e 11) foram obtidos para a menor concentração de PEG (6% p/p) juntamente com a maior concentração de NaPA (10% p/p), indicando que estes parâmetros têm uma forte influência sobre R.

O coeficiente de partição de proteínas totais (Kp) mostra que as proteínas presentes no caldo fermentado são preferencialmente concentradas na fase rica em NaPA (fase inferior). Em um processo de purificação ideal, a molécula-alvo deve migrar em fase oposta às demais proteínas (Johansson et al., 2008). Por conseguinte, foram considerados como os melhores valores de K aqueles com valores maiores do que 1,0, indicando que a enzima migrou preferencialmente na fase superior.

A análise comparativa entre sistemas com PEG 2000 e com as maiores concentrações de NaPA (sistemas 1 e 11) mostra que a diminuição da concentração de PEG resultou num aumento de K. Enquanto que a manutenção da concentração máxima de PEG 2000 acompanhada da diminuição da concentração de NaPA (sistemas 1 e 9) provocou apenas um leve aumento – em torno de 5% - neste parâmetro. Analisando-se os sistemas 9, 10 e 11, todos com PEG 2000, observa-se que o aumento da concentração de PEG (sistemas 9 e 10) levou a um aumento de K bem menor – em torno de 54% - que o aumento ocasionado pelo aumento da concentração de NaPA (10 e 11) – em torno de 158%. Neste o incremento passou de 250% no coeficiente de partição da enzima. Para sistemas com PEG de massa molar superior (6000), o comportamento em relação à variação da concentração de PEG (sistemas 3 e 4) foi semelhante, porém, em concentrações decrescentes de NaPA (sistemas 4 e 7) o coeficiente de partição enzimático também aumentou significativamente. Nestas condições tanto a influência da concentração de PEG como da concentração da NaPA mostraram-se importantes para a partição em diferentes massas molares de PEG.

Em geral, o aumento da massa molar do polímero pode causar a diminuição da partição na fase rica deste mesmo polímero (Albertsson, 1986). Quanto maior for a massa molar do polímero, menor é o volume de solvente disponível o que implica uma menor solubilidade de enzima na fase respectiva (Albertsson, 1986). Devido à teoria do volume de exclusão o PEG pode excluir proteínas de acordo com o aumento da sua massa molar. A magnitude deste efeito diminui quanto menores são as moléculas a serem purificadas (Forciniti, 1991b; Schmidt, 1994). Os valores mais altos para o coeficiente de partição da protease expressa por *Penicillium restrictum* foram obtidos com os sistemas com PEG 2000 ( $K = 2,12; 2,23$  e  $3,74$ ). Dado isto, observa-se que os valores obtidos para  $K$  são consistentes com estudos anteriores.

Observou-se também que o sistema 11 (valor  $K$  elevado) tem um dos menores valores de  $R$ , o que indica um maior volume para a fase rica em NaPA. Este efeito pode ser explicado por "salting-out" em que o sal está essencialmente em fase de NaPA, aumentando assim o volume da fase inferior. Assim, baixas massas molares de PEG e também a concentração deste polímero parecem ser fundamentais na compensação da penalização entrópica de partição.

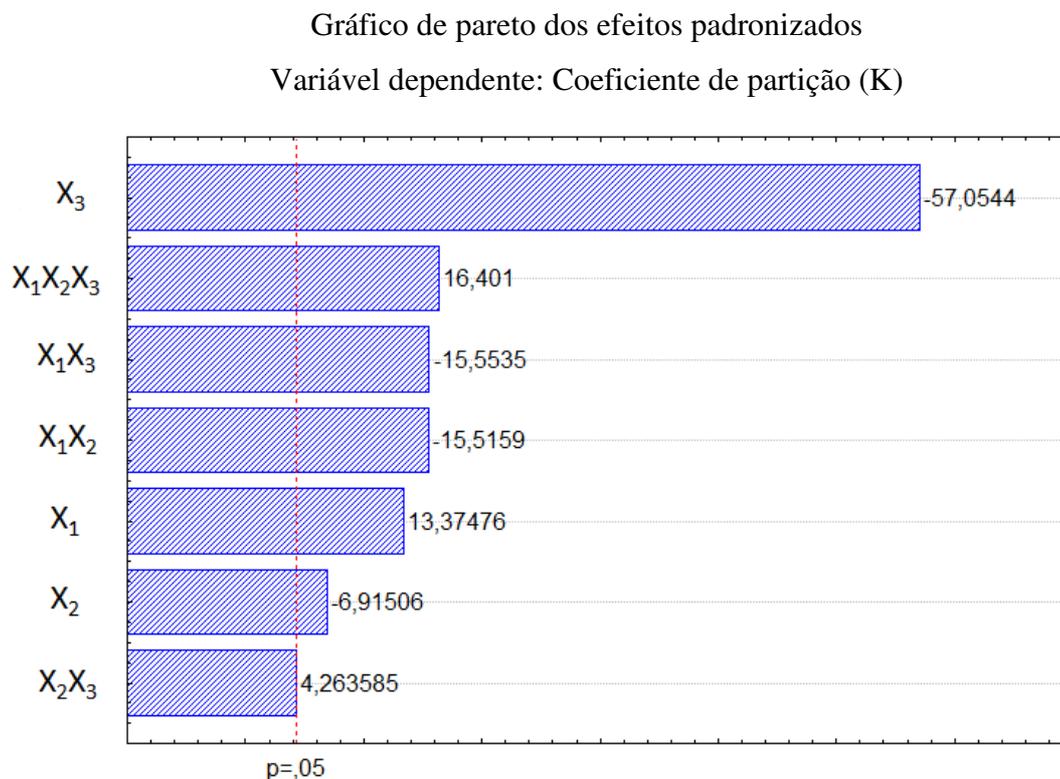
**Tabela 4** - Resultados obtidos para o planejamento fatorial  $2^3$  com os parâmetros: concentração de NaPA (6-10% p/p), concentração de PEG (6-10% p/p) e massa molar de PEG (2000-6000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Sistemas	Valores reais			Valores codificados			K	BM	R	$\eta$	Kp	Pf	S
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$							
1	10	10	2000	+	+	-	2,12	60,23	0,90	39,50	0,50	0,45	4,23
2	8	8	4000	0	0	0	0,11	81,95	0,83	75,09	0,39	0,35	0,28
3	10	6	6000	+	-	+	0,23	66,93	0,5	60,02	0,44	0,15	0,52
4	10	10	6000	+	+	+	0,16	66,49	0,89	57,98	0,35	0,15	0,47
5	6	6	6000	-	-	+	0,35	76,99	1,00	57,22	0,15	0,36	2,31
6	8	8	4000	0	0	0	0,06	83,52	0,83	79,28	0,37	0,37	0,17
7	6	10	6000	-	+	+	0,21	39,67	1,79	28,76	0,28	0,13	0,76
8	8	8	4000	0	0	0	0,17	88,13	0,83	77,19	0,40	0,34	0,43
9	6	10	2000	-	+	-	2,23	71,10	1,86	57,27	0,41	0,57	5,44
10	6	6	2000	-	-	-	1,45	71,81	1,38	47,81	0,64	0,48	2,27
11	10	6	2000	+	-	-	3,74	59,58	0,6	41,21	0,55	0,57	6,80

$X_1$  = Concentração de NaPA (%p/p),  $X_2$  = Concentração de PEG (%p/p),  $X_3$  = Massa molar de PEG ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional), BM = Balanço de massa (%), R = Razão volumétrica (adimensional), Kp = Coeficiente de partição de proteínas totais,  $\eta$  = Rendimento (%), Fp = Fator de purificação (adimensional) e S = Seletividade (adimensional) .

A ANOVA revelou os efeitos principais e da existência de interação entre eles. A Figura 13 mostra diagrama de Pareto que representa os efeitos estimados em ordem decrescente, em relação à concentração de NaPA, à concentração de PEG e à massa molar de PEG e de suas interações com os valores obtidos para o coeficiente de partição K. Pareto é uma representação gráfica de *Student t-teste*. As barras que estão à direita da linha vertical são significativas

( $p < 0,05$ ). Gráfico de Pareto apresenta cada um dos efeitos estimados e interações. A medida de cada barra é proporcional ao efeito estimado.



**Figura 13** - Diagrama de Pareto para as variáveis de concentração NaPA, a concentração de PEG e a massa molar de PEG sobre o coeficiente de partição da protease.  $X_1$  = Concentração de NaPA (%p/p),  $X_2$  = Concentração de PEG (%p/p) e  $X_3$  = Massa molar de PEG ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

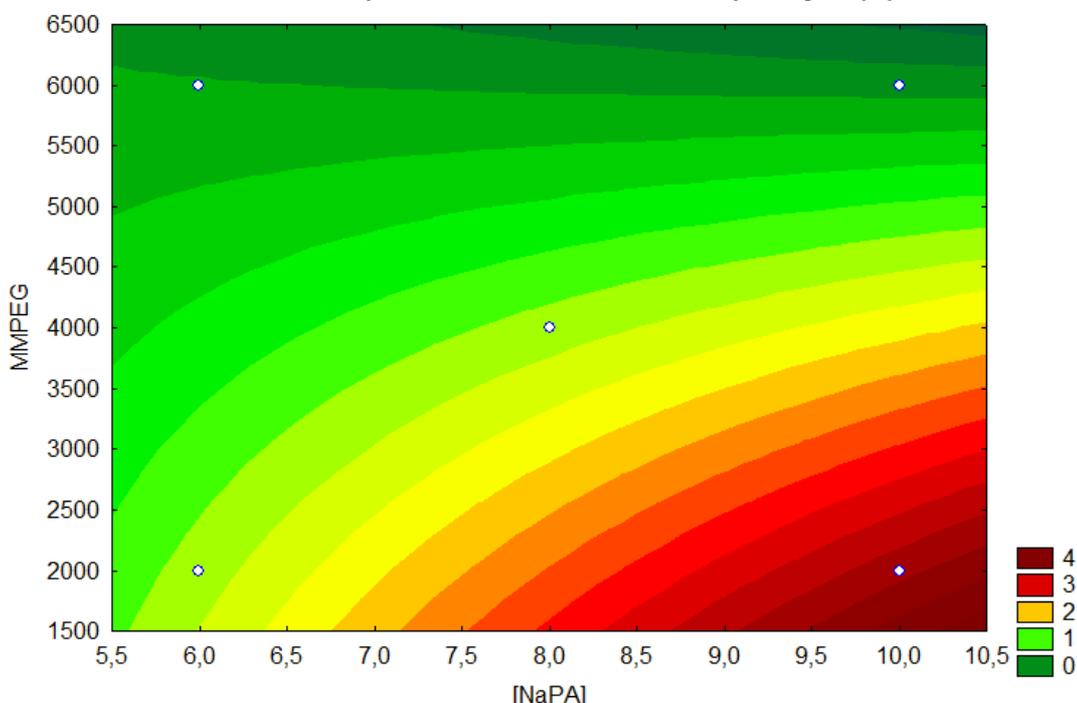
A partir da Figura 13 pode-se observar que o efeito principal da massa molar do PEG ( $X_3$ ), concentração de NaPA ( $X_1$ ) e concentração de PEG ( $X_2$ ) foram significativas. O maior efeito principal detectado para o coeficiente de partição foi o massa molar do PEG (-57,05), seguido pela concentração NaPA (13,37) e pela concentração de PEG (-6,92). De acordo com a análise realizada, a concentração de ambos os polímeros interfere na partição da biomolécula, porém o aumento da concentração de NaPA apresenta influência positiva sobre os valores de K enquanto que a concentração de PEG apresenta influência inversa. O sinal negativo de  $X_3$  indica que K aumenta com a diminuição da massa molar de PEG, podendo ser explicado pela teoria do volume de exclusão. De acordo com esta teoria uma molécula em solução tende a excluir todas as outras do volume que ocupa (Canevarolo, 2002). Os efeitos interativos entre variáveis  $X_3$  e  $X_1$  apresentam uma estimativa de sinal negativo (-), implicando que aumentos simultâneos na concentração de NaPA e no massa molar de PEG tendem a menores valores de K. Os valores para o coeficiente de partição podem ser aumentados utilizando menor massa molar do PEG e

aumento da concentração de NaPA nas respectivas regiões estudadas. Além disso, o efeito interativo observado entre as variáveis  $X_1$  e  $X_2$  também apresenta sinal de estimativa negativo (-). Indicando que aumentos simultâneos nas concentrações de ambos os polímeros levam a valores menores de K. Maiores valores de K pode ser obtido utilizando-se concentrações mais baixas de PEG e concentrações mais elevadas de NaPA o que pode ser relacionado com a teoria do volume de exclusão. A interação entre os 03 efeitos principais também foi significativa, indicando influência positiva sobre o parâmetro de resposta.

A Figura 14 mostra o gráfico de contorno descrevendo os valores obtidos para K em relação aos parâmetros concentração de NaPA e massa molar do PEG. As linhas de contorno mostram a tendência de resposta da variável dependente. Cada linha representa um mesmo valor para a variável resposta. Observa-se a existência de linhas curvas, indicando interação significativa entre as variáveis independentes. A ocorrência de paralelismo indicaria falta de interação significativa (Calado, 2003).

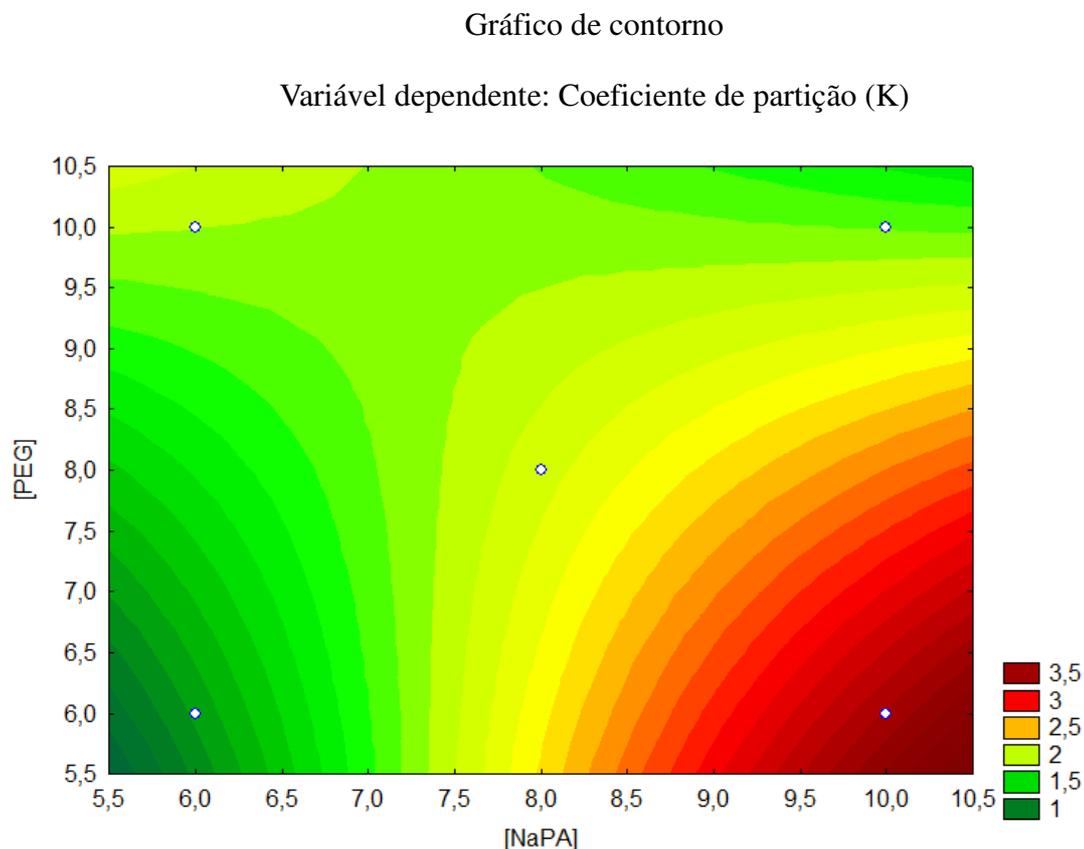
#### Gráfico de contorno

Variável dependente: Coeficiente de partição (K)



**Figura 14** - Gráfico de contorno representando os valores do coeficiente de partição relacionados com concentração de NaPA e massa molar do PEG. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), MMPEG = Massa molar de PEG (g.mol<sup>-1</sup>) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional).

A Figura 15 mostra o gráfico de contorno descrevendo os valores obtidos para K em relação aos parâmetros concentração de NaPA e concentração do PEG.



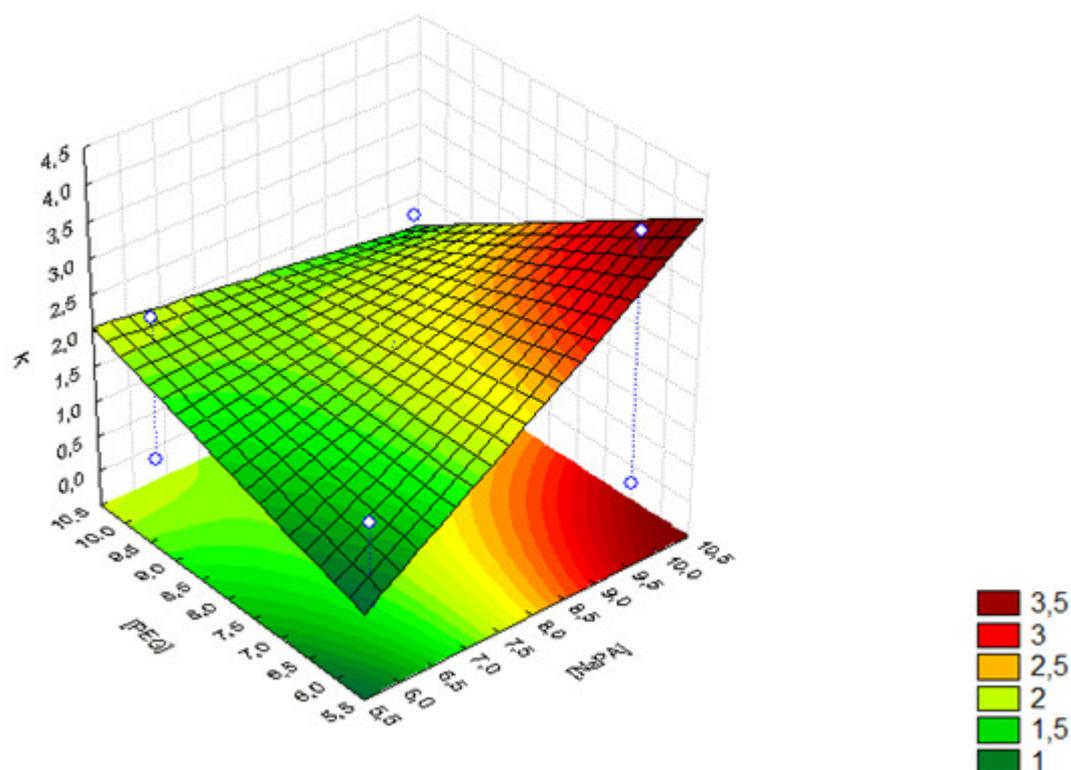
**Figura 15** - Gráfico de contorno representando os valores do coeficiente de partição relacionados com concentração de NaPA e concentração de PEG. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional).

O gráfico de superfície de resposta obtido para os valores de coeficiente de partição em relação às mudanças nas concentrações de ambos os polímeros em sistemas bifásicos aquosos com PEG  $2000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  é mostrado na Figura 16. Estudos têm demonstrado que a fase rica em PEG (fase superior) contém maior quantidade de polímero total do que a fase inferior (rica em NaPA), de modo que a fase inferior é favorecida em termos entrópicos (Johansson, 2011). Assim, com a diminuição da concentração de PEG esta tendência diminui, favorecendo um aumento da partição da biomolécula na fase superior, como se mostra nos valores experimentais. O polímero NaPA é fortemente negativo apresentando assim forte repulsão por moléculas carregadas negativamente. A eventual possibilidade da protease se apresentar, no valor de pH experimental, carregada negativamente, pode ajudar a explicar o aumento nos valores de K a medida que

maiores concentrações de NaPA são usadas nos sistemas. A determinação futura do ponto isoelétrico da enzima pode ajudar a esclarecer as interações eletrostáticas que orientam a sua partição.

Gráfico de superfície de resposta

Variável dependente: Coeficiente de partição (K)

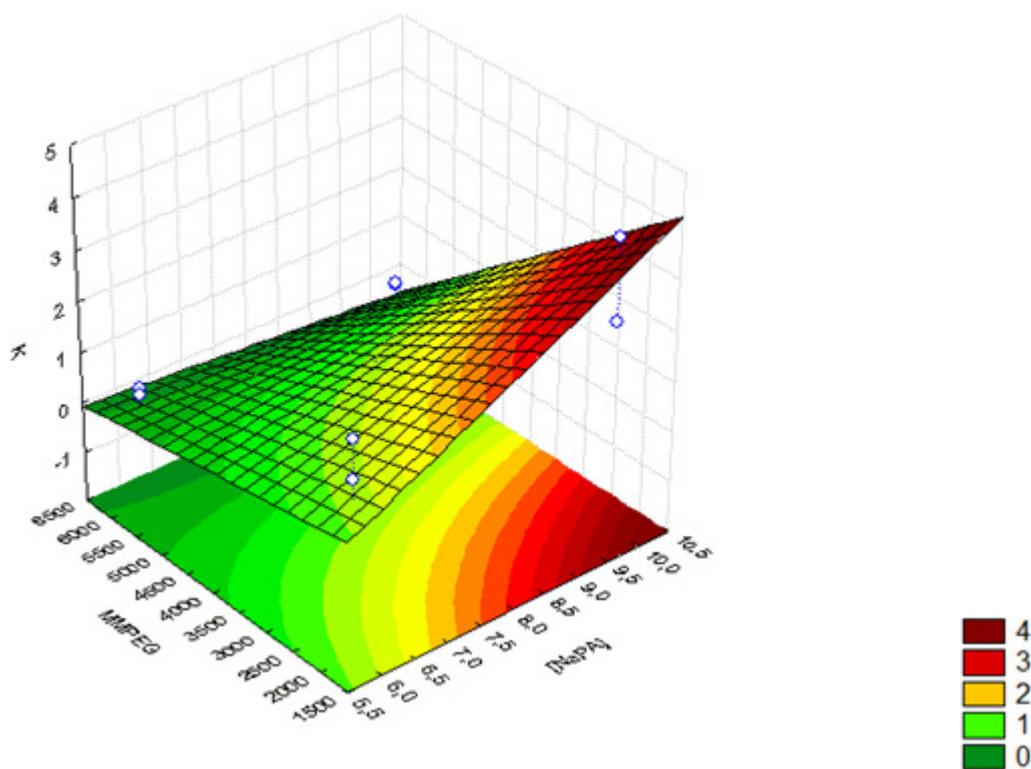


**Figura 16** - Gráfico de superfície de resposta relacionando o coeficiente de partição em função da variação da concentração de NaPA e concentração de PEG  $2000 \text{ g.mol}^{-1}$ , em ATPS contendo 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a  $25^\circ \text{C}$ . [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional).

A Figura 17 apresenta o gráfico de resposta de superfície relacionando a variável dependente (K) com diferentes concentrações de NaPA e diferentes massas molares de PEG em sistemas bifásicos aquosos com concentração de PEG fixa em 6% p/p. Os maiores valores foram obtidos com PEG de massa molar inferior. Como mencionado anteriormente, a teoria de volume de exclusão, que reduz o volume disponível para a solubilização da macromolécula pode ajudar a explicar os valores mais baixos de K em sistemas com PEG de massa molar mais elevada.

## Gráfico de superfície de resposta

Variável dependente: Coeficiente de partição (K)



**Figura 17** - Gráfico de superfície de resposta relacionando o coeficiente de partição em função da variação da concentração de NaPA e da massa molar do PEG, em ATPS contendo 6% p/p de PEG e 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a 25°C. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), MMPEG = Massa molar de PEG ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional).

Os altos valores dos balanços de massa (acima de 80%) para vários sistemas indicam a estabilidade enzimática aos componentes do sistema bifásico. Todos os coeficientes de partição de proteínas totais ( $K_p$ ) apresentaram valores abaixo da unidade, o que indica uma preferência pela fase rica em NaPA (fase inferior). O rendimento para alguns dos sistemas testados foi superior a 80% o que representa um fator importante para a aplicação industrial destes processos de purificação.

Neste desenho experimental os valores do coeficiente de partição da enzima (K) variaram entre 0,06 – 3,74, indicando no primeiro extremo, a partição preferencial na fase inferior e no segundo, sua preferência pela fase superior. Estes valores indicam que o desenho experimental foi capaz de identificar um ponto crítico no ATPS NaPA/PEG onde a modulação dos parâmetros independentes levou a alteração no comportamento de partição da biomolécula de interesse.

Variando a concentração de NaPA e PEG e o massa molar deste, foi possível dirigir a partição da enzima para fase oposta daquela onde ocorre a partição das proteínas totais, indicando portanto a flexibilidade e potencialidades do método de pré-purificação. Massas molares menores de PEG e altas concentrações de NaPA levaram aos maiores valores de K.

Os maiores valores de seletividade (S) (sistemas 1, 9 and 11) corresponderam aos maiores valores de coeficiente de partição (K). O melhor resultado foi observado (S = 6.80) foi obtido com 10% p/p de NaPA e 6% p/p de PEG 2.000 g.mol<sup>-1</sup>, e o maior valor de K (3.738) também foi observado nestas condições. Coeficiente de partição e seletividade com valores maiores que a unidade indicam que a protease tem maior afinidade pela fase rica em PEG nas condições experimentais analisadas.

A partir dos resultados acima descritos, um novo desenho experimental foi implementado com a intenção de otimizar o processo e a obtenção de maiores valores de K. Neste novo desenho optou-se por usar o PEG de menor massa molar: 2000 g.mol<sup>-1</sup>. Para verificar a influência da concentração de PEG - [PEG], concentração de NaPA - [NaPA] e concentração do caldo fermentado - [Caldo] sobre a partição da protease, um desenho fatorial 2<sup>3</sup> com três repetições no ponto central foi utilizado para analisar estes parâmetros. A opção por usar a concentração de caldo fermentado como 3º parâmetro independente baseou-se na importância industrial do desenvolvimento de sistemas de duas fases aquosas que permitam a partição de consideráveis quantidades de caldo fermentado, tornando assim o processo ainda mais econômico. Neste estudo os fatores de baixa e alta configurações foram codificados como -1 e +1, o ponto médio foi codificado como 0. Os ajustes dos parâmetros foram apresentados sob a forma de valores codificados e de valores reais descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Níveis e valores referentes às variáveis independentes utilizadas na avaliação da partição da protease expressa por *Penicillium restrictum*. Concentração de NaPA, concentração de PEG e concentração de caldo fermentado.

Variáveis independentes	Símbolos	Níveis e valores		
		-1	0	+1
[NaPA] %p/p	X <sub>1</sub>	10,0	15,0	20,0
[PEG] %p/p	X <sub>2</sub>	4,0	6,0	8,0
[Caldo] %p/p	X <sub>3</sub>	25,0	35,0	45,0

X<sub>1</sub> = Concentração de NaPA (%p/p), X<sub>2</sub> = Concentração de PEG (%p/p), X<sub>3</sub> = Concentração de caldo fermentado (%p/p).

Os valores obtidos no desenho experimental para o coeficiente de partição de enzima ( $K$ ), o coeficiente de partição de proteínas totais ( $K_p$ ), o balanço de massa ( $BM$ ), razão volumétrica ( $R$ ), rendimento ( $\eta$ ), fator de purificação ( $Pf$ ) e seletividade ( $S$ ) são mostrados na Tabela 6.

Novamente os menores valores da razão volumétrica  $R$  (sistemas de 2 e 6) foram obtidos para a menor concentração de PEG (4% p/p) juntamente com a maior concentração de NaPA (20% p/p) indicando que estes parâmetros têm uma forte influência sobre  $R$ . As concentrações de ambos os polímeros influenciaram no  $R$  independentemente da concentração de caldo utilizada. A maior diferença de concentração entre ambos os polímeros ( $[NaPA]=20\%$  p/p e  $[PEG]=4\%$  p/p) contribuiu para explicar por que os menores valores de  $R$  obtidos neste segundo desenho experimental (sistema 2 = 0,13 e sistema 6 = 0,17), são ainda menores que os obtidos no primeiro desenho experimental (sistema 3 = 0,5 e sistema 11 = 0,6). A manipulação dos parâmetros que influenciam em  $R$  pode ser importante quando se deseja promover a partição da molécula alvo em determinada fase com volume proporcionalmente maior do que a fase inversa.

Neste segundo desenho experimental os valores de  $BM$ , para a maioria dos sistemas examinados, indicaram que não existem perdas significativas ou inativação de protease. Os elevados valores obtidos – muitos dos quais próximos dos 90% - denotam que a biomolécula é estável em contacto com os componentes de APTS. Como discutido anteriormente, o ambiente quimicamente inerte que os APTS oferecem às biomoléculas é um dos pontos positivos da aplicação deste método.

O coeficiente de partição de proteínas totais ( $K_p$ ) mostra que as proteínas totais presentes no caldo fermentado, continuam preferencialmente na fase rica em NaPA (fase inferior). Porém o novo desenho experimental foi capaz de identificar pontos onde esta tendência se inverte (sistemas 5 e 6) e conseqüentemente o  $K_p$  assume valores maiores que a unidade. De acordo com os resultados, a partição das proteínas totais prioritariamente na fase rica em PEG (fase superior) parece estar associada simultaneamente à menor concentração de PEG (4% p/p) e à maior concentração de caldo (45% p/p), como nos sistemas 5 ( $K_p=1,11$ ) e 6 ( $K_p=1,21$ ). A inversão da partição para a fase TOP demonstra novamente a flexibilidade do método e sua adequação as mais diversas necessidades encontradas durante o processo de otimização da partição. Não foi possível determinar a  $K_p$  do sistema 2 devido ao diminuto volume da fase TOP explicitado em seu pequeno valor de  $R = 0,13$ .

A análise dos dados referentes ao  $K$  demonstram que em todas as concentrações de caldo fermentado e em todas as concentrações de PEG o aumento da concentração de NaPA resultou em um expressivo aumento do coeficiente de partição da protease. Esta tendência pode ser

observada comparando-se o sistema 1 ( $K=2,97$ ) com 2 ( $K=14,86$ ); o sistema 3 ( $K=1,92$ ) com 4 ( $K=18,59$ ); o sistema 5 ( $K=1,98$ ) com 6 ( $K=37,73$ ) e o sistema 7 ( $K=2,76$ ) com 8 ( $K=16,61$ ). Variações na concentração de PEG, em diferentes concentrações de caldo, apresentaram influências diversas em relação ao  $K$ . Com a menor concentração do caldo (25% p/p) o aumento da concentração de PEG levou a uma diminuição de  $K$ ; sistema 1 ( $K=2,070$ ) e sistema 3 ( $K=1,92$ ). Entretanto, comportamento diverso observou-se com 45% p/p de caldo fermentado: sistema 5 ( $K=1,98$ ) e sistema 7 ( $K=2,76$ ).

O terceiro parâmetro analisado - concentração do caldo fermentado - também não apresentou uma única tendência sobre o parâmetro de desempenho  $K$ . Comparando-se os sistemas 1 ( $K=2,97$ ) com 25% p/p de caldo e o sistema 5 ( $K=1,98$ ) com 45% p/p de caldo, observa-se que ocorreu uma diminuição do  $K$ . A mesma tendência ocorre entre os sistemas 4 ( $K=18,59$ ) com 25% p/p de caldo e o sistema 8 ( $K=16,61$ ) com 45% p/p de caldo. Entretanto o coeficiente de partição aumentou comparando-se os sistemas 2 ( $K=14,86$ ) com 25% p/p de caldo e o sistema 6 ( $K=37,73$ ) com 45% p/p e entre o sistema 3 ( $K=1,92$ ) com 25% p/p de caldo e o sistema 7 ( $K=2,76$ ) com 45% p/p.

Analisando-se ainda os valores obtidos para o coeficiente de partição da enzima, observa-se que a escolha pelo PEG 2000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  - embasado pelos resultados das análises preliminares - proporcionou a otimização do processo, a medida que foram atingidos valores bem superiores de  $K$ . Destacam-se os sistemas: 6 ( $K=37,73$ ), 4 ( $K=18,59$ ) e 8 ( $K=16,61$ ).

Como já destacado anteriormente, o parâmetro de desempenho rendimento ( $\eta$ ), é bastante significativo do ponto de vista de aplicação industrial do método. O rendimento correlaciona a concentração total da biomolécula inserida no ATPS e a concentração efetivamente particionada na fase de interesse do sistema. Altos valores de rendimento, aliados com adequado equacionamento do balanço de massa, são bons indicadores da aplicabilidade do método. A partir do desenho experimental proposto conseguiram-se ótimos valores de  $\eta$  principalmente para os sistemas com maiores valores de  $K$  e com balanços de massa indicando que a biomolécula não foi degradada durante o processo. Notadamente citam-se os sistemas: 4 ( $\eta=100$ ), 6 ( $\eta=93,47$ ) e 8 ( $\eta=100$ ).

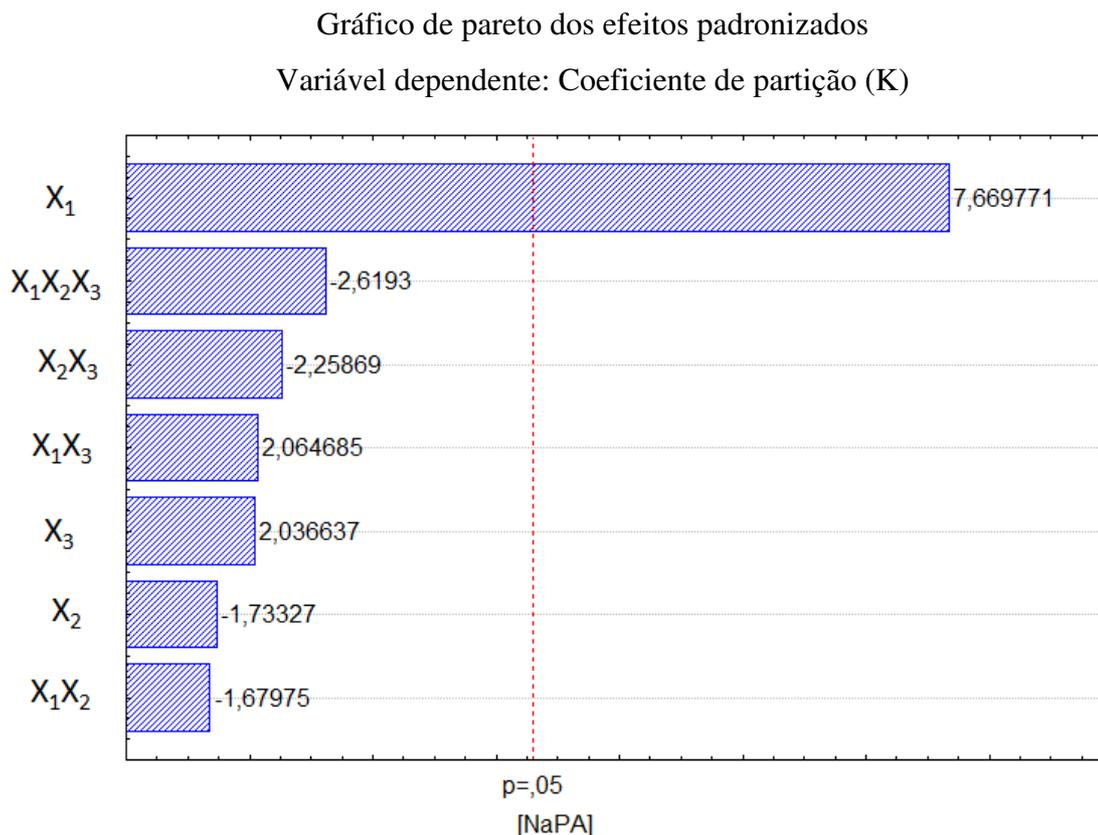
O maior valor de seletividade ( $S = 31,18$ ) foi observado com 20% p/p de NaPA, 4% p/p de PEG e 45% p/p de caldo fermentado. Adicionalmente, o melhor valor para o fator de purificação ( $Pf = 1,98$ ) foi atingido nestes mesmas condições.

**Tabela 6** - Resultados obtidos para o planejamento fatorial  $2^3$  com os parâmetros: concentração de NaPA (10-20% p/p), concentração de PEG (4-8% p/p) e concentração de caldo fermentado de *Penicillium restrictum* (25-45% p/p).

Sistemas	Valores reais			Valores codificados			K	BM	R	$\eta$	Kp	Pf	S
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>							
1	10	4	25	-	-	-	2,97	80,60	0,36	41,49	0,66	0,58	4,5
2	20	4	25	+	-	-	14,86	102,27	0,13	66,47	-	-	-
3	10	8	25	-	+	-	1,92	64,07	0,73	37,28	0,46	0,43	4,16
4	20	8	25	+	+	-	18,59	117,54	0,33	100,00	0,70	1,04	26,55
5	10	4	45	-	-	+	1,98	81,81	0,36	33,9	1,11	0,55	1,78
6	20	4	45	+	-	+	37,73	107,83	0,17	93,47	1,21	1,98	31,18
7	10	8	45	-	+	+	2,76	99,98	0,73	66,77	0,78	0,80	3,54
8	20	8	45	+	+	+	16,61	118,78	0,36	100,00	0,91	1,73	9,62
9	15	6	35	0	0	0	6,04	109,33	0,42	78,24	0,84	1,05	7,19
10	15	6	35	0	0	0	7,90	94,69	0,42	72,61	0,76	1,11	10,39
11	15	6	35	0	0	0	13,00	89,54	0,42	75,60	0,82	1,04	15,85

X<sub>1</sub> = Concentração de NaPA (%p/p), X<sub>2</sub> = Concentração de PEG (%p/p), X<sub>3</sub> = Concentração do caldo fermentado (%p/p), K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional), BM = Balanço de massa (%), R = Razão volumétrica (adimensional), Kp = Coeficiente de partição de proteínas totais,  $\eta$  = Rendimento (%), Pf = fator de purificação (adimensional) e S = Seletividade (adimensional).

Uma análise estatística foi utilizada para avaliar os efeitos principais e da existência de interação entre eles. A Figura 18 mostra diagrama de Pareto que representa os efeitos estimados em ordem decrescente, em relação à concentração de NaPA, a concentração de PEG e concentração de caldo fermentado de *Penicillium restrictum* e da sua interação com os valores obtidos para o coeficiente de partição K.



**Figura 18** - Diagrama de Pareto para as variáveis de concentração NaPA, a concentração de PEG e concentração de caldo fermentado de *Penicillium restrictum* sobre o coeficiente de partição da protease.  $X_1$  = Concentração de NaPA (%p/p),  $X_2$  = Concentração de PEG (%p/p) e  $X_3$  = Concentração do caldo (%p/p).

A partir da Figura 18 pode-se observar que o efeito principal da concentração de NaPA ( $X_1$ ) foi o único significativo. Como analisado anteriormente, o aumento da concentração de NaPA apresenta efeito positivo (7,67) sobre o parâmetro de performance K. Todos os demais efeitos principais e interações entre os mesmos não foram representativos.

A análise de variância ANOVA (Tabela 7), revelou que o valor do coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,95812$ ) foi elevado. A adequação do modelo também é verificada através do valor obtido pelo  $R^2$  ajustado. Neste caso o  $R^2$  ajustado foi igual a 86,04%. Se o modelo representa adequadamente o fenômeno, o teste de falta de ajuste (“lack-of-fit”) não deve ser significativo ( $P > 0,05$ ) (Calado, 2003). O valor P obtido para o teste de falta de ajuste foi de  $P = 0,3204$  (não significativo).

**Tabela 7** - A análise de variância (ANOVA) que representa a partição da protease expressa por *Penicillium restrictum* em ATPS NaPA/PEG/NaCl.

Fatores	SS	GL	MS	F	p
[NaPA] (X <sub>1</sub> )	763,388	1	763,3879	58,82538	0,016578
[PEG] (X <sub>2</sub> )	38,986	1	38,9863	3,00422	0,225186
[Caldo] (X <sub>3</sub> )	53,828	1	53,8279	4,14789	0,178608
1 by 2	36,616	1	36,6159	2,82156	0,235019
1 by 3	55,321	1	55,3208	4,26293	0,174979
2 by 3	66,205	1	66,2052	5,10166	0,152429
1*2*3	89,033	1	89,0327	6,86071	0,120066
Falta de ajuste	22,272	1	22,2720	1,71624	0,320425
Erro puro	25,954	2	12,9772		
Total SS	1151,603	10			

SS = soma dos quadrados; GL = Grau de liberdade; MS = Média dos quadrados  $R^2 = 0,95812$ .

Significativo ao nível de 95%

O modelo matemático que descreve a partição da protease expressa por *Penicillium restrictum* em ATPS NaPA/PEG pode ser representado pela equação 10.

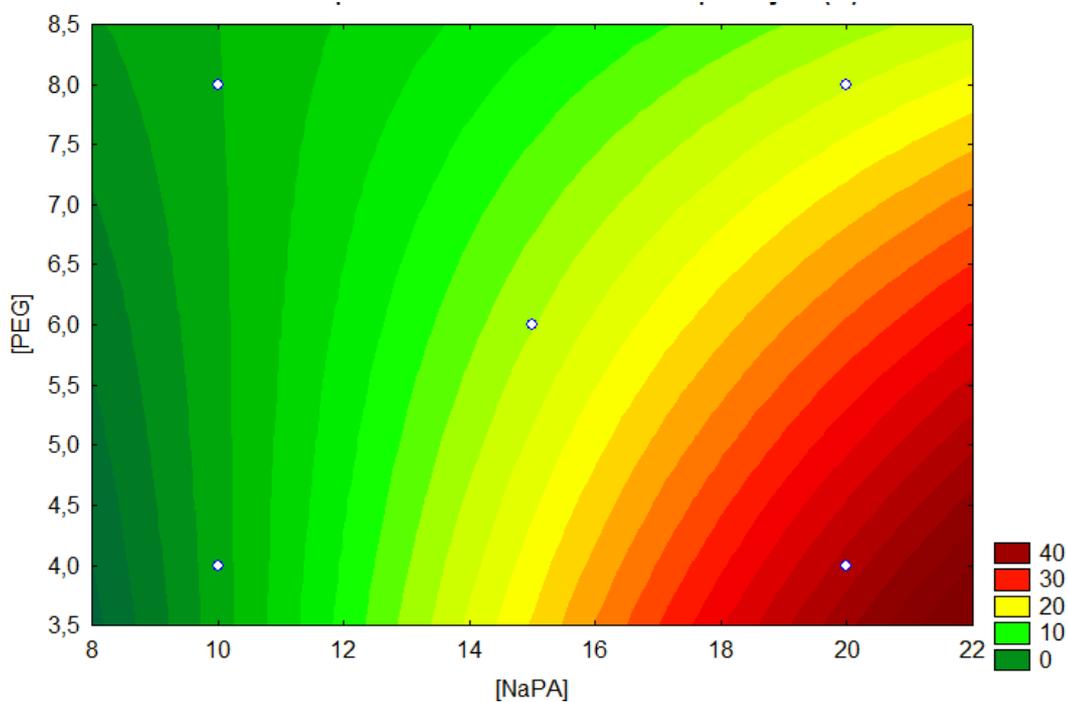
$$Y = -17,13005 + 1,95370X_1 \quad \text{Equação 10}$$

Onde Y representa o valor predito para o coeficiente de partição da enzima (K) e X<sub>1</sub> representa a concentração de NaPA.

A Figura 19 mostra o gráfico de contorno descrevendo os valores obtidos para K em relação aos parâmetros concentração de NaPA e concentração de PEG em sistemas com 45% p/p de caldo fermentado de *Penicillium restrictum*. As linhas de contorno mostram a tendência de resposta da variável dependente. Cada linha representa um mesmo valor para a variável resposta. Observa-se a existência de linhas curvas, indicando interação significativa entre as variáveis independentes. A ocorrência de paralelismo indicaria falta de interação significativa.

## Gráfico de contorno

Variável dependente: Coeficiente de partição (K)

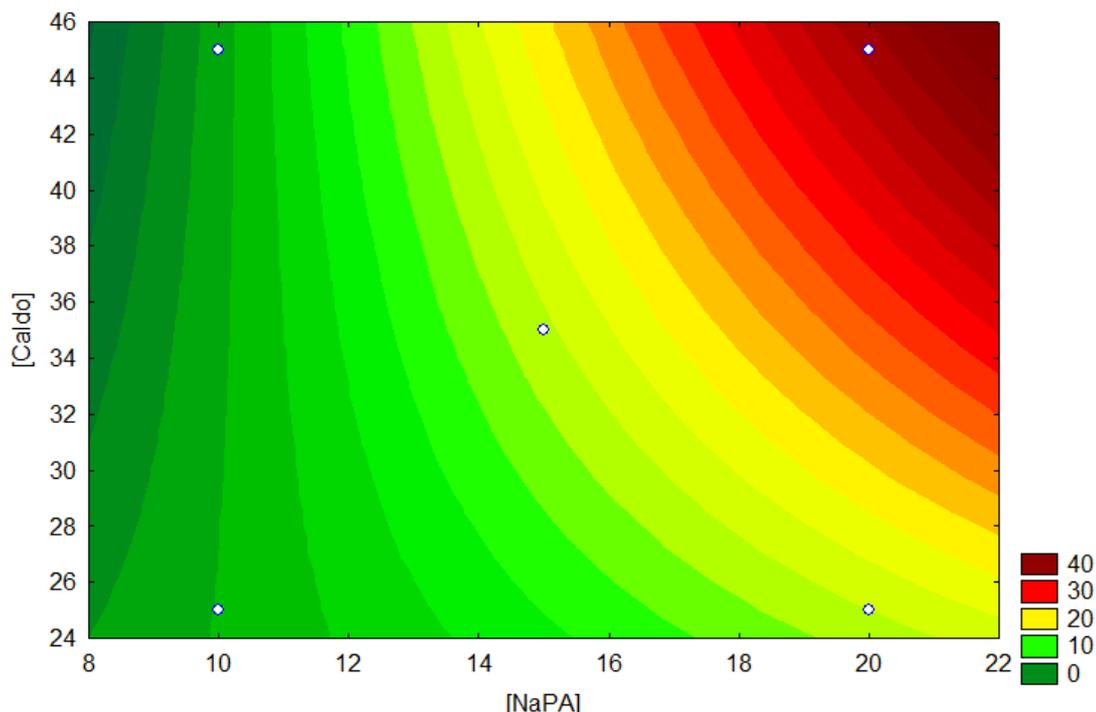


**Figura 19** - Gráfico de contorno representando os valores do coeficiente de partição relacionados com concentração de NaPA e concentração de PEG em sistemas com concentração de 45% p/p de caldo fermentado de *Penicillium restrictum*. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional).

Na Figura 20 tem-se o gráfico de contorno descrevendo os valores obtidos para K em relação aos parâmetros concentração de NaPA e concentração de caldo fermentado de *Penicillium restrictum* em sistemas com 4% p/p de PEG.

## Gráfico de contorno

Variável dependente: Coeficiente de partição (K)

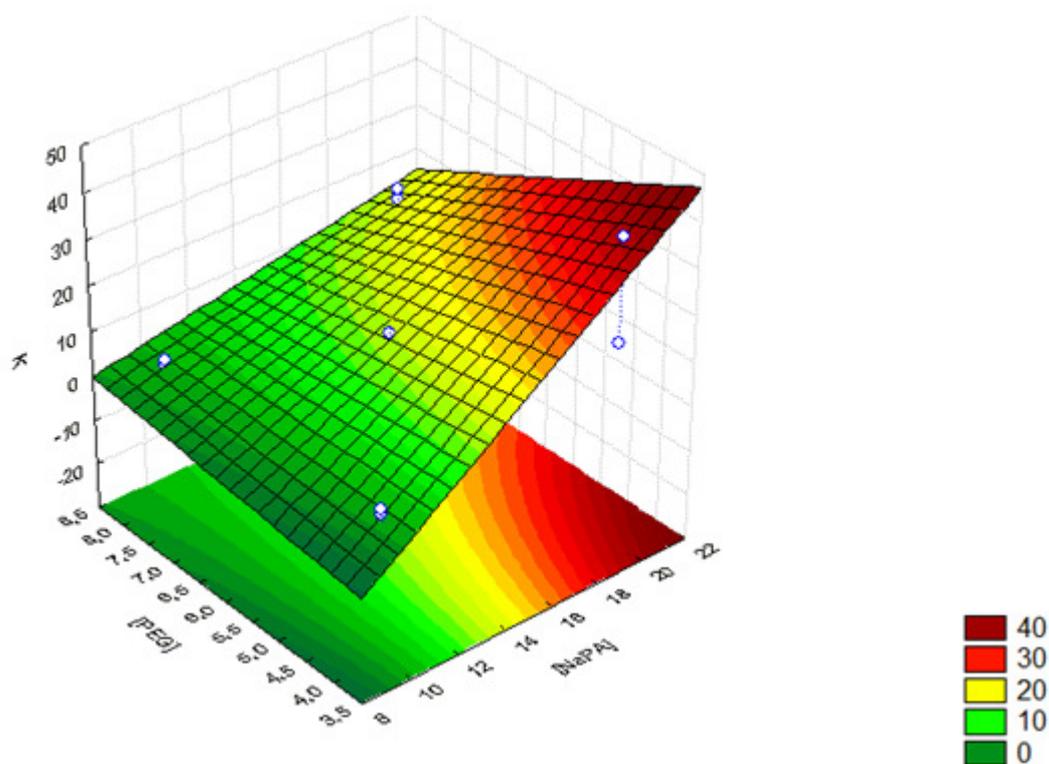


**Figura 20** - Gráfico de contorno representando os valores do coeficiente de partição relacionados com concentração de NaPA e concentração de caldo fermentado de *Penicillium restrictum* em sistemas com concentração de 4% p/p de PEG. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [Caldo] = Concentração do caldo fermentado (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional).

O gráfico de superfície de resposta obtido para os valores de coeficiente de partição em relação às mudanças nas concentração de ambos os polímeros em sistemas bifásicos aquosos com concentração de 45% p/p de caldo fermentado de *Penicillium restrictum* é mostrado na Figura 21. Como comentado anteriormente, o aprimoramento de ATPS que comportem grandes quantidades de matriz (caldo fermentado, por exemplo) é uma linha de pesquisa importante, por impactar diretamente nos custos de sua aplicação industrial. Os maiores valores de K foram obtidos através das menores concentrações de PEG simultaneamente às maiores concentrações de NaPA.

## Gráfico de superfície de resposta

Variável dependente: Coeficiente de partição (K)

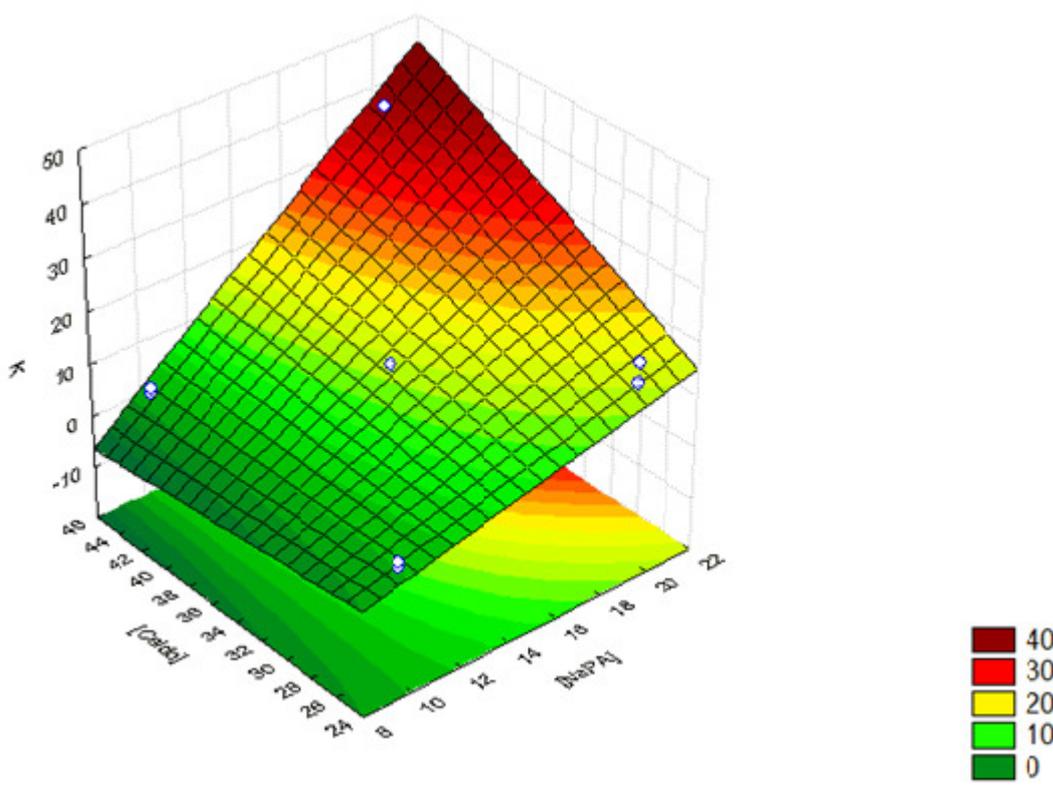


**Figura 21** - Gráfico de superfície de resposta relacionando o coeficiente de partição em função da variação da concentração de NaPA e concentração de PEG 2000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , em ATPS contendo 45% p/p de caldo de *Penicillium restrictum* e 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a 25 ° C. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional).

O gráfico de superfície de resposta obtido para os valores de coeficiente de partição em relação às mudanças nas concentrações de NaPA e do caldo fermentado de *Penicillium restrictum* em sistemas de duas fases aquosas com 4% p/p de PEG é mostrado na Figura 22. A otimização do processo ocorreu com os valores máximos de ambos os parâmetros de entrada; maiores concentrações de NaPA simultaneamente à maior concentração de caldo fermentado.

## Gráfico de superfície de resposta

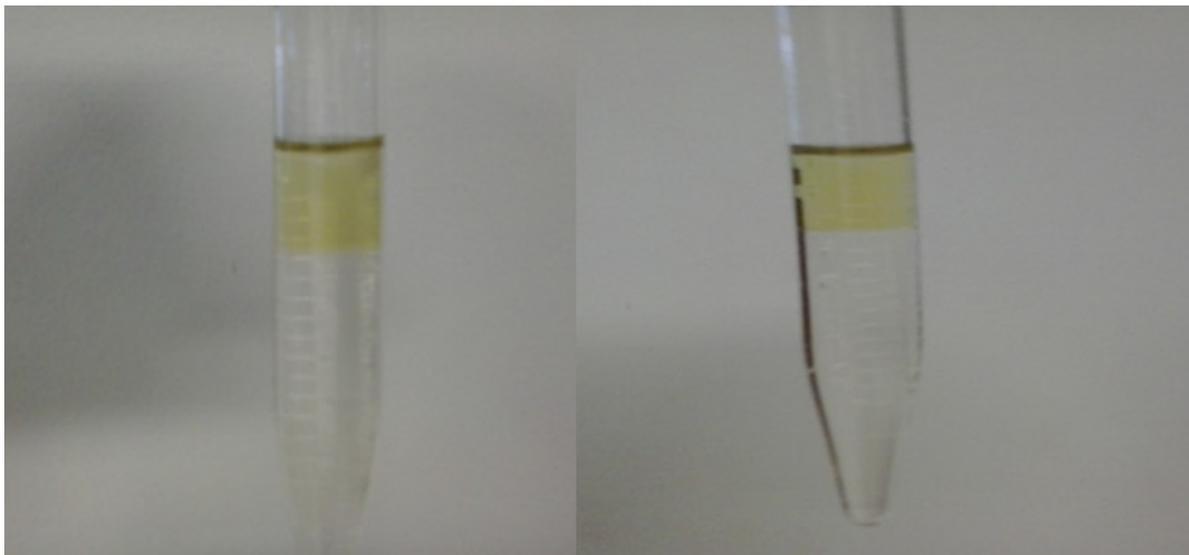
Variável dependente: Coeficiente de partição (K)



**Figura 22** - Gráfico de superfície de resposta relacionando o coeficiente de partição em função da variação da concentração de NaPA e concentração de caldo fermentado de *Penicillium restrictum*, em ATPS contendo 4% p/p de PEG e 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a 25 ° C. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [Caldo] = Concentração de caldo fermentado (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional).

### 5.3 - Partição de protease expressa por *Penicillium fellutanum*.

A purificação de proteases expressas pelo fungo filamentosso *Penicillium fellutanum* foi estudada aplicando novamente o ATPS – NaPA/PEG. A partição através de sistemas de duas fases aquosas PEG/NaPA destas proteases produzidas extracelularmente pelos fungos *P. fellutanum* também foi baseada nos diagramas de fase descritos por Johansson e colaboradores (Johansson, 2011). A Figura 23 apresenta fotos do sistema bifásico aquoso obtido a partir do caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* com NaPA/PEG.



**Figura 23** – Fotos do sistema bifásico aquoso obtido a partir do caldo fermentado de *Penicillium fellutanum* com NaPA/PEG/NaCl.

Nesta etapa do trabalho variou-se a concentração dos polímeros e a massa molar de PEG. Também foi realizada a reextração da protease com diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Para verificar a influência da concentração de NaPA – [NaPA], da concentração de PEG – [PEG] ( $X_2$ ) e da massa molar de PEG – MMPEG ( $X_3$ ) na partição de protease, um desenho fatorial  $2^3$  com três repetições no ponto central foi utilizado. O planejamento fatorial com dois níveis assume linearidade nos efeitos dos fatores. No entanto, o modelo de superfície de resposta (equação 9) pode ser proposto, a fim de representar alguma torção que existe no plano (Calado, 2003).

Neste estudo os fatores de baixa e alta configurações foram codificados como -1 e +1, o ponto médio foi codificado como 0. Os ajustes dos parâmetros foram apresentados sob a forma de valores codificados e de valores reais descritos na tabela 8.

**Tabela 8** – Níveis e valores referentes às variáveis independentes utilizadas na avaliação da partição da protease expressa por *Penicillium fellutanum*. Concentração de NaPA, concentração de PEG e massa molar de PEG.

Variáveis independentes	Símbolos	Níveis e valores		
		-1	0	+1
[NaPA] %p/p	$X_1$	6,0	8,0	10,0
[PEG] %p/p	$X_2$	6,0	8,0	10,0
MMPEG (g.mol <sup>-1</sup> )	$X_3$	2000	4000	6000

$X_1$  = Concentração de NaPA (%p/p),  $X_2$  = Concentração de PEG (%p/p) e  $X_3$  = Massa molar de PEG (g.mol<sup>-1</sup>).

O coeficiente de partição (K) da protease foi considerado como a variável dependente, da resposta, das experiências de desenho fatorial. O delineamento experimental e os resultados foram analisados utilizando-se a equação 9.

A partição da protease (K) expressa por *Penicillium fellutanum* foi determinada experimentalmente em sistemas bifásicos aquosos com PEG/NaPA a 25°C em tampão McIlvaine pH 6,5 e NaCl a 1,05% em peso. Foram utilizados 30% p/p de caldo fermentado. Para avaliar o efeito da massa molar de PEG sobre a partição da enzima foram usados PEG com diferentes massas molares 2000, 4000 e 6000 g.mol<sup>-1</sup>.

Os valores obtidos no desenho experimental para o coeficiente de partição da enzima (K), o balanço de massa (BM), a razão volumétrica (R) e o rendimento ( $\eta$ ) são mostrados na tabela 9. Em todos os sistemas analisados as proteínas totais apresentaram grande preferência pela fase superior. Assim, não foi possível determinar a concentração na fase inferior e conseqüentemente o coeficiente de partição de proteínas totais (K<sub>P</sub>) e Seletividade (S). Os resultados para os sistemas com PEG 2000 g.mol<sup>-1</sup> mostram que a diminuição da concentração de PEG resultou em um decréscimo de K (sistemas 1 e 11 e sistemas de 9 e 10). O aumento na concentração de NaPA causou aumento de K em sistemas com baixas concentrações de PEG 2000g.mol<sup>-1</sup> (sistemas de 10 e 11). A análise inicial revelou que as concentrações de ambos os polímeros de influenciam o coeficiente de partição (K) nos várias massas molares de PEG.

Geralmente, a utilização de polímeros com massa molar mais elevado, diminui a quantidade de solvente disponível o que implica uma menor solubilidade de biomolécula na respectiva fase (Albertsson 1986). Os resultados experimentais para K (sistemas 1 e 4 , 5 e 10 , 3 , 11 , 7 e 9) apoiam a teoria do volume de exclusão analisadas (Forciniti, 1991b; Schmidt, 1994). Alguns dos maiores valores para o coeficiente de partição da enzima foram obtidos com PEG 2000 (K = 77,51; 55,90 e 30,19), indicando a importância deste parâmetro na partição.

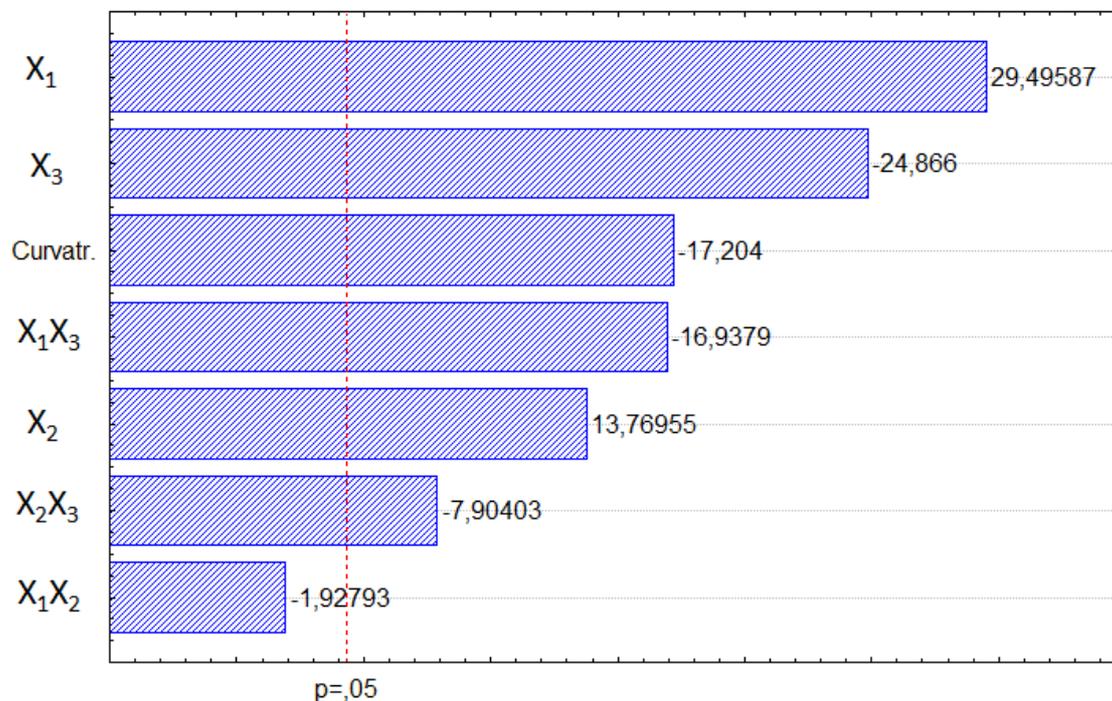
**Tabela 9** - Resultados obtidos para o planejamento fatorial  $2^3$  com os parâmetros: concentração de NaPA (6-10% p/p), concentração de PEG (6-10% p/p) e massa molar de PEG (2000-6000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Sistemas	Valores			Níveis			Resultados			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	K	BM	R	$\eta$
1	10	10	2000	+	+	-	77,51	91,34	0,77	89,84
2	8	8	4000	0	0	0	10,98	55,81	0,52	47,46
3	10	6	6000	+	-	+	21,72	76,75	0,45	69,65
4	10	10	6000	+	+	+	24,78	49,16	0,81	46,82
5	6	6	6000	-	-	+	5,62	49,95	1,04	42,67
6	8	8	4000	0	0	0	13,91	59,26	0,52	52,03
7	6	10	6000	-	+	+	14,76	71,18	1,18	67,33
8	8	8	4000	0	0	0	12,67	58,87	0,52	51,08
9	6	10	2000	-	+	-	30,19	79,55	1,65	77,98
10	6	6	2000	-	-	-	6,68	51,74	1,00	45,01
11	10	6	2000	+	-	-	55,94	102,23	0,57	99,10

$X_1$  = Concentração de NaPA (p/p %),  $X_2$  = Concentração de PEG (p/p %),  $X_3$  = massa molar de PEG ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), K = coeficiente de partição enzimática (adimensional), BM = balanço de massa (%), R = razão volumétrica (adimensional) e  $\eta$  = rendimento (%).

A análise estatística foi utilizada para avaliar melhor os efeitos principais e a existência de interação entre eles. A Figura 24 mostra um gráfico de Pareto que representa os efeitos estimados em ordem decrescente de grandeza, relativos à concentração de NaPA, concentração de PEG, massa molar de PEG e suas interações com os valores obtidos para o coeficiente de partição da enzima (K).

Gráfico de pareto dos efeitos padronizados  
Variável dependente: Coeficiente de partição (K)



**Figura 24** - Diagrama de Pareto para as variáveis de concentração NaPA, a concentração de PEG e massa molar de PEG sobre o coeficiente de partição da protease.  $X_1$  = Concentração de NaPA (p/p %),  $X_2$  = Concentração de PEG (p/p %) e  $X_3$  = massa molar de PEG ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Como pode ser visto na Figura 24 os efeitos da concentração de NaPA ( $X_1$ ), da concentração de PEG ( $X_2$ ) e da massa molar do PEG ( $X_3$ ) foram significativos. A concentração de NaPA (29,50) apresentou o principal efeito para o coeficiente de partição (K), seguido pela massa molar do PEG (-24,87) e da concentração de PEG (13,77).

Os resultados indicam que a concentração de ambos os polímeros têm uma influência positiva sobre os valores de K. O sinal negativo referente à massa molar de PEG indica que K aumenta com a diminuição da massa molar do PEG. Isto pode ser explicado pela teoria do volume de exclusão. Foi previsto sinal negativo (-) para a interação entre as variáveis  $X_1$  e  $X_3$ , indicando que aumentos simultâneos de concentração de NaPA e da massa molar de PEG tendem a reduzir os valores de K. Deste modo maiores valores de K podem ser obtidos utilizando-se menor massa molar de PEG e maiores concentrações de NaPA na respectiva região experimental. O efeito da interação entre as variáveis  $X_2$  e  $X_3$  também apresentou estimado sinal negativo (-). Assim, a utilização simultânea de alta concentração de PEG com massas moleculares mais

elevadas tende a diminuir os valores de K. A interação entre as variáveis X1 e X2 não demonstrou ser significativa.

Os resultados da ANOVA (Tabela 10) mostrou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,99872. Valores de  $R^2 > 90\%$  demonstram uma boa desempenho no desenho experimental de bioprocessos (Silva 2009). A falta de ajuste não foi significativa ( $P=0,4245$ ). Os resultados indicam que o modelo proposto é adequado para a região experimental analisada.

**Tabela 10** - Análise de variância (ANOVA) que representa a partição da protease expressa por *Penicillium fellutanum* em ATPS NaPA/PEG/NaCl.

Fatores	SS	GL	MS	F	p
Curvatura	640,226	1	640,226	295,9761	0,003362
[NaPA] (X1)	1881,911	1	1881,911	870,0066	0,001147
[PEG] (X2)	410,125	1	410,125	189,6005	0,005233
MMPEG(X3)	1337,479	1	1337,479	618,3159	0,001613
1 by 2	8,040	1	8,040	3,7169	0,193675
1 by 3	620,576	1	620,576	286,8922	0,003468
2 by 3	135,137	1	135,137	62,4737	0,015632
<i>Falta de ajuste</i>	2,142	1	2,142	0,9905	0,424496
Erro puro	4,326	2	2,163		
Total SS	5039,963				

SS = soma de quadrados; GL = grau de liberdade; MS = média de quadrados;  $R^2 = 0,99872$ .

Significativo ao nível de 95%

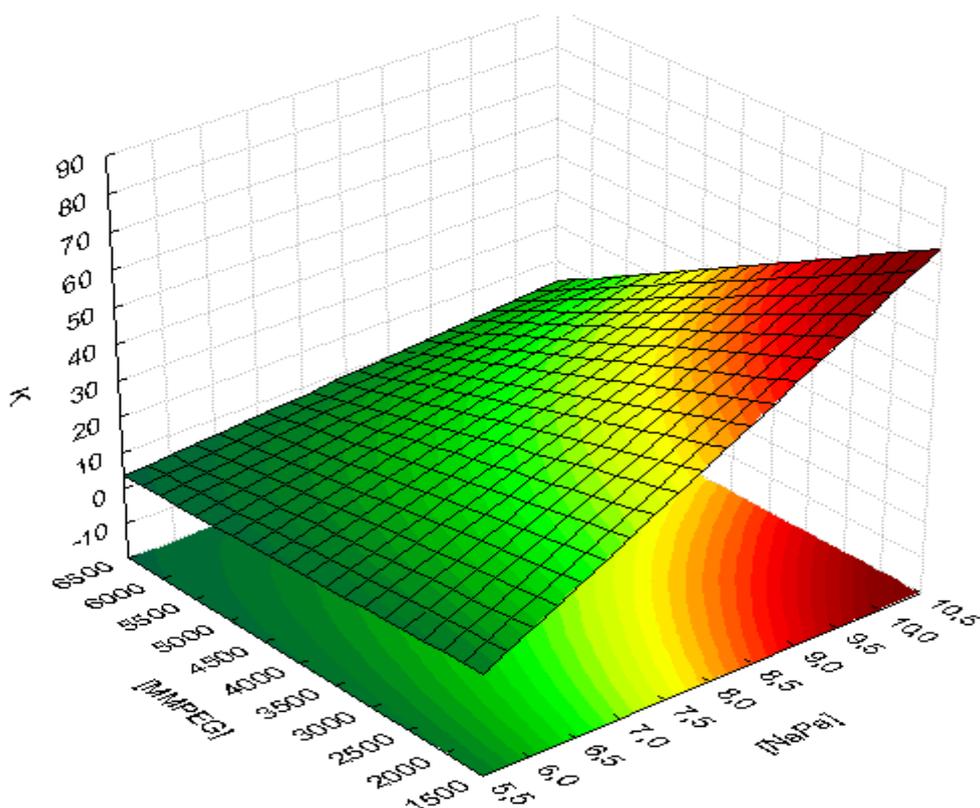
O modelo matemático que representa a partição da protease expressa por *Penicillium fellutanum* no sistema bifásico aquoso NaPA/PEG/NaCl considerando as variáveis significativas é descrito pela equação 11.

$$Y = -137,82 + 16,48(X_1) + 7,69(X_2) + 0,019(X_3) - 0,0022(X_1X_3) - 0,001(X_2X_3) \quad \text{Equation 9}$$

A Figura 25 mostra o gráfico de superfície de resposta para os valores de K em relação a alterações nas concentrações de NaPA e PEG 6000.mol<sup>-1</sup>.

Gráfico de superfície de resposta

Variável dependente: Coeficiente de partição (K)



**Figura 25** - Gráfico de resposta de superfície relacionando o coeficiente de partição (K) em função da concentração de NaPA e concentração de PEG (6000g.mol<sup>-1</sup>) em ATPS contendo com 1,05% p/p de NaCl, em tampão de McIlvaine (pH 6,5) a 25°C. [NaPA] = Concentração de NaPA (%p/p), [PEG] = Concentração de PEG (%p/p) e K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional).

Como as proteína totais e a protease preferencialmente particionaram na fase superior foi construído um novo ATPS em outra região experimental que poderia fornecer valores mais baixos de K e assim um passo efetivo de pré-purificação. De acordo com os resultados anteriores, um sistema com 3% em peso de PEG-6000 g.mol<sup>-1</sup> e 7% em peso de NaPA (sistema denominado 12) foi preparado em busca de dirigir a partição da enzima para a fase inferior.

Os valores obtidos para o coeficiente de partição da enzima (K), balanço de massa (BM), razão volumétrica (R) e rendimento ( $\eta$ ) são mostrados na tabela 11. Também no sistema 12 as proteínas totais mantiveram uma preferência maior pela fase superior. Por isso, não foi possível

determinar a concentração na fase inferior e, portanto, o coeficiente de partição de proteínas ( $K_p$ ) e Seletividade (S).

**Tabela 11** - Resultados obtidos para o coeficiente de partição (K), balanço de massa (BM), razão volumétrica (R) e rendimento ( $\eta$ ), utilizando 7% p/p de NaPA e 3% p/p de PEG6000g.mol<sup>-1</sup>.

Sistema	Valores			Resultados			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	K	BM	R	$\eta$
12	7	3	6000	4,26	67,4	0,18	29,62

X<sub>1</sub> = Concentração de NaPA (% em p/p), X<sub>2</sub> = Concentração de PEG (% em p/p), X<sub>3</sub> = Massa molar de PEG (g.mol<sup>-1</sup>), K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional), BM = balanço de massa (%), R = Razão volumétrica (adimensional) e  $\eta$  = rendimento (%).

Entretanto o valor de K permaneceu ainda maior do que a unidade, indicando que a enzima permaneceu prioritariamente na fase superior. Devido à proximidade com a região monofásica delimitada pela curva binodal não foi possível analisar outros sistemas na busca por menores valores de K.

A reextração objetivou direcionar a partição das proteínas totais para a fase inferior e, conseqüentemente, permitir a pré-purificação da protease. Para realizar a reextração, sistema de 11 foi escolhido, pois o mesmo mostrou o maior rendimento. Após a partição inicial para a fase superior, esta fase foi recolhida e adicionado o sal Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5, 10 e 15% em p/p) para promover a reextração. Foi avaliada a influência da concentração de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre o coeficiente de partição de proteínas ( $K_p$ ) e razão volumétrica (R), resultados apresentados na tabela 12.

**Tabela 12** – Resultados da reextração realizada a partir da fase superior do sistema bifásico aquoso NaPA (10% em p/p)/PEG 2000g.mol<sup>-1</sup> (6% em p/p)/NaCl (1,05% em p/p) com diferentes concentrações de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

	[Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5wt%]	[Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10wt%]	[Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 15wt%]
K <sub>p</sub>	0,93	1,55	3,14
R	1,17	0,44	0,26

[Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] = Concentração de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (%p/p), K<sub>p</sub> = Coeficiente de partição de proteínas totais e R = Razão volumétrica.

De acordo com os resultados observados a concentração de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> altera os valores de K<sub>p</sub> e de R. O aumento da concentração salina provoca uma diminuição na razão volumétrica. Isto pode ser explicado pelo fato de que o aumento da concentração de sal na fase inferior levar a um

aumento de moléculas de água necessárias para a solvatação e conseqüentemente o aumento do volume (Lopes 2006; Johansson 2008a).

A menor concentração de sal (5% em peso) levou à obtenção de  $K_p$  abaixo da unidade indicando a partição das proteínas totais preferencialmente na fase inferior, promovendo assim, a pré-purificação da protease. O elevado valor de R conduz a um aumento de rendimento na fase superior. A reextração do sistema utilizando a concentração mais baixa de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  foi escolhida para avaliar o coeficiente de partição de parâmetros (K), o balanço de massa (BM) e rendimento ( $\eta$ ). Os resultados estão apresentados na tabela 13.

**Tabela 13** – Resultados da reextração realizada a partir da fase superior do sistema bifásico aquoso NaPA (10% em p/p)/PEG 2000g.mol<sup>-1</sup> (6% em p/p)/NaCl (1,05% em p/p) com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (p/p 5%).

Sistema	Resultados				
	K	BM	R	$\eta$	$K_p$
Reextração com $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (p/p 5%)	1,21	74,69	1,17	56,10	0,93

K = Coeficiente de partição da enzima (adimensional),  $K_p$  = Coeficiente de partição de proteínas totais (adimensional), BM = Balanço de massa (%), R = Razão volumétrica (adimensional) e  $\eta$  = rendimento (%).

A reextração utilizando baixas concentrações de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  levou a um decréscimo de K, entretanto permitiu a obtenção de  $K_p$  menor que a unidade. As concentrações mais baixas de sal (2, 3 e 4% em p/p) foram testadas na tentativa de diminuir ainda mais o  $K_p$ , mas a partição dos sistemas não foi observada devido à proximidade com a região monofásica.

## 6 – Conclusões

### 6.1 – Partição da protease expressa por *Penicillium restrictum*.

Durante os estudos da partição da protease expressa por *Penicillium restrictum* em sistema de duas fases aquosas NaPA/PEG observou-se altos valores dos balanços de massa para a biomolécula de interesse (BM = 102,27; 117,54; 107,83; 118,78 e 109,33). A grande maioria dos coeficientes de partição de proteínas totais (Kp) apresentou valores abaixo de 1 o que indica uma preferência por proteína rica em fase inferior NaPA. Deste modo o processo deve buscar a migração da enzima para a fase superior garantindo assim a efetiva purificação da mesma. Analisando ambos os desenhos experimentais construídos com o caldo fermentado de *Penicillium restrictum*, observou-se que os coeficientes de partição da enzima (K) tiveram grande diferença de valores. Em um extremo  $K=0,06$  indica preferência pela fase pesada, enquanto que do outro  $K=37,73$  mostra a partição ocorrendo preferencialmente na fase superior (rica em PEG). O fator de purificação (Pf) foi influenciado pela concentração de ambos os polímeros e massa molar de PEG. O maior valor obtido foi  $Pf = 1,98$ . O melhor resultado para a seletividade ( $S = 31,18$ ) indica que a protease tem maior afinidade pela fase rica em PEG no sistema com 20% p/p de NaPA, 4% p/p de PEG e 45% p/p de caldo fermentado. Conclui-se que a modulação dos parâmetros de entrada, tais como; concentração de NaPA, concentração de PEG, concentração de caldo fermentado e da massa molar do PEG mostra-se como ferramenta importante no entendimento de como dirigir a partição à fase de interesse. Os resultados indicam a flexibilidade e potencialidades do método. A concentração de NaPA mostrou-se como o parâmetro mais importante sobre o coeficiente de partição da enzima. O rendimento para muitos dos sistemas referentes ao 2º desenho experimental foi superior a 90% o que representa um fator importante para a aplicação industrial destes processos de purificação.

### 6.2 – Partição de protease expressa por *Penicillium fellutanum*.

Durante os estudos da partição da protease expressa por *Penicillium fellutanum* em sistema bifásico aquosos NaPA/PEG/NaCl observou-se a tendência da biomolécula pela fase superior (fase rica em PEG) . Os maiores valores de K foram obtidos com o uso da menor massa molar de PEG e concentrações mais elevadas de PEG e NaPA . Um modelo matemático foi proposto correlacionando valores de K com concentrações de ambos os polímeros, massa molar

de PEG e as suas inter-relações. O maior valor obtido para K foi 77,51 com o sistema com 10% em peso de NaPA e 10% em peso de PEG  $2000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . O valor mais baixo de K obtido foi de 4,26 para o sistema com 7% de peso de NaPA e 3% em peso de PEG  $6000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Para todos os sistemas analisados a partição das proteínas totais ( $K_p$ ) ocorreu preferencialmente na fase superior (fase rica em NaPA), sendo necessário realizar a reextração a fim de proporcionar um passo eficaz para a pré-purificação da enzima alvo. Na etapa de reextração observou-se que o aumento da concentração de sal provoca uma diminuição na razão volumétrica. A reextração foi realizada com a protease expressa por *Penicillium fellutanum*. A adição de 5% em peso de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  permitiu a obtenção de valores de  $K_p$  inferiores à unidade promovendo deste modo uma etapa de pré-purificação da protease.

Os resultados obtidos demonstram o potencial da utilização do sistema bifásico aquoso NaPA/PEG/NaCl como método barato, rápido e simples de pré-purificação de proteases expressas por fungos do Cerrado (*Penicillium restrictum* e *Penicillium fellutanum*).

## 7 – Referências bibliográficas

1. Agematu, H.; Tsuchida, T.; Kominato, K.; Shibamoto, N.; Yoshioka, T.; Nishida, H. Enzymatic dimerization of penicillin. *X J Antibiot*, 46, p.141–148, 1993.
2. Alho, C. J. The value of biodiversity. *Braz. J. Biol.* 68, p. 1115–1118, 2008.
3. Anitha, T. S.; Palanivelu, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expression and Purification*, 88, p. 214–220, 2013.
4. Albertsson, P. A. Partition of cell particles and macromolecules, John Wiley, 3ª edição, 1986.
5. Asenjo, J. A. Separation processes in biotechnology. New York, Marcel, Dekker, 1990.
6. Asenjo, J. A. Industrial prospects of aqueous two-phase processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 59, p.109, 1994.
7. Azevedo, A. M.; Rosa, P. A. J.; Ferreira, I. F.; Barros, R. A. M. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends in Biotechnology*. 24(4):240-7, 2009.
8. Banke, S.; Frisvad, J.C.; Rosendahl, S. Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. *Mycol. Res.*, 101, p. 617-624, 1997.
9. Barthomeuf, C. H.; Pourrat, M.; Pourrat, A. Protease production by different *Aspergillus sp.* *Biotech. Tech.*, 2, p. 29, 1988.
10. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. Vol. 1, 1ª edição, Série Manuais, Editora Unicamp, Campinas-SP, 302, 1995.
11. Battaglino, R. A.; Huergo, M.; Pilosuf, A. M. R.; Bartholomdi, G. B. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, p. 292-296, 1991.
12. Bech, A. M.; Foltmann, B. Partial primary structure of *Mucor miehei* protease. *Neth. Milk Dairy J.* 35, p. 275-280, 1981.
13. Blinkovsky, A. M.; Buyn, T.; Brown, K. M.; Golitghly, E. Purification, characterization

- and heterologous expression in *Fusarium venenatum* of a novel serine carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, p. 3298-3303, 1999.
14. Bollag, J.M.; Leonowicz, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl Environ Microbiol*, 48, p. 849–54, 1984.
  15. Borracini, H. M. P. Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2006.
  16. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, p. 248–254, 1976.
  17. Brix, K.; Sttöcker, W. *Proteases: Structure and Function*, Springer, 2013.
  18. Bruce, E. M. Inhibitors of serine proteases as potential therapeutic agents: the road from thrombin to tryptase to cathepsin G. *Journal of Medicinal Chemistry* 47, 769–787, 2004.
  19. Bueno, D. J.; Silva, J. O.; Oliver, G. Hongos ambientales en una biblioteca: um año de estudio. *Anales de Documentación*, 6, p. 27–34, 2003.
  20. Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R. Reversed micelles in liquid-liquid extraction. in: Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S. *Recovery processes for biological materials*. Chichester: John Wiley & Sons, p. 247-271, 1993.
  21. Calado, V.; Montgomery, D. *Planejamento de experimentos usando o Statistica*, E-papers, Rio de Janeiro, 2003.
  22. Canevarolo, S. V. *Ciência dos polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*, Artliber editora, São Paulo, 2002.
  23. Chakrabarti, S. K.; Matsumura, N.; Ranu, R. S. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). *Curr. Microbiol.*, 40, p. 239-243, 2000.
  24. Chen, B.; Wu, Q.; Xu, Y. Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*. Accepted date: 7 March 2014.
  25. Christensen, M.; Miller, S.L.; Tuthill, D.I. Colour standards: a review and evaluation in relation to *Penicillium* taxonomy. *Mycol. Res.* 98, p. 635-644, 1994.

26. Coimbra, J. S. R. Desempenho de um extrator tipo grasser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.
27. Costa, S. A.; Pessoa JR, A.; Roberto, I. C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, v. 743, p. 339-348, 2000.
28. Couto, R. S.; Herrera, J. L. T. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 25, p.558–569, 2007.
29. Cowan, D. A.; Daniel, R. M. A modification for increasing the sensitivity of the casein-agar plate assay: a simple semiquantitative assay for thermophilic and mesophilic proteases. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 6, p. 31–37, 1982.
30. Cox, P. W.; Paul, G. C.; Thomas, C. R. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology*, 144, p. 817-827, 1998.
31. Cronenberg, C. C. H.; Ottengraf, S. P. P.; Van den Heuvel, J. C.; Pottel, F.; Sziele, D.; Schügerl, K.; Bellgardt, K. H. Influence of age and structure of *Penicillium chrysogenum* pellets on the internal concentration profiles. *Bioprocess Eng.* 10, 209-216, 1994.
32. Cruz, M. E. M.; Martins, M. B.; Corvo, M. L.; Gaspar, M. M.; Oliveira, E. M. M.; Ferrara, M. A. Enzimas em medicamentos e diagnóstico. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado.*, pp. 307-331, 2008.
33. Das, M. K. L.; Prasad, J. S.; Ahmad, S. K. Endoglucanase production by paper-degrading mycoflora. *Letters in Applied Microbiology* 25, p.313–315, 1997.
34. Deng, A.; Wu, J.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Wen, T. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus sp.* B001. *Bioresour Technol* 101, 7100-7106, 2010.
35. Diamond, A. D.; Hsu, J. T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation, in: *advances in biochemical engineering biotechnology*, Managing Springer- Verlag Berling Heidelberg, v.47, p. 90-134, 1992.
36. Diamond, A. D.; Hsu, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. *Advances in biochemistry engineering*, v. 47, p. 89-135, 1992.
37. Dias, B. F. S. Cerrados: uma caracterização. In: *Alternativas de desenvolvimento dos Cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis*. p. 11-25, 1992.
38. Dorge, T.; Carstensen, J. M.; Frisvad, J. C. Direct identification of pure *Penicillium*

- species using image analysis. *J. Microbiol. Meth.* 41, p. 121-133, 2000.
39. Durand-Poussereau, N.; Fevre, M. Characterization of a protease deficient strain of *Penicillium roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: potential use for protein production. *J Biotechnol*, v. 51, n. 1, p. 97-105, 1996.
40. Eggins, H. O. W.; Oxley, T. A. Biodeterioration and biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 48, p. 12, 2001.
41. Eiteman, M. A. Temperature-dependent phase inversion and its effect on partitioning in the poly(ethylene glycol) ammonium sulphate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography, A*, v. 668, p. 13-19, 1994.
42. Farag, A. M., Hassan, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*, *Enzyme Microb. Technol.* 34, p. 85–93, 2004.
43. Felix, C. R.; Noronha, E. F.; De Marco, J. L. Proteases: características e aplicações industriais. In: Summa, L. (Ed.), *Enzimas como agentes biotecnológicos*, pp. 327-347, 2004.
44. Ferreira, J. F. Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2007.
45. Ferreira, J. F.; Sbruzzi, D.; Barros, K. V. G., Ehrhardt, D. D., Tambourgi, E. B. Purification of Bromelain Enzyme from Curauá (*Ananas Erectifolius LB Smith*) White Variety, by Aqueous Two-Phase System PEG 4000/Potassium Phosphate, *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 8, p. 395-399, 2014.
46. Forciniti, D.; Kula, M.-R.; and Hall, C. K. Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 61, 243–262, 1991a.
47. Forciniti, D.; Hall, C. K.; Kula, M. R. Protein partition at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, p. 986-994, 1991b.
48. Forzza, R. C.; Leitman, P. M.; Costa, A.; Carvalho Jr., A. A.; Peixoto, A. L., Walter, B. M. T., Bicudo, C., Zappi, D, Costa, D. P., *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*, Rio de Janeiro, 2010.

49. Freiman, L. O. Os avanços do uso da bromelina na área de alimentação e saúde. *Revista Alimento e Nutrição*, São Paulo, v.12, p.215-226, 2001.
50. Geok, L. Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Biochemical Engineering Journal* 13, 73-77, 2003.
51. Gibbs, P. A.; Seviour, R. J.; Schmid, F. *Crit. Rev. Biotechnol.* 20, 17, 2000.
52. Gombert, A. K. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochem*, v. 35, p. 85-90, 1999.
53. Gomma, M. A.; Mostafa, M. M.; Abouzied, M. M.; Habashy, M. E. L. Production of semi-alkaline proteases by *Aspergillus sp.* *Egypt. J. Fd. Sci.*, 16, p. 9-26, 1989.
54. González, V. M.; Cuenca, A. A.; Reyes, M. A. A.; Jurado, A. T.; Becerra, A. E. G.; Flores, Y. M. Biochemical study of the extracellular aspartyl protease Eap1 from the phytopathogen fungus *Sporisorium reilianum*. *Protein Expression and Purification* 92, p. 214–222, 2013.
55. Grazziotin, A.; Pimental, F. A.; Jong, E. V.; Brandelli, A. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase, *Anim. Feed Sci. Technol.* 126, p. 135–144, 2006.
56. Green, F. *The Sigma–Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*. Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wisconsin, 1991.
57. Guoqiang, D. Kaul, R.; Mattiasson, B. Purification of *Lactobacillus bulgaricus* D-lactate dehydrogenase by precipitation with an anionic polymer. *Bioseparation*, v.3, 333-341, 1993.
58. Gupta, R.; Beg, Q. K.; Lorenz, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.
59. Gupta, R.; Beg, Q. K.; Khan, S.; Chauhan, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60:381–395, 2002.
60. Hamman, S. Bioremediation capabilities of white rot fungi. *Review Article Spring*, p. 12, 2004.
61. Haq, I.; Mukhtar, H.; Butt, Z.; Riaz, N. Protease biosynthesis by mutant strain of *Penicillium griseoroseum* and cheese formation. *Pak. J. biol. Sci.*, 7, p. 1473-1476, 2004.

62. Hawksworth, D. L. Ainsworth and Bisby's dictionary of fungi. 8<sup>a</sup> ed. Cambridge: CAB International University Press. 616 p. 1995.
63. Hawksworth, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105, 10, 2001.
64. Heneri, P.; Chamtal, B.; Odile, T.; Aimee, P. Semi alkaline proteolytic enzyme by *Aspergillus niger* by using various protein substrates. *J. Ferment. Technol.*, 66, p. 380-382, 1988.
65. Hesham, A. E. Filamentous fungal cultures – process, characteristics, products, and applications. In: Yang, S. T. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*. Elsevier, p. 225 – 261, 2007.
66. Hogan, D. J.; Carmo, R. L.; Cunha, J. M. P.; Baeninger, R. Migração e ambiente no Centro-Oeste. Campinas, NEPO/UNICAMP: PRONEX, 324p, 2002.
67. Houbraken, J.; Vries, R. P.; Samson, R. A. *Adv Appl Microbiol.* 86, p. 199-249, 2014.
68. Houmard, J.; Raymond, M. N. Further characterization of the *Penicillium roqueforti* acid protease. *Biochimie*, v. 61, n. 8, p. 979-82, 1979.
69. Hsiao, N. W.; Chen, Y.; Kuan, Y. C.; Lee, Y. C.; Lee, S. K.; Chan, H. H.; Kao, C. H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. *Electronic J Biotechnol*, v. 17, p. 89-94, 2014.
70. Hsu, L. N.; Delbaere, L. T. J.; James, M. N. G.; Hofmann, T. Penicillopepsin from *Penicillium janthinellum*: crystal structure at 2.8Å and sequence homology with porcine pepsin. *Nature* 266, p.140-145, 1977.
71. Ikasari, L.; Mitchell, D. A. Protease production by *Rhizopus oligosporous* in solid-state fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, p. 320-324, 1994.
72. Janzen, D. H. Tropical dry forest: the most endangered major tropical ecosystem. In: *Biodiversity*. National Academy Press. P. 130-137, 1988.
73. Johansson, G. Partitioning procedures and techniques: cells, organelles and, membranes. *Methods in Enzymology*, v.228, p. 42-63, 1994.
74. Johansson, H. O. Sistema aquoso bifásico constituído por polietilenoglicol (PEG) e ácido poliacrílico (PAA): estudo do comportamento de fases e aplicação do sistema na separação de biomoléculas. Projecto de pesquisa submetido à FAPESP pleitando uma bolsa de pós-doutorando. Universidade de São Paulo, Brasil. 2006.

75. Johansson, H. O.; Ishii, M.; Minaguti, M.; Feitosa, E.; Penna, T. C. V.; Pessoa Jr, A. Separation and partitioning of Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli* homogenate in poly(ethylene glycol)/sodium-poly (acrylate) aqueous two-phase systems. *Separation Purification Technology*, 62, p. 166-174, 2008.
76. Johansson, H. O.; Magaldi, F. M.; Feitosa, E.; Pessoa Jr, A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems, *J Chromatogr A*, 1178, 145-153, 2008.
77. Johansson, H. O.; Feitosa, E.; Pessoa Jr, A. Phase Diagrams of the Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol)/Sodium Polyacrylate/Salts, *Polymers*, 3, p. 587-601, 2011.
78. Junghanns, C.; Moeder, M.; Krauss, G.; Martin, C.; Schlosser, D. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151, p. 45–57, 2005.
79. Kanagawa, A. L.; Neves, M. A. *Biologia e Sistemática de Fungos, Algas e Briófitas. Ciências Biológicas - Cadernos Cb Virtual* 2, p. 257- 306, 2011.
80. Kavanagh, K. *Fungi – biology and applications*. John Wiley & Sons, Ltd. 2<sup>nd</sup> edition, 2005.
81. Kim, J. D. Keratinolytic activity of five *Aspergillus* species isolated from poultry farming soil in Korea, *Mycobiology* 31, p. 157–161, 2003.
82. Klink, C. A.; Machado, R. B. *A conservação do Cerrado brasileiro*. Belo Horizonte, Megadiversidade, v. 1, n. 1, p. 148-155, 2005.
83. Kranthi, V. S.; Rao, D. M.; Jaganmohan, P. Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *Int J Microbiol Res*, v. 3, n. 1, p. 12-15, 2012.
84. Kula, M. R.; Kroner, K. H.; Hustedt, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In *Advances in Biochemical Engineering*, Vol 24, A. Fiechter (ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 73-118, 1982.
85. Kunamneni, A.; Plou, F. J.; Ballesteros, A.; Alcade, M. Laccases and their applications: a patent review, *Recent Pat. Biotechnol.* 2, p.10–24, 2008.
86. Kunitz, M. Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor : Ii. General Properties. *J Gen Physiol* 30, 291-310, 1947.
87. Larsen, M. D.; Kristiansen, K. R.; Hansen, T. K. Characterization of the proteolytic

- activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. Int J Food Microbiol, v. 43, n. 3, p. 215-21, 1998.
88. Ledru, M. P. Late quaternary history and evolution of the Cerrado. In: Oliveira, P. S., Marquis, R. J. (Ed.) The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna. New York: Columbia University Press, p. 33- 50, 2002.
89. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. Princípios de Bioquímica. 4ª edição. São Paulo-SP, Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2007.
90. Leitão, A. L. Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field. Int. J. Environ. Res. Public Health, 6, p. 1393-1417, 2009.
91. Lettera, V.; Vecchio, C. D.; Piscitelli, A.; Sannia, G. Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. Comptes Rendus Biologies, 334, p. 781–788, 2011.
92. Li, N; Zong, M. H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. J Molecular Catalysis B: Enzymatic, 66, p. 43–54, 2010.
93. Lima, C. A. A.; Lima E. D. P. A.; Gerald L. T. S. Obtenção e caracterização da enzima  $\beta$ -galactosidase de origem fungica. Revista agropecuária técnica. 3(2):73-80, 2001.
94. Lopes, A. M. Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Brasil. 2006.
95. Maciel, M. H. C.; Ottoni, C. A.; Herculano, P. N.; Porto, T. S.; Porto, A. L. F.; Santos, C.; Lima, N.; Moreira, K. A.; Souza-Motta C. Purification of polygalacturonases produced by *Aspergillus niger* using an aqueous two-phase system. Fluid Phase Equilibria 2014; 371: 125–130.
96. Malathi, S.; Chakraborty, R. Production of alkaline proteases by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation condition for use as a depilation agent. Appl. Environ. Microbiol., 57, p. 712-716, 1991.
97. Manivannan, S.; Kathiresan, K. Alkaline protease production by *Penicillium fellutanum* isolated from Mangrove Sediment. International Journal of Biological Chemistry, v. 2, p. 98-103, 2007.

98. Mazzola, P. G.; Lopes, A. M.; Hasmann, F. A.; Jozala, A. F.; Penna, T. C.; Magalhaes, P. O.; Rangel-Yagui, C. O.; Pessoa Jr. A. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 143–157, 2008.
99. Mendonça, R.; Felfili, J. M.; Walter, B. M. T.; Júnior, M. C. S.; Rezende, A. V.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E. N. Flora vascular do Cerrado. p. 287-556. In: Sano, S. & S. Almeida, (eds.) *Cerrado: ambiente e flora*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, 1998.
100. Minami, N. M. Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação da Amiloglicosidase. Dissertação de Mestrado, USP - São Paulo, p. 190, 1997.
101. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*, p. 290-291, 2005.
102. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). *Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite – Monitoramento do bioma Cerrado*, 2011.
103. Minter, D. W.; Silva, M. Website “Fungos do Brasil” (Fungi from Brazil) [www.cybertruffle.org.uk/brazfung](http://www.cybertruffle.org.uk/brazfung), acessado em 03/28/2013.
104. Mittermeyer, R. A.; Myers, N.; Mittermeyer, C. G. Hotspots Earth’s biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. New York. CEMEX, Conservation International. 430p, 1999.
105. Mohammad, N.; Alam, M. Z.; Kabbashi, N. A.; Ahsan, A. Effective composting of oil palm industrial waste by filamentous fungi: A review. *Resources, Conservation and Recycling* 58 p. 69–78, 2012.
106. Montville, T. J. Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. *Applied and Environmental Microbiology* 45, p.200–204, 1983.
107. Mukhtar, H.; Haq, I. U. Production of acid protease by *Aspergillus niger* using solid state fermentation, *Pakistan J. Zool.*, vol. 41, p. 253-260, 2009.
108. Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *London, Nature*, v. 403, p.853-858, 2000.
109. Narahara, H.; Koyaa, Y.; Yoshida, T.; Pichangkura, S.; Ueda, R.; Taguchi, H. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment.*

- Technol., 60. p. 311-319, 1982.
110. Nevalainen, K. M.; Valentino, S. J. T. Enzyme production in industrial fungi-molecular genetic strategies for integrated strain improvement. *Applied Mycology & Biotechnology*, V. 3, p. 241-257, 2003.
111. Nimer, E.; Brandão, A. M. P. M. Balanço hídrico e clima da região dos Cerrados. Rio de Janeiro: IBGE, 1989.
112. O'Brien, H. E.; Parrent, J. L.; Jackson, J. A.; Moncalvo, J. M.; Vilgalys, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, p. 5544–5550, 2005.
113. Padilha, G. S. Caracterização, purificação e encapsulamento de lípase de *Burkholderia cepacia*. Tese de doutorado Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2010.
114. Passarini, M. R. Z.; Rodrigues, M. V. M.; Silva, M.; Sette, L. D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* 62, p. 364–370, 2011.
115. Peberdy, J. F. Protein secretion in filamentous fungi-trying to understand a highly productive black box. *Tibtech* february, 12, p. 50-57, 1994.
116. Peng, R. H.; Xiong, A. S.; Xue, Y.; Fu, X. Y.; Gao, F.; Zhao, W.; Tian, Y. S.; Yao, Q. H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 32, p. 927–955, 2008.
117. Perdih, A.; Cimerman, A.; Friedrich, J. Fungal bioconversion of fruit distillery wastes. *Enzyme and Microbial Technology*; 13, p. 848–52, 1991.
118. Pereira, C.I.; Crespo, M.T.; Romão, M. V. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int J Food Microbiol* 68, 211-216, 2001.
119. Pereira, M. Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por *Kluyvermyces marxianus*, utilizando sistemas de duas fases aquosas. Dissertação de Doutorado. Universidade do Minho, Portugal, 2005.
120. Pereira, J. F. B. Extração líquido - líquido do ácido clavulânico em sistemas poliméricos de duas fases aquosas (SPDFA) utilizando polietilenoglicol (PEG) e ácido poliacrílico (APA). Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2008.

121. Pereira, J. F. B.; Santos, V. C.; Johansson, H. O.; Teixeira, J. A. C.; Pessoa Jr, A. A stable liquid–liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 98(0): p. 441-450, 2012.
122. Pessoa Jr., A.; Kilikian, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*, Barueri: Ed. Manole, 2005.
123. Porto, T. Extração da Pró-toxina épsilon e de uma Protease a partir de *Clostridium perfringens* em Sistemas de Duas Fases Aquosas utilizando PEG/Citrato. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Brasil. 2006.
124. Posch, A. E.; Herwig, C.; Spadiut, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, January, Vol. 31, No. 1, p. 37- 44, 2013.
125. Pourrat, H.; Regeat, F.; Lamaison, J. L.; Pourrat, A. Proteases production by *A. flavus*. *Ann. Pharm. France.*, 37, p. 441, 1979.
126. Rabelo, A. P. B.; Tambourgi, E. B.; Pessoa Jr A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers *Journal of Chromatography B*, 2004; 807: 61–68.
127. Racine, L. M. *Enzimas em formulações tópicas: bromelina e papaína*, 2004.
128. Rajni H. K. *Aqueous Two-Phase Systems Methods and Protocols*, Methods in biotechnology, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 1999.
129. Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 597-635, 1998.
130. Raper, K.B.; Thom, C. *Manual of the Penicillia*; Williams and Wilkins: Baltimore, USA, 1949.
131. Ratter, J. A.; Ribeiro, J. F. Biodiversity of the flora of the Cerrado. In R.C. Pereira & L.C.B. Nasser (Eds.) VIII Simpósio sobre o Cerrado. I International Symposium on Tropical Savannas. pp. 3 – 5, 1996.
132. Rawlings, N. D.; Morton, F. R.; Barrett, A. J. An introduction to peptidases and the merops database. In: Spriner (Ed.), *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications.*, pp. 161-179, 2007.
133. Rodarte, M. P. et al. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica L.*). *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 33, n. 3, p. 457-

464, 2011.

134. Rojas, J. A.; Cruz, C.; Mika, J. F.; Villalba, L. S.; García, M. C. C.; Restrepo, S. Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, p. 169–175, 2009.
135. Sanatan, P. T.; Lomate, P. R.; Giri, A. P.; Hivrane, V. K. Characterization of a chemostable serine alkaline protease from *Periplaneta americana*. *BMC Biochemistry*, 14:1-32, 2013.
136. Sánchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*; 27 p.185–94, 2009.
137. Sano, E. E.; Rosa, R.; Brito, J. L. S.; Ferreira, L. G. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 1, p.153-156, 2008.
138. Santana, J. C. Caracterização e recuperação das enzimas  $\alpha$  E  $\beta$  – amilases por sistema de adsorção em leito expandido. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2006.
139. Santos, R. M. D. B.; Firmino, A. A. P.; Sa, C. M.; Felix, C. R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus Fresenius*, *Curr. Microbiol.* 33, p.364–370, 1996.
140. Santos, S. A. Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro *Ananas comosus (L) Merr. CV. Pérola* armazenado em condições com e sem refrigeração. Dissertação de Mestrado pela Ciências de Alimentos. Lavras: ESAL, p. 47, 1995.
141. Santos, V. L.; Linardi, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents—identification and degradation potential. *Process Biochemistry* 39, p. 1001–1006, 2004.
142. Saran, S.; Isar, J.; Saxena, R. K. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *J Biochem Biophys Methods* 70, 697-699, 2007.
143. Saravanan, J. A.; Reena, J. R.; Rao, T.; Murugesan, B. U. Nair, Phase Equilibrium Compositions, Densities, and Viscosities of Aqueous Two-Phase Poly(ethyleneglycol)+Poly(acrylic acid) System at Varius Temperatures. *J. Chem. Eng.Data* 51 (2006), 1246-1249.
144. Satyanarayana, T.; Rao, J. L.; Ezhilvannan, M.  $\alpha$ -Amylases. In: Pandey, A., Webb, C.,

- Socol, C.R., Larroche, C. (Eds.), Enzyme technology. Springer, p. 189, 2006.
145. Sawyer, D. População, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no Cerrado. In: Hogan, D. J., Carmo, R. L., Cunha, J. M. P., Baeninger, R. (org.). Migração e ambiente no Centro-Oeste. Campinas, NEPO/UNICAMP: PRONEX, p.279-299, 2002.
146. Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active sites in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27, p. 157–162, 1967
147. Schmidt, A. S.; Venton, A. M.; Asenjo, J.A. Partitioning and purification of  $\alpha$ -amylase in aqueous two-phase. *Enzyme Microbiology Technology*. v. 16, p. 131-142, 1994.
148. Schmidt, A. S.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 50, p. 617-626, 1996.
149. Sebastião, M. J.; Cabral, M. S.; Aires-barros, R. Partitioning of recombinant *Fusarium solani pisi* cutinase in poly(ethylene) glycol aqueous salt solution two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 139-144, 1994.
150. Sette, L. D.; Oliveira, V. M.; Rodrigues, M. F. A. Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. *Microbiology Australia* 29, p. 18–20, 2008.
151. Sharma, R.; Soni, S. K.; Vohra, R. M.; Gupta, L. K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 1075-1084, 2002.
152. Shivanand, P.; Jayaraman, G. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry* 44, 1088–1094, 2009.
153. Silva L. H. M.; Silva M. C. H.; Aquino R. A. N.; Francisco K. R.; Cardoso M. C. V.; Minin L. A. Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as a driving force for partitioning of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$  anion in aqueous two-phase systems formed by polyethylene oxide and sulfate salts. *J Phy Chem B*. 110:23540-6, 2006.
154. Silva, L. H. M.; Lou. W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações parpartição/purificação de proteínas. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.
155. Silva, C. S.; Boverotti E.; Rodrigues M. I.; Hokka C. O.; Barboza M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from

- fermentation broth by aqueous two-phase systems, *Bioprocess Biosyst Eng* 29:325–632, 2009.
156. Leger, R. J.; Joshi, L.; Roberts, D. W. Adaptation of proteases and carbohydrates of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* 143, p. 1983–1992, 1997.
157. Schmit, J. P.; Mueller, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers. Conserv.* 16, 12, 2007.
158. Steffen, K.T.; Schubert, S.; Tuomela, M.; Hatakka, A.; Hofrichter, M. Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation* 18, p. 359–369, 2007.
159. Subramanian, I.; Swan, D. A.; Liu, M.; Davies, D. R.; Jenkins, J. A.; Tickle, I. J.; Blundell, T. L. Homology among acid proteases: comparison of crystal structures at 3Å resolution of acid proteases from *Rhizopus chinesis* and *Endothia parasitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, p.556-559, 1977.
160. Tavares, A. C. D.; Fonseca, J.S.; Fonseca, T. R. B.; Barroncas, J. F.; Souza, R. A. T.; Silva, T. A.; Teixeira, M. F. S. Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. *BBR – Biochem Biotechnol Rep*, 1:1-6, 2012.
161. Tjerneld, F. Aqueous Two-Phase Partitioning on an Industrial Scale, in *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, ed. Harris J.M; Plenum Press, New York, 1992.
162. Ten, L. N.; Im, W. T.; Kim, M. K.; Lee, S. T. A plate assay for simultaneous screening of polysaccharide- and protein-degrading micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 40, p. 92–98, 2005.
163. Tunga, R.; Shrivastava, B.; Banerjee, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*, *Process Biochem.* 38, p. 1553–1558, 2003.
164. Valsechi, O. A. Apostila de Microbiologia de Alimentos - Cap.4 – Produção de Antibióticos. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrária, Araras – São Paulo, <http://www.cca.ufscar.br/docentes/vico/Microbiologia>, Janeiro/2008.
165. Van Zeijl, C.; Punt, P.; Emalfarb, M.; Burlingame, R.; Sinitsyn, A.; Parriche, M.; Bousson, J. C.; Van den Hondel CAM, J. J. *Chrysosporium lucknowense*, a new fungal host

- for protein production. Fungal Genetics News letter, 48 Suppl, p. 89, 2001.
166. Vermelho, A. B. et al. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 91, n. 6, p. 755-60, 1996.
167. Vishwanatha, K. S.; Appu Rao, A. G.; Singh, S. A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Appl Microbiol Biotechnol, v. 85, n. 6, p. 1849-59, 2010.
168. Walter, H. E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Chemie, V. (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, pp. 270–277, 1984.
169. Yamaguchi, M. et al. Specificity and molecular properties of penicillolysin, a metalloproteinase from *Penicillium citrinum*. Phytochemistry, v. 33, n. 6, p. 1317-21, 1993.
170. Yamamoto, N. et al. A heat-labile serine proteinase from *Penicillium citrinum*. Phytochem, v. 32, n. 6, p. 1393-7, 1993.
171. Yang, F. C.; Hsing, I. L. Production of acid protease using thin still age from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. Enz. Microbial. Technol., 23, p. 397-402, 1998.
172. Yang, W. Y.; Lin, C. D.; Chu, I.; Lee, C. J. Extration of cephalosporin c from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin c by aqueous two-phase partition. Biotechnology and Bioengineering, v. 43, p. 439-445, 1994.
173. Zafred, R. R. T. Cerrado e saúde: uma mistura brasileira. Aprendendo Ciência. Unesp. V. 1, Nº 1 p. 10-12, 2011.
174. Zanin, G. M.; Moraes, F. F. Enzimas como agentes biotecnológicos; Said, S., Pietro, R. C. L. R., Eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, cap. 4, p. 35-82, 2004.