



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM
LEITO EXPANDIDO INTEGRADO À ULTRAFILTRAÇÃO E SUA APLICAÇÃO NA
REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE DEOXINIVALENOL

Gabrielle Victoria Gautério

SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

JAQUELINE GARDA BUFFON

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM
LEITO EXPANDIDO INTEGRADO À ULTRAFILTRAÇÃO E SUA APLICAÇÃO NA
REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE DEOXINIVALENOL

Gabrielle Victoria Gautério

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
mestre em Engenharia e Ciência de
Alimentos

SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

JAQUELINE GARDA BUFFON

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2016

Ficha catalográfica

H293c Gautério, Gabrielle Victoria.

Purificação de peroxidase por cromatografia de troca iônica em leite expandido integrado à ultrafiltração e sua aplicação na redução dos níveis de deoxinivalenol / Gabrielle Victoria Gautério. – 2016.

140 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.

Orientadora: Dr^a. Susana Juliano Kalil.

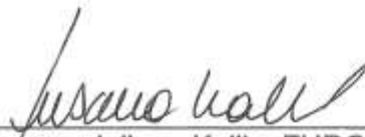
Coorientadora: Dr^a. Jaqueline Garda Buffon

1. Biorremediação 2. Diafiltração 3. Farelo de arroz 4. Micotoxinas
5. Oxidorredutases I. Kalil, Susana Juliano II. Buffon, Jaqueline Garda
III. Título.

CDU 543.544:664.782

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Gabrielle Victoria Gautério e aprovada em 18 de março de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG



Profa. Dra. Caroline Costa Moraes – UNIPAMPA



Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong – FURG



Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon – FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG

À minha mãe Maristela,

Por todo o amor e apoio incondicional a mim concedido,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida com muita saúde e por me proporcionar a alegria de poder realizar meus sonhos.

À minha mãe, minha maior incentivadora, pelo amor e apoio incondicionais a mim concedidos. Obrigada pelo cuidado diário comigo, pelas palavras de conforto nos momentos de insegurança, e por nunca medir esforços na realização dos meus sonhos. Dedico a você não apenas este trabalho, mas tudo o que sou hoje. Jamais chegaria aqui sem teu apoio, te amo!

À minha orientadora Susana, por todas as oportunidades e por me receber em seu laboratório. Obrigada pela orientação (não só no mestrado, mas também na graduação), pela atenção constante, pela amizade, pelos conselhos e pela confiança em mim depositada. Você é o exemplo de profissional que um dia quero me tornar.

À professora Jaqueline, minha coorientadora, pelos ensinamentos e por estar sempre presente durante a realização deste trabalho. Obrigada por toda atenção a mim dedicada.

À professora Caroline Moraes, pela imensa ajuda a mim concedida no leito expandido.

Ao meu pai Airton, às minhas avós Aracy e Teresinha, às minhas madrinhas Marisa e Márcia e ao meu padrinho Francisco, pelo carinho e por entenderem minhas ausências (que não foram poucas!). Às minhas primas - Cristine, Vanessa, Beatrice e Evelise - agradeço pela amizade e pelos bons momentos em família, vocês são demais!

Ao meu namorado e meu melhor amigo Jones, por tornar tudo mais leve, incrível e divertido. Obrigada por respeitar minhas ausências em certos momentos, pela paciência, pelo incentivo e por me alegrar nos meus “dias de cão”. Agradeço, principalmente, por todo o carinho e por me tornar uma pessoa melhor, te amo!

Aos meus sogros Inês e Walter, minha segunda família, obrigada por toda a preocupação que tiveram comigo e por sempre me receberem tão bem em sua casa após um dia cheio de experimentos. À Tania, ou “tia Susi”, pelo imenso carinho que demonstra em cada encontro nosso, pelos passeios divertidos e por sempre me contagiar com sua alegria!

Aos meus amigos Herbert, Letícia, Daniel, Carolina por proporcionarem os momentos de descontração nos finais de semana e por tornarem minha vida mais simples e alegre.

Às minhas companheiras do curso de inglês, Cíntia e Mônica, por alegrarem meus finais de tarde e por sempre estarem dispostas a me escutar quando o assunto era o mestrado.

Agradeço à minha amiga Sibebe pela grande amizade, pelo apoio, pelos conselhos e pelo incentivo diário ao longo do mestrado. Obrigada por ser tão solidária comigo, afinal “a graduação acaba, o mestrado acaba, mas a amizade continua”!

À minha querida amiga Luisa, por todos os ensinamentos durante a iniciação científica, pelos conselhos técnicos, por me esperar para o almoço mesmo sabendo que a eluição ia demorar, por ouvir tantas vezes “errei a diluição” e por estar disposta a me ajudar. Poucas são as pessoas como você no mundo, e eu espero que nossa amizade seja longa e duradoura!

Às minhas companheiras de sempre, Joana, Thais Borba e Daiane, obrigada por me socorrerem por diversas vezes no leito expandido, na ultrafiltração ou na eletroforese, pelas dicas técnicas, pelas risadas e pelo bom astral de vocês. Três amigas que nasceram assim, sem querer, e que hoje são essenciais na minha vida.

À técnica do laboratório Ana Sanzo, obrigada pela ajuda no estágio de docência, pelo imenso carinho e pelo “colo” nos momentos difíceis. À Elida, pelo auxílio na seleção do doutorado e pela boa companhia nas longas tardes no laboratório. À Jéssica e Fernanda, agradeço pelas conversas de assuntos variados que tanto tornaram meus dias mais divertidos. Aos que já deixaram ou ainda permanecem no laboratório - Ailton, Ana Rafaela, Deborah, Felipe, Juliana, Patrícia e Samuel - agradeço pela companhia e pelas animadas confraternizações.

Às minhas bolsistas de iniciação científica, Laís e Danielle, por auxiliaram muito no desenvolvimento desta dissertação. Obrigada pelo carinho, pelas palavras de incentivo e pelo comprometimento com o trabalho.

À Ana Feltrin, não tenho palavras suficientes para te agradecer! Obrigada por toda ajuda nos experimentos finais deste trabalho, pela paciência, pela solidariedade e por permitir que eu absorvesse um pouco da tua sabedoria. À técnica Sabine e às doutorandas Juliana Latorres e Michele Coelho, por me auxiliarem na eletroforese e na liofilização dos extratos enzimáticos.

Aos meus colegas de mestrado, agradeço pelos momentos de descontração e por tornar os dias cansativos um pouco mais leves! Às meninas de Pelotas - Naralice, Fatiele, Tais Rosa e Thais Borba - agradeço pelo companheirismo e pelos bate-papos durante as viagens.

Aos alunos da ATEA 2016, por me proporcionarem uma experiência incrível no estágio de docência. Foi com vocês que descobri o que realmente quero para minha vida profissional.

Aos laboratórios de Tecnologia de Alimentos, Operações Unitárias e de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, e ao Núcleo de Oceanografia Geológica, por disponibilizarem equipamentos e materiais fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação pela colaboração e simpatia.

Aos professores que participaram da comissão examinadora deste trabalho, pela disposição a contribuir com a melhoria do mesmo. Fica aqui registrado o meu agradecimento, admiração e respeito.

À FURG por permitir um ensino público de qualidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Quem deseja aprender a voar deve primeiro aprender a caminhar, a correr, a escalar e a dançar. Não se aprende a voar voando.

Friedrich Nietzsche

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Espécies retidas nos PSM que utilizam a diferença de pressão como força motriz.	40
Tabela 2 - Características dos PSM em termos de tipo de membrana, força motriz e mecanismo de transporte.	41
Tabela 3 - Purificação de peroxidases de origem vegetal por associação de técnicas.	46

CAPÍTULO III - ARTIGO 1

Tabela 1 - Valores de capacidade de adsorção de peroxidase no equilíbrio (q^*).	64
Tabela 2 - Valores de $Q_{10\%}$ obtidos a partir das curvas de ruptura nos graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0.	67
Tabela 3 - Valores de FP e REC obtidos nos ensaios de purificação.	69

CAPÍTULO III - ARTIGO 2

Tabela 1 - Integração da CTI em leite expandido à UF na purificação de peroxidase: uso de CaCl_2 ao tampão de DF.	91
Tabela 2 - Fatores de retenção e concentração (atividade enzimática, proteínas e volume) e percentual de rejeição para as membranas de celulose regenerada de 10 kDa e 30 kDa.	97
Tabela 3 - Eficiência do processo e fatores de retenção da atividade enzimática e proteína na etapa de DF acrescida de CaCl_2 em diferentes concentrações.	103
Tabela 4 - Eficiência do processo de purificação de peroxidase por CTI em leite expandido integrado à UF.	104
Tabela 5 - Percentuais de redução de DON pela ação de peroxidase bruta e purificada por diferentes estratégias.	108
Tabela 6 - Percentuais de adsorção de DON pela ação de peroxidase purificada.	109

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Comparação entre o movimento das partículas (a) em leito fluidizado e (b) em leito expandido. Na fluidização estável de um leito expandido, apenas pequenos movimentos circulares das partículas adsorventes podem ser vistas.36
- Figura 2 - Esquema dos passos na adsorção em leito expandido, onde as colunas mostram os diferentes estágios de operação do sistema e as setas indicam a direção do escoamento.37
- Figura 3 - Curvas de ruptura obtidas para diferentes alturas de leito, utilizando solução de albumina de soro bovino com concentração inicial de 3,0 mg/mL.39
- Figura 4 - Modos de operação da UF (a) escoamento convencional (b) escoamento tangencial.....43
- Figura 5 - Operação descontínua da DF (a) diluição sequencial (b) redução de volume.....44
- Figura 6 - Estrutura química dos tricotecenos (exemplos dos grupos A-D).48

CAPÍTULO III - ARTIGO 1

- Figura 1 - Curvas de ruptura para adsorção de peroxidase em resina de troca iônica nos graus de expansão de 2,0, 2,5 e 3,0, considerando o volume morto do sistema. Altura inicial do leito de 10 cm.67
- Figura 2 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição gradiente linear salino 0-1mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 2).69
- Figura 3 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,1 mol/L de NaCl e gradiente linear salino 0,1-1mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 3).70
- Figura 4 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino 0,15-1mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 4).71
- Figura 5 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino 0,15-1mol/L de NaCl acrescido de 0,001 mol/L de CaCl₂ em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 7).72
- Figura 6 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de CaCl₂ e gradiente linear salino 0,15-1mol/L de CaCl₂ em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 6).73

Figura 7 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de KCl e gradiente linear salino 0,15-1mol/L de KCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 7).	74
--	----

CAPÍTULO III - ARTIGO 2

Figura 1 - Coluna cromatográfica utilizada na CTI em leite expandido.	87
Figura 2 - Módulo de UF utilizado na purificação e concentração da enzima peroxidase.	88
Figura 3 - Fator de purificação e recuperação de peroxidase expressos como valores médios com desvio padrão para as membranas de celulose regenerada de 10 kDa e 30 kDa.	97
Figura 4 - Fluxo médio de permeado durante o processo de UF usando membranas de celulose regenerada de 10 kDa e 30 kDa.	98
Figura 5 - Acompanhamento da remoção de NaCl em cada ciclo de DF através da condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$).	100
Figura 6 - Fluxo de permeado e fatores de retenção da atividade enzimática e de proteína..	100
Figura 7 - Fatores de retenção de atividade enzimática e proteína durante a DF realizada em diferentes temperaturas.	101
Figura 8 - Fatores de retenção de atividade enzimática e proteína durante a DF acrescida de CaCl_2 0,001 mol/L em diferentes temperaturas.	102
Figura 9 - Eletroforese de peroxidase de farelo de arroz: (a) marcador molecular (b) extrato bruto (c) extrato ultrafiltrado (d) extrato purificado por CTI em leite expandido (e) extrato purificado por CTI em leite expandido integrado à UF.	105
Figura 10 - Curva de correlação entre o logaritmo da massa molecular e o fator de retenção no gel SDS-PAGE, para padrão molecular para peroxidase de farelo de arroz.	106
Figura 11 - Cromatograma de eluição do DON (a) antes e (b) após ação da enzima peroxidase purificada*.	108

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	19
RESUMO	21
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
CAPÍTULO II.....	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 Farelo de arroz.....	31
3.2 Peroxidase.....	32
3.3 Recuperação e purificação de proteínas	34
3.3.1 Cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido	35
3.3.2 Processos de separação por membranas	39
3.3.2.1 Ultrafiltração.....	41
3.3.2.2 Diafiltração	43
3.3.3 Purificação de peroxidases	44
4.5 Micotoxinas: conceitos e métodos de degradação.....	46
CAPÍTULO III	51
ARTIGO 1: Purificação de peroxidase por cromatografia de troca iônica em leito expandido: estudo do processo.....	53
Resumo	55
1 Introdução.....	57
2 Material e métodos	58
2.1 Obtenção do extrato clarificado de peroxidase.....	58
2.2 Purificação da peroxidase por cromatografia de troca iônica em leito expandido	59
2.2.1 Sistema de purificação.....	59
2.2.2 Efeito do pH e da solução tamponante na adsorção de peroxidase em resina de troca iônica	59
2.2.3 Determinação das curvas de ruptura em diferentes graus de expansão.....	60
2.2.4 Determinação dos parâmetros para purificação de peroxidase	61
2.3 Determinações analíticas	62
2.3.1 Atividade enzimática	62
2.3.2 Concentração de proteínas.....	62

2.4 Tratamento dos resultados	63
3 Resultados e discussão	63
3.1 Efeito do pH e da solução tamponante na adsorção de peroxidase	63
3.2 Curvas de ruptura em diferentes graus de expansão	66
3.3 Determinação dos parâmetros cromatográficos	68
4 Conclusão.....	75
5 Referências bibliográficas.....	75

ARTIGO 2: Purificação de peroxidase sua aplicação na redução dos níveis de deoxinivalenol em sistema modelo..... 81

Resumo.....	83
1 Introdução	85
2 Material e métodos.....	87
2.1 Obtenção do extrato clarificado de peroxidase	87
2.2 Purificação da peroxidase por cromatografia de troca iônica em leito expandido	87
2.3 Concentração e purificação de peroxidase por ultrafiltração.....	88
2.3.1 Sistema de ultrafiltração.....	88
2.3.2 Seleção da membrana.....	88
2.4 Integração da cromatografia de troca iônica em leito expandido à ultrafiltração	90
2.4.1 Determinação do número de ciclos de diafiltração	90
2.4.2 Influência da temperatura no processo de diafiltração.....	90
2.4.3 Influência da concentração de CaCl ₂ no processo de diafiltração	91
2.5 Eficiência do processo de purificação.....	91
2.6 Eletroforese	92
2.7 Aplicação de peroxidase na redução dos níveis de deoxinivalenol	93
2.7.1 Determinação da concentração de deoxinivalenol.....	93
2.7.2 Redução dos níveis do deoxinivalenol em sistema modelo	93
2.7.3 Avaliação do mecanismo de redução do deoxinivalenol em sistema modelo	94
2.8 Determinações analíticas.....	95
2.8.1 Atividade enzimática.....	95
2.8.2 Concentração de proteínas	95
2.9 Tratamento dos resultados	95
3 Resultados e discussão	96
3.1 Seleção da membrana de ultrafiltração	96
3.2 Integração dos processos de purificação	99
3.2.1 Número de ciclos de diafiltração	99
3.2.2 Influência da temperatura e da concentração de CaCl ₂ na diafiltração.....	101

3.3 Determinação da massa molecular da peroxidase purificada.....	105
3.4 Redução dos níveis de deoxinivalenol em sistema modelo pela ação de peroxidase bruta e purificada.....	106
4 Conclusão	110
5 Referências bibliográficas	110
CAPÍTULO IV	117
4 CONCLUSÃO GERAL	119
CAPÍTULO V	121
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

CAPÍTULO I
RESUMO, ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

RESUMO

A peroxidase (CE 1.11.1. X) catalisa a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogênio ou outros peróxidos orgânicos como moléculas aceptoras. Esta enzima pode ser obtida a partir de vegetais, tecidos e secreções de animais e micro-organismos. Obter esta enzima através de coprodutos da agroindústria possibilita a redução de custos de produção e sua aplicação industrial. O farelo de arroz, um coproduto resultante do beneficiamento do arroz, dispõe de diversas enzimas, as quais incluem as peroxidase, o que o torna uma fonte potencial para obtenção desta. Devido à sua natureza oxidativa, especificidade e atuação em condições moderadas, a peroxidase pode ser aplicada para fins de biorremediação, com destaque para a redução dos níveis de micotoxinas. Estudos na área sugerem que a purificação de peroxidase pode aumentar a sua capacidade de degradar certos substratos, o que torna interessante o estudo de técnicas de purificação possíveis de ampliação de escala, que resultem em maior pureza da enzima e com maior rendimento possível. Assim, este trabalho teve por objetivo purificar a enzima peroxidase de farelo de arroz utilizando cromatografia de troca iônica (CTI) em leito expandido integrado à ultrafiltração (UF), e aplicá-la na redução dos níveis de deoxinivalenol (DON). O trabalho foi dividido em dois artigos, onde o primeiro consistiu em avaliar os principais parâmetros das etapas de adsorção, lavagem e eluição para a purificação de peroxidase por CTI em leito expandido. O uso do tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5 e grau de expansão de 2,5 foram as condições definidas para a adsorção de peroxidase em trocador catiônico Streamline™ SP, apresentando capacidade de adsorção no equilíbrio (q^*) de 2,68 U/mL de resina e capacidade dinâmica de adsorção ($Q_{10\%}$) de 0,19 U/mL de resina. O uso do pH 5,5 na lavagem e a combinação da eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino de 0,15 a 1 mol/L de NaCl acrescido de CaCl_2 0,001 mol/L em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5, proporcionaram a purificação da peroxidase em 14,6 vezes com recuperação enzimática de 51,5%. No segundo artigo, foi avaliada a possibilidade de integrar a CTI em leito expandido à UF para purificação de peroxidase, bem como a aplicação da enzima na redução dos níveis de DON em sistema modelo. O uso de membrana de massa molar limite de 10 kDa, temperatura de 10°C, seis ciclos de diafiltração (DF) e adição de CaCl_2 0,004 mol/L à solução dialfiltrante resultou nos valores de fator de purificação e recuperação enzimática de 4,4 vezes e 79,4%, respectivamente. O processo global integrando duas técnicas resultou na purificação da peroxidase em 75,1 vezes e recuperação enzimática de 22,8%. O perfil eletroforético da peroxidase purificada revelou duas possíveis isoenzimas de massa molecular de 35,6 kDa e 65,4 kDa. A aplicação da peroxidase purificada por CTI em leito expandido integrado à UF resultou na redução em 81,7% nos níveis de DON, ainda que utilizando baixa atividade enzimática no meio reacional (0,01 U/mL).

Palavras-chaves: Biorremediação. Diafiltração. Farelo de arroz. Micotoxinas. Oxidorredutases.

ABSTRACT

Peroxidases (EC 1.11.1.X) are enzymes whose main function is to catalyze the oxidation of a wide range of organic substrates by either H_2O_2 or organic peroxides as terminal oxidants. They are widely found in plants, animal tissues and secretions, and microorganisms. Obtaining peroxidases from by-products of agro-industry enables production costs reduction and their industrial application. Rice bran, a by-product of the polishing of rice grain, is a potential source for obtaining peroxidases because it contains various enzymatic systems that use these enzymes. Due to the oxidative nature, substrate specificity and capacity to catalyze in mild conditions, peroxidases are useful for bioremediation applications, especially for reducing mycotoxins levels. Besides that, studies suggest that peroxidase purification can improve certain substrate degradation, which makes interesting to study purification techniques that result in a product with purity and yield as high as possible. Thus, the goal of this work was the purification of peroxidase from rice bran by ion exchange chromatography (IEC) in expanded bed mode integrated to ultrafiltration (UF), and enzyme application in deoxynivalenol (DON) levels reduction. In first article, the main parameters of adsorption, washing and elution steps for peroxidase purification by IEC in expanded bed mode were evaluated. The use of 0.025 mol/L sodium acetate buffer pH 4.5 and expansion degree of 2.5 proved the most suitable conditions for peroxidase adsorption in Streamline™ SP cation exchanger, showing adsorption capacity in equilibrium (q^*) of 2.68 U/mL resin and dynamic binding capacity ($Q_{10\%}$) of 0.18 U/mL resin. The highest process efficiency was observed using pH 5.5 in washing and elution steps, as well as the elution in step-wise mode with 0.15 mol/L NaCl coupled to linear gradient mode from 0.15 to 1 mol/L NaCl increased with 0.001 mol/L $CaCl_2$ in 0.025 mol/L sodium acetate buffer pH 5.5, which resulted in a purification factor of 14.6-fold with enzymatic recovery of 51.5%. In second article, the possibility of integrating IEC in expanded bed mode to UF for peroxidase purification was evaluated, as well as enzyme application in reducing DON levels in model system. The use of molecular mass cut-off membrane of 10 kDa, temperature of 10°C, six cycles of diafiltration (DF) and adding 0.004 mol/L $CaCl_2$ in DF solution promoted the enzyme purification in 4.4-fold and enzymatic recovery of 79.4%. The global purification process integrating two techniques resulted in the peroxidase purification in 75.1-fold with an enzymatic recovery of 22.8%. Electrophoretic profile of purified peroxidase showed two possible isoenzymes with molecular mass of 36.5 kDa and 65.4 kDa. Purified peroxidase application for IEC in expanded mode integrated to UF resulted in the reduction of 81.7% in DON levels, even using low enzyme activity in reaction system (0.01 U/mL).

Key words: Bioremediation. Diafiltration. Mycotoxins. Oxidoreductases. Rice bran.

1 INTRODUÇÃO

O arroz é um cereal que apresenta alta aplicabilidade e capacidade de ser cultivado nas mais diversas regiões. Razões vinculadas às características próprias do arroz impedem que ele possa ser consumido tal qual a natureza produz, sendo necessário submetê-lo ao processo de beneficiamento, tendo como produto principal o arroz polido (ELIAS; OLIVEIRA; VANIER, 2012). O farelo de arroz, um coproduto do beneficiamento do arroz, contém inúmeras enzimas, dentre as quais se destacam as peroxidases, o que o torna uma fonte potencial para a obtenção destas (LUH et al., 1991).

As peroxidases (CE 1.11.1.X) são enzimas que catalisam a oxidação de substratos orgânicos tendo o peróxido de hidrogênio ou outros peróxidos como moléculas aceptoras (MATHÉ et al., 2010; FAWAL et al., 2013). Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser obtidas de vegetais, tecidos e secreções de animais e micro-organismos (BALASUBRAMANIAN; BOOPATHY, 2013). A capacidade oxidativa destas enzimas permite que as mesmas sejam utilizadas em áreas como biomédica, clínica, biotecnológica, ambiental e industrial, substituindo às técnicas convencionais de oxidação (HAMID; REHMAN, 2009; SOMTÜRK; RAMAZAN; ÖZDEMİR, 2014).

As micotoxinas correspondem a metabólitos secundários produzidos por fungos em condição de estresse, normalmente após a fase de crescimento equilibrado (MELLO; MACDONALD, 1997). O deoxinivalenol (DON, vomitoxina) é uma micotoxina pertencente ao grupo dos tricotecenos produzida principalmente pelos fungos das espécies *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* (TÜRKER; GÜMÜS, 2009). A ocorrência frequente de DON em cereais norteia a busca por alternativas que visem à degradação ou redução dos níveis desta micotoxina, sendo os métodos físicos (ZHANG; WANG, 2014) e químicos (HE et al., 2010) os mais amplamente estudados e aplicados industrialmente. No entanto, o uso de métodos biológicos (micro-organismos e enzimas) na degradação de DON vem ganhado espaço devido à maior especificidade e atuação em condições moderadas. A peroxidase, por sua natureza oxidativa, pode ser aplicada na degradação ou redução dos níveis de DON (FELTRIN, 2013; GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011).

Diversos estudos envolvendo a purificação de peroxidases têm sido reportados na área científica (GALENDE et al., 2015; KRAINER et al., 2014; JAOAUDI et al., 2014; SONKAR et al., 2015). No entanto, o emprego de técnicas de purificação, em sua maioria, visa a posterior caracterização enzimática, onde a prioridade é obter a enzima altamente purificada sem se preocupar com o rendimento da mesma. Adicionalmente, a purificação da

peroxidase pode melhorar a sua estabilidade térmica (BOUCHERIT; ABOUSEOUD; ADOUR, 2013; NADAROGLU et al., 2013) e capacidade de degradação de alguns substratos (ZENG et al., 2013), o que torna interessante o estudo de estratégias que permitam obter esta enzima purificada. Técnicas como ultrafiltração (SRINIVAS; BARHATE; RAGHAVARAO, 2002) e cromatografia de troca iônica (GAUTÉRIO et al., 2015) se mostram promissoras na purificação e concentração de peroxidases por apresentarem diversas vantagens relacionadas à praticidade, alta resolução, baixo custo e possibilidade de ampliação de escala.

A cromatografia de troca iônica (CTI) é uma das técnicas mais utilizadas para separação de proteínas e biopolímeros relacionados (LEVISON, 2003). A CTI se baseia na competição entre os grupos constituintes de uma proteína e os contra íons de uma solução tampão pelos grupos carregados presentes em um trocador iônico (CUTLER, 2004; ROE, 2001). A CTI pode ser operada tanto em modo fixo ou expandido, onde esse último consiste no uso de adsorventes particulados com diferentes seletividades, os quais residem em coluna cromatográfica. A operação em modo expandido permite integrar a separação sólido-líquido, maior interação entre a matriz ligante e a molécula alvo e obtenção do produto purificado em grandes volumes (ANSPACH et al., 1999; TOLEDO et al., 2007).

A ultrafiltração (UF) consiste no transporte de soluções através de membranas semipermeáveis, poliméricas ou inorgânicas, sendo utilizada na separação de espécies em soluções aquosas pela massa molar, forma e/ou carga (CUTLER, 2004; SCHMIDELL et al., 2001). A técnica opera em pressões e temperaturas relativamente baixas e não envolve a mudança de fase ou aditivos químicos, o que minimiza a extensão da desnaturação, desativação e degradação de produtos biológicos (CHARCOSSET, 2006; ZEMAN; ZYDNEY, 1996). Adicionalmente, a UF pode ser operada no modo de diafiltração (DF), a qual proporciona melhor separação e maior pureza do composto de interesse (WANG; ZHANG; OUYANG, 2002).

Uma vez que a peroxidase pode ser aplicada na degradação ou redução dos níveis de micotoxinas, e que a purificação da enzima pode aumentar a sua capacidade de degradar certos substratos, é interessante que se estude diferentes estratégias de purificação possíveis de integração e ampliação para a escala industrial. A existência de técnicas de purificação que resultem em elevado rendimento de peroxidase, bem como grau de pureza suficiente para provocar a redução dos níveis DON, colabora com pesquisas voltadas à aplicação desta enzima na substituição ou complementação às técnicas tradicionais de degradação de micotoxinas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Purificar a enzima peroxidase de farelo de arroz utilizando a cromatografia de troca iônica em leito expandido integrado à ultrafiltração, e aplicá-la na redução dos níveis de deoxinivalenol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do pH e da solução tamponante na adsorção da peroxidase em resina de troca iônica;
- Estudar a etapa de adsorção da peroxidase em coluna de leito expandido através da obtenção das curvas de ruptura em diferentes graus de expansão;
- Aperfeiçoar a purificação de peroxidase por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido por meio de modificações nas etapas de lavagem e eluição;
- Determinar as condições mais favoráveis para a purificação da peroxidase por ultrafiltração;
- Integrar a ultrafiltração à cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido, visando tanto à purificação e concentração da peroxidase quanto à retirada do sal.
- Avaliar o potencial da peroxidase bruta e purificada frente à redução dos níveis de deoxinivalenol em sistema modelo.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FARELO DE ARROZ

O arroz pertence à família Poacea, subfamília Oryzaidea e gênero *Oryza*. Cerca de trinta espécies desse gênero são conhecidas, das quais as espécies *Oryza rufipogon* (arroz vermelho) e *Oryza sativa* (arroz comum) são as mais difundidas. Estima-se que 80% do grão de arroz compreende a cariopse, a qual é composta por endosperma (93%), embrião (4%), pericarpo e tegumento (3%), enquanto que os 20% restantes abrangem a casca do arroz, a qual é removida no processo de beneficiamento do grão (KOBELITZ, 2011).

Conforme o relatório do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), de 12 de janeiro de 2016, a produção mundial arroz deverá ser de 470,1 milhões de toneladas de arroz beneficiado para a safra de 2015/2016. O Brasil está entre os dez países que mais produzem arroz, com uma estimativa de 11,5 milhões toneladas para safra de 2015/2016, a partir da área de 2,1 milhões de hectares plantados. A região Sul é maior produtora de arroz, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul, o qual produziu 8,6 milhões de toneladas de arroz com casca na safra 2014/2015, representando 63,3% da produção nacional deste cereal (CONAB, 2016).

A maior proporção do arroz é consumida na forma de grãos inteiros, compreendendo três tipos de produtos: arroz beneficiado polido, arroz parboilizado e arroz integral. Razões vinculadas às características próprias deste grão impedem que ele possa ser consumido tal qual a natureza produz, sendo necessário submetê-lo ao processo de beneficiamento, cujo produto principal é o arroz polido. Neste processo, são removidas a película, germe e parte da cariopse amilácea da periferia do grão, as quais constituem o farelo integral; casca e grãos polidos quebrados (quirera) também resultam do polimento do arroz (ELIAS; OLIVEIRA; VANIER, 2012).

O farelo de arroz possui aspecto farináceo, fibroso e suave ao tato, representando cerca de 10% da massa total do grão (HOSENEY, 1991; PARRADO et al., 2006). Este coproduto provém da cobertura externa do grão de arroz logo abaixo da casca, a qual é removida do grão de arroz durante o seu processamento, durante a etapa de brunimento. As características físicas e químicas do farelo de arroz variam conforme a cultivar, processo de beneficiamento empregado, grau de polimento ao qual o grão foi submetido e presença de fragmentos da casca (AMISSAH et al., 2003; ELIAS; OLIVEIRA; VANIER, 2012; UNIDO, 1985).

Aplicações alimentares são atribuídas ao farelo de arroz, tais como cereais matinais, panificação, massas, *snacks*, bebidas isotônicas, chás gelados e alimentos livres de glúten (KAHLON, 2009). Em maior proporção, o farelo de arroz é utilizado em fertilizantes orgânicos e no enriquecimento de rações animais (SILVA; SANCHES; AMANTE, 2006). O farelo de arroz também é destinado para a produção de óleo refinado e demais subprodutos do processo de refino. Segundo Balachandran et al. (2008), para uma produção anual de 40 milhões de toneladas de farelo de arroz, a estimativa do potencial para a produção de óleo seria de 15 a 20%, embora a maior parte disso seja destinada à produção de rações para bovinos e aves.

Devido à rápida degradação lipídica pela ação de lipases presentes no farelo de arroz, a aplicação deste coproduto em alimentos se torna limitada, pois resulta em um produto com odor e/ou sabor a ranço. Apesar da estabilização (inativação térmica de enzimas) ser uma alternativa promissora na aplicação do farelo de arroz em produtos alimentícios, a maioria dos países produtores de arroz não dispõe de tecnologia ou infraestrutura para a realização desta operação unitária (BORRESEN; RYAN, 2014; FACCIN et al., 2009; KAHLON, 2009).

Na área científica, inúmeras pesquisas estão voltadas à obtenção de biomoléculas, em especial as enzimas, a partir de resíduos e subprodutos da indústria alimentícia. Materiais de descarte têm sido utilizados tanto como substrato para a produção de enzimas a partir micro-organismos, quanto como substrato para a extração direta destas. No caso específico do farelo de arroz, Luh et al. (1991) reportam que este contém inúmeras enzimas tais como α -amilase, β -amilase, catalase, lipases, lipoxigenases e peroxidases.

3.2 PEROXIDASE

A peroxidase (CE 1.11.1.X) pode ser definida como uma enzima que catalisa a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos tendo o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos como moléculas aceptoras (FAWAL et al., 2013; MATHÉ et al., 2010). Em sua maioria, as peroxidases são consideradas heme proteínas de massa molecular entre 30 a 150 kDa, e que contêm em sua estrutura uma protoporfirina IX de ferro III como grupo prostético, o qual é responsável pela atividade catalítica. Algumas exceções (não heme) contêm citocromo c, selênio ou vanádio no seu centro catalítico. O termo peroxidase pode representar um grupo de enzimas específicas como NADH peroxidase (CE 1.11.1.1), glutathiona peroxidase (CE 1.11.1.9) e iodeto peroxidase (CE 1.11.1.8), bem como um grupo

de enzimas não específicas conhecidas simplesmente por peroxidases (HAMID; REHMAN, 2009; WELINDER et al., 2002).

As peroxidases estão largamente distribuídas em duas superfamílias, a saber: as de origem animal, e as de origem vegetal e microbiana. As peroxidases de origem animal incluem a peroxidase eosinofílica, lactoperoxidase, tireoide peroxidase e glutathione peroxidase, sendo esta última também encontrada em plantas. As peroxidases de vegetais e micro-organismos são divididas em três subclasses: I, II e III. Na classe I estão incluídas as peroxidases procarióticas intracelulares, tais como citocromo c peroxidase (CcP, CE 1.11.1.5), ascorbato peroxidases (APxs, CE 1.11.1.11), catalase peroxidase (CP, CE 1.11.1.6), e as peroxidases bacterianas de genes duplicados. A vasta distribuição das peroxidases da classe I, em particular sua presença em procariotos, sugere que esta provavelmente deu origem às outras duas classes. A classe II abrange as peroxidases extracelulares de fungos e compreende a lignina peroxidase (LiP, CE 1.11.1.14), a peroxidase dependente de manganês (MnP, CE 1.11.1.13) e a peroxidase versátil (VP, CE 1.11.1.16). A classe III compreende as peroxidases extraídas de vegetais (POX, CE 1.11.1.7), dentre as quais se destaca a peroxidase de rabanete clássica (HRP) (HIGARA et al., 2001; SMITH; VEITCH, 1998; WELINDER, 1992; WELINDER et al., 2002).

As três classes de peroxidases de vegetais diferem entre si através de suas estruturas e propriedades catalíticas, porém todas apresentam o grupamento heme em sua estrutura, dez ligações α -hélices em comum e cinco aminoácidos posicionados separadamente, os quais são importantes para a catálise e estrutura, bem como a dobragem helicoidal de todo o polipeptídeo (HIGARA et al., 2001; WELINDER, 1992). As peroxidases pertencentes à classe I não contêm qualquer ponte de dissulfeto, carboidrato e íons cálcio. As peroxidases das classes II e III são glicosiladas na superfície da proteína e apresentam dois íons cálcio e pontes de cisteína. Todos os resíduos de cisteína presentes na proteína (cerca de 8 a 10) formam pontes dissulfeto, o que confere alto grau de rigidez à molécula proteica. As peroxidases da classe II possuem entre 40 a 60 aminoácidos no carbono terminal a mais que as peroxidases das classes I e III (BANCI, 1997; ZÁMOCKÝ; FURTMÜLLER; OBINGER, 2010; SCHULLER et al., 1996).

A atividade da peroxidase está relacionada à presença de isoenzimas catiônicas e/ou aniônicas termolábeis e termorresistentes. Conforme Veitch (2004), cada espécie vegetal contém um conjunto de isoenzimas que realizam uma variedade de funções diferentes. As isoenzimas presentes em raiz forte, como o rabanete, são estudadas de forma mais intensa por apresentarem maior atividade. No entanto, estudos visando à obtenção de peroxidases a partir

de resíduos ou subprodutos de vegetais tem se tornado cada vez mais frequente. Alguns exemplos incluem o farelo de trigo (MANU; RAO, 2009), casca de feijão-da-Índia (ALIJA; RAO, 2009), soja (STEEVENSZ et al., 2013), laranja (VETAL; RATHOD, 2014), tangerina (NOUREN et al., 2012) e batata doce (MALONEY et al., 2012), e sementes de laranja e maçã (ZIA et al., 2011).

As peroxidases possuem inúmeras aplicações, incluindo o tratamento de contaminantes fenólicos na presença de peróxido de hidrogênio (DEVA et al., 2014), descoloração de corantes (VUJCIC et al., 2015), elaboração de ensaios imunoenzimáticos (MONTSERRAT et al., 2015), desodorização de dejetos de suínos (PARKER et al., 2012), *kits* de diagnóstico rápido (MUNIR; KHAN; PARK, 2015), construção de biossensores (MOYO; OKONKWO, 2014) e síntese de polímeros (SAKAI et al., 2014). Devido à sua natureza oxidativa, especificidade e atuação em condições moderadas, a peroxidase também pode estar associada à degradação de micotoxinas (FELTRIN, 2013; GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011).

3.3 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O processo de recuperação de proteínas ou enzimas é caracterizado pela obtenção do produto em solução a partir do sistema de produção, e compreende as etapas de separação e ruptura das células (esta última somente para proteínas intracelulares) e concentração. A purificação tem por objetivo a obtenção da proteína ou enzima de interesse de forma individual, a partir de uma solução multiproteica (LIENQUEO; ASENJO, 2000).

Visando obter um produto com maior grau de pureza, inúmeras técnicas têm sido utilizadas para a purificação e recuperação deste. No entanto, para obter a forma purificada, é interessante que se escolha operações unitárias adequadas e que estas se integrem de forma lógica em um *design* de purificação. Qualquer estratégia que permita a redução das etapas envolvidas no processo de purificação deve ser vista com interesse. No caso específico de produção de enzimas ou proteínas comerciais em larga escala, é importante que se desenvolva um processo eficiente e de baixo custo, que resulte em um rendimento adequado e forneça a pureza desejada do bioproduto em questão, sem alterar a sua atividade biológica (AZEVEDO et al., 2009; LIENQUEO; ASENJO, 2000; NFOR et al., 2008; YANG et al., 2010).

Ao desenvolver um *design* de purificação, deve-se levar em consideração alguns critérios pelos quais se define o processo ideal, tais como o custo e a velocidade de mercado. A aplicação final do produto determinará o percentual de pureza que este deve alcançar, assim

como a concentração de impurezas específicas que serão admissíveis neste (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 2001; WHEELWRIGHT, 1989).

3.3.1 Cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido

A CTI baseia-se na competição entre os grupos constituintes de uma proteína e os contra íons de uma solução tampão pelos grupos carregados presentes em um trocador iônico, o qual pode ser catiônico ou aniônico. As cargas moleculares de uma solução tampão são oriundas dos diferentes componentes salinos do meio, enquanto que a carga líquida da proteína se deve à combinação dos diferentes aminoácidos presentes nesta (CUTLER, 2004; ROE, 2001).

A CTI é uma das técnicas mais utilizadas na indústria biotecnológica para a separação de peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e biopolímeros relacionados (LEVISON, 2003). Apresenta vantagens como a possível ampliação para a escala industrial, alta resolução, elevada capacidade de ligação, versatilidade e habilidade de suportar rigorosos protocolos de limpeza (CUTLER, 2004). Além disso, a troca iônica pode ser operada em modo fixo ou em leito expandido.

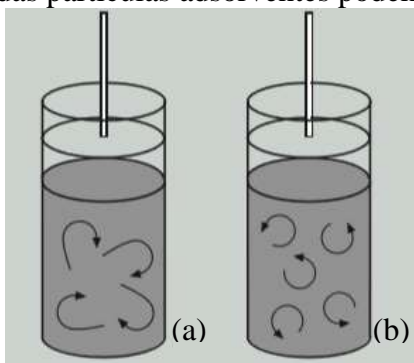
A CTI em coluna de leito expandido é uma operação em que proteínas de interesse são purificadas a partir de extrato bruto ou clarificado. A técnica permite integrar a separação sólido-líquido, a redução de volume pela ligação da proteína e a purificação parcial em um único processo, sem comprometer sua eficiência, porém economizando considerável tempo de operação e custos iniciais de investimento. O processo é baseado no uso de adsorventes particulados com diferentes seletividades, os quais residem em coluna cromatográfica (BOERIS et al., 2012; BUYEL; TWYMAN; FISCHER, 2015; LIN et al., 2013). Adicionalmente, a técnica proporciona o aumento da produtividade do processo e maior interação entre o adsorvente e a molécula alvo devido à expansão do leito (TOLEDO et al., 2007; TONG; DONG; SUN, 2002).

O equipamento utilizado na CTI em coluna leito expandido é similar ao empregado nos processos cromatográficos de leito fixo. A exceção fica por conta do *design* da coluna de leito expandido, a qual possui duas características que a distingue da coluna cromatográfica convencional: a entrada de líquido e o adaptador no topo. Uma vez que não há queda de pressão ao longo do leito expandido, esta deve ser gerada através de placa perfurada na entrada de distribuição do líquido na coluna. Além disso, o adaptador no topo é móvel,

permitindo que a coluna seja operada em diferentes alturas de leito, o que é necessário durante cada estágio do processo em leito expandido (HJORTH, 1997).

Alguns autores consideram o leito expandido como parte integral da tecnologia de leito fluidizado e não fazem distinção entre as duas expressões. No entanto, em um leito fluidizado, a turbulência e o grau de mistura são elevados, tanto do sólido como da fase fluida, tornando-o muito similar a um processo descontínuo em tanque agitado (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 2008; CHASE, 1994). A CTI em leito expandido explora o fenômeno da segregação do leito fluidizado, que consiste na tendência das partículas menos densas permanecerem na parte superior da coluna, enquanto as mais densas permanecem na região inferior, próximas do distribuidor. Deste modo, embora as partículas adsorventes estejam em suspensão, o agrupamento destas, em camadas bem definidas, torna a fluidização estável e controlada, reduzindo a mistura de partículas no sentido axial, verificada no leito fluidizado. O resultado é a combinação das propriedades hidrodinâmicas do leito fluidizado com as propriedades do leito empacotado (PESSOA-JR; KILIKIAN; 2005). As diferenças entre os modos de operação do leito estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Comparação entre o movimento das partículas (a) em leito fluidizado e (b) em leito expandido. Na fluidização estável de um leito expandido, apenas pequenos movimentos circulares das partículas adsorventes podem ser vistas.



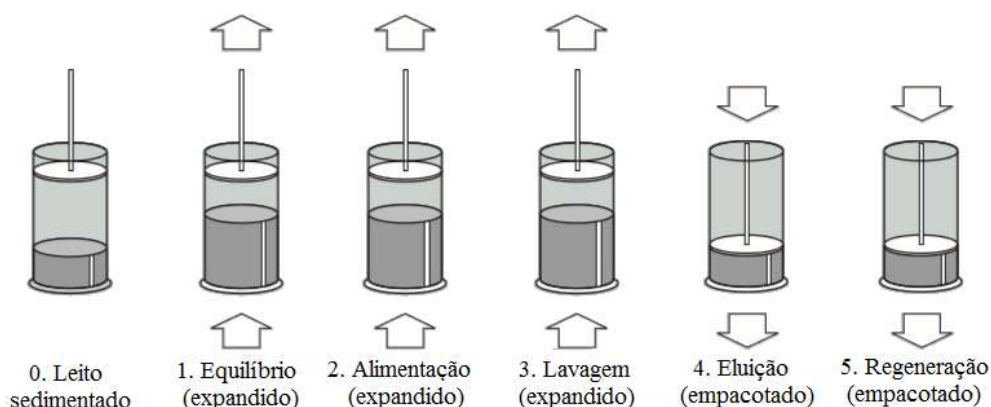
Fonte: Adaptado de AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (2008).

Quando comparado com a cromatografia clássica em leito fixo, o processo em leito expandido utiliza um adsorvente adequado para expandir na coluna com a fase móvel fluindo no sentido ascendente, formando assim o leito expandido. A matriz adsorvente, ou resina, deve demonstrar características apropriadas de fluidização, tais como a capacidade de expandir até o grau requerido (aproximadamente duas a três vezes mais que a altura do leito sedimentado) quando aplicada uma velocidade de fluxo adequada. Além disso, as partículas adsorventes devem possuir uma gama de diâmetros que sejam adequados para a geração de leito expandido estável (CHASE, 1994; XIA; LIN; YAO, 2007; ZHAO; YAO; LIN, 2009).

As matrizes adsorventes comumente empregados na CTI em leito expandido são as de celulose, agarose, dextrana e poliacrilamida. Os ligantes clássicos (SP- sulfopropil, DEAE- dietil aminoetil e IDA-ácido iminodiacético) são acoplados ao suporte das partículas adsorventes (agarose-quartzo ou agarose-metal) elevando sua densidade e viabilizando a expansão do leito. Devido às proteínas serem anfifílicas e possuírem tanto carga positiva como negativa, podem ser utilizados trocadores aniônicos ou catiônicos. Algumas matrizes adsorventes são estáveis numa ampla faixa de pH (2-12) e são chamadas de trocadores fortes, enquanto outras matrizes mudam a carga conforme a alteração do pH e são denominados trocadores fracos (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005).

A Figura 2 apresenta as etapas envolvidas na CTI em leito expandido. Num primeiro momento, a matriz adsorvente é expandida e equilibrada através da aplicação de uma solução tamponante de baixa força iônica em fluxo ascendente. Um leito fluidizado é formado quando as partículas adsorventes são suspensas em equilíbrio devido ao balanço entre a velocidade de sedimentação da partícula e a velocidade do líquido ascendente. Nesta etapa, o pistão é posicionado na parte superior da coluna, permitindo assim a expansão do leito. Após o equilíbrio, o material a ser purificado é aplicado ao leito expandido com o mesmo fluxo ascendente utilizado na etapa anterior (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 2008).

Figura 2 - Esquema dos passos na adsorção em leito expandido, onde as colunas mostram os diferentes estágios de operação do sistema e as setas indicam a direção do escoamento.



Fonte: Adaptado de AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (2008).

Posteriormente, uma etapa de lavagem é necessária para a remoção do material particulado e fracamente ligado ao adsorvente, sendo esta realizada também com fluxo ascendente e com leito de forma expandida. Após a retirada de todo o material fracamente ligado à matriz, o fluxo de líquido é interrompido e as partículas de adsorvente são

sedimentadas. Então, o adaptador no topo da coluna é baixado até à superfície do leito sedimentado, dando início à eluição em fluxo descendente das proteínas capturadas através da utilização de condições de tampão adequadas. Por fim, um procedimento de limpeza no local é realizado tanto para remover o material não ligado ao adsorvente, como para regenerar o leito à sua forma original (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 2008).

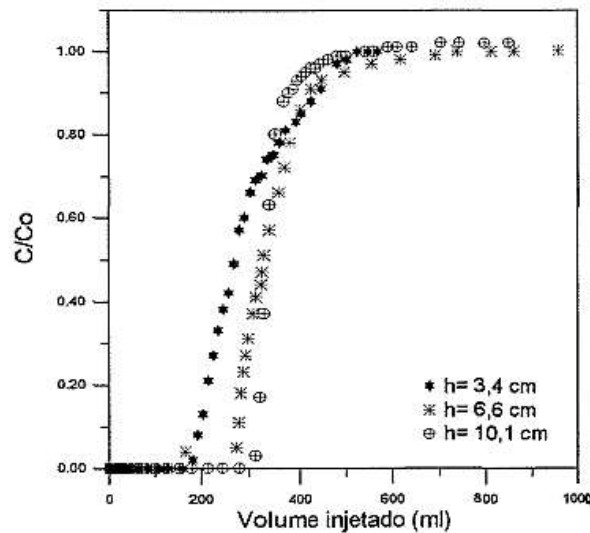
Diversos autores apresentam aplicações bem sucedidas da CTI em leito expandido na purificação de proteínas como as nativas do tomate (STRAETKVERN; SCHWARZ, 2012), lactoferrina e imunoglobulina G (DU et al., 2013; DU et al., 2014), papaína (YUHAI; CHIK; CHIN, 2014), β -galactosidase (BOERIS et al., 2012), quitosanase (ARAÚJO et al., 2016), inulinase (KALIL; MAUGERI-FILHO; RODRIGUES, 2005), xilanase (SANTOS; GUIRARDELLO; FRANCO, 2002), peroxidase (GAUTÉRIO et al., 2015), entre outras. Outros usos desta técnica se estendem à purificação de corantes naturais como a C-ficocianina (BERMEJO; RAMOS, 2012; MORAES et al., 2014) e B-ficoeritrina (BERMEJO; RUIZ; ACIEN, 2007), antígenos de *Leishmania infantum chagasi* (SOUSA JUNIOR et al., 2015) e hepatite B (NG; TAN; TEY, 2012), e ácido salvianólico de plantas medicinais (LI et al., 2014).

Na CTI, o comportamento na adsorção em leitos fixos ou fluidizados pode ser caracterizado através das curvas de ruptura (*breakthrough curves*), as quais indicam a quantidade de proteína que pode se ligar à matriz adsorvente, conforme mostra a Figura 3. Estas curvas relacionam o volume da solução injetada ou o tempo com a concentração de adsorbato na saída da coluna. De acordo com Mozammel et al. (2007), a curva de ruptura ocorre até o momento em que a concentração de adsorbato na saída (C) seja igual a concentração de solução inicial injetada (C_0). Após este ponto, a troca iônica deixa de ocorrer, pois a matriz adsorvente está com seus sítios ativos totalmente preenchidos. O ponto de ruptura (*breakthrough point*) é considerado como o tempo de conclusão do ciclo de adsorção em aplicações industriais.

Nesta técnica, a medição da concentração do adsorbato na saída da coluna é realizada em função do volume de solução injetada ou do tempo, tornando possível a obtenção da curva de ruptura do sistema. A capacidade de ligação do leito é obtida por integração da área sob a curva de ruptura. Na prática, a coluna é alimentada com a solução proteica de interesse. Inicialmente, a concentração da solução proteica na saída da coluna (local onde o monitoramento é realizado) é nula e a curva toca o eixo das abscissas, indicando que a resina está ligando toda a proteína que percorre o leito. Conforme o processo continua, a

concentração de proteínas aumenta, vagarosamente no início, e de modo abrupto no final. Quando a ruptura ocorre, a alimentação é interrompida (ARAUJO, 1996).

Figura 3 - Curvas de ruptura obtidas para diferentes alturas de leito, utilizando solução de albumina de soro bovino com concentração inicial de 3,0 mg/mL.



Fonte: ARAUJO (1996).

De acordo com Chase (1994), a interrupção da alimentação na coluna pode ser feita quando o nível de proteínas na saída sobe acima de certo nível. Caso a alimentação continue, quantidades consideráveis de proteína podem passar pela coluna sem serem ligadas. A quantidade de proteína que pode ser alimentada, antes que este nível exceda, irá depender da forma apresentada pela curva de ruptura.

3.3.2 Processos de separação por membranas

Em termos simples, membranas podem ser consideradas como barreiras que separam duas fases e que restringem, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Os processos de separação por membranas (PSM) se destacam nas mais diversas áreas devido a seu princípio de separação único, isto é, o transporte seletivo em comparação a outras operações unitárias existentes. Os PSM oferecem alta superfície por unidade de volume, não envolvem mudanças de fase ou adição de aditivos químicos, e podem ser utilizados na separação de substâncias termossensíveis, uma vez que operam à temperatura ambiente ou a baixas temperaturas. Devido às propriedades únicas das membranas, o aumento ou a redução de escala dos PSM,

assim como sua integração em outros processos, são relativamente simples (BAKER, 2004; SAXENA et al., 2009; ZEMAN; ZYDNEY, 1996)

Os PSM têm sido utilizados em inúmeros setores de atividade na indústria química, médica, alimentícia, biotecnológica e farmacêutica. Algumas aplicações incluem a separação de substâncias termolábeis, desidratação de etanol, fracionamento de proteínas, purificação de enzimas, esterilização de meios de fermentação, esterilização do ar, concentração de leite, soro de queijos e sucos de frutas, clarificação e desalcoolização de vinhos e cervejas, produção de ar enriquecido com oxigênio, esterilização de soluções injetáveis, entre outras (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Os PSM podem ser agrupados de acordo com as forças motrizes aplicadas, a saber: processos baseados na pressão, os quais incluem a microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI); processos baseados na concentração, chamados de diálise e osmose; processos baseados no potencial elétrico como a eletrodialise; processos movidos por pressão parcial e pressão de vapor, chamados de pervaporação e destilação por membrana; e processos regidos pela diferença de potencial químico, tendo como exemplo as membranas líquidas suportadas, membranas contactoras e reatores de membrana (WIBISONO et al., 2014).

Entre os PSM existentes, os mais empregados na área biotecnológica, em especial na concentração e purificação de macromoléculas, são os que utilizam a diferença de pressão como força motriz, os quais podem ser entendidos como a extensão dos processos de filtração clássica que empregam membranas cada vez mais fechadas, ou seja, com poros cada vez menores (PESSOA; KILIKIAN, 2005). A Tabela 1 apresenta as espécies retidas nos PSM que utilizam como força motriz a diferença de pressão.

Tabela 1 - Espécies retidas nos PSM que utilizam a diferença de pressão como força motriz.

Espécie	Massa molar (Da)	Tamanho (nm)	Processos aplicáveis			
			OI	NF	UF	MF
Leveduras e fungos		10 ³ a 10 ⁴				X
Células bacterianas		300 a 10 ⁴			X	X
Colóides		100 a 10 ³			X	X
Vírus		30 a 300			X	X
Proteínas	10 ⁴ a 10 ⁶	2 a 10			X	
Polissacarídeos	10 ³ a 10 ⁶	2 a 10		X	X	
Enzimas	10 ³ a 10 ⁶	2 a 5		X	X	
Açúcares simples	200 a 500	0,8 a 1,0	X	X		
Orgânicos	100 a 500	0,4 a 0,8	X	X		
Íons inorgânicos	10 a 100	0,2 a 0,4	X			

Fonte: Habert, Borges e Nobrega (2006).

A Tabela 2 apresenta as principais características dos PSM em termos de tipo de membrana, força motriz e mecanismo de transporte.

Tabela 2 – Características dos PSM em termos de tipo de membrana, força motriz e mecanismo de transporte.

Processo	Tipo de membrana	Força motriz (ΔP)	Mecanismo de transporte
Microfiltração	Membrana isotrópica ou anisotrópica com poros entre 0,1 a 10 μm	Pressão hidrostática, 0,05 a 0,2 Mpa	Peneiramento (exclusão por tamanho)
Ultrafiltração	Membrana anisotrópicas com poros entre 2 a 10 nm	Pressão hidrostática, 0,1 a 0,5 Mpa	Peneiramento (exclusão por tamanho)
Nanofiltração	Membranas anisotrópicas com poros entre 5 a 10 \AA	Pressão hidrostática 0,5 a 2,5 MPa	Peneiramento (exclusão por tamanho)
Osmose inversa	Membrana anisotrópica densa	Pressão hidrostática de 1 a 10 MPa	Sorção e difusão

Fonte: Adaptado de Wibisono et al. (2014).

Em razão da aplicação a que se destinam, as membranas apresentam diferentes estruturas, podendo ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. Tanto as membranas densas quanto as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, isto é, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua estrutura. Membranas anisotrópicas são caracterizadas por uma região superior fina (próxima a 1 μm), mais fechada (com poros ou não), chamada de “pele”, suportada em estrutura porosa. Ambas as regiões podem ser constituídas do mesmo material (membrana anisotrópica integral) ou de materiais diferentes (membranas anisotrópica composta) (PESSOA; PESSOA; KILIKIAN, 2005).

3.3.2.1 Ultrafiltração

A UF por membrana consiste no transporte de soluções através de membranas anisotrópicas com poros de diâmetro de 2 a 10 nm, sob pressão de transmembrana de 100 a 500 kPa e fluxo de filtrado de 10 a 200 L/h.m², sendo utilizada na separação de espécies em soluções aquosas pela massa molar, forma e/ou carga. Neste processo, a água e outras moléculas pequenas passam pela membrana, enquanto que moléculas de tamanho superior ao diâmetro do poro da membrana ficam retidas sobre esta (CUTLER, 2004; ROE, 2001; SCHMIDELL et al., 2001; WIBISONO et al. 2014).

A habilidade de retenção das membranas de UF é determinada com base na sua massa molar limite (*cut off*), que compreende a faixa de 5 a 500 kDa ou maior. A retenção nominal de uma membrana é definida como sendo a massa molar para a qual a membrana apresenta coeficiente de rejeição de 95%. As membranas de UF podem ser feitas de polímeros, materiais cerâmicos e metálicos, sendo esta última a menos utilizada em aplicações de larga escala. A maioria dos processos de ultrafiltração fazem o uso de membranas poliméricas, constituídas principalmente de polissulfona, polietersulfona e celulose regenerada. Membranas poliméricas são quimicamente inertes, termicamente estáveis e possuem estrutura assimétrica composta de duas camadas distintas: uma película fina com poros extremamente pequenos (10 a 400 Å), responsável pela seletividade da membrana; e uma subestrutura espessa e porosa, a qual proporciona o suporte mecânico necessário (CUI, 2005; CUTLER, 2004; REIS; ZYDNEY, 2007; WHEELWRIGHT, 1989).

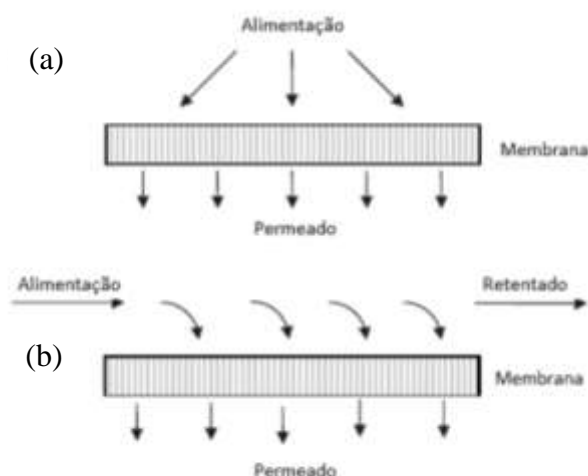
Um problema comum durante os processos de UF é a perda de desempenho da membrana devido à polarização por concentração e incrustações (*fouling*), fenômenos que levam à redução do fluxo do permeado através da membrana ao longo do tempo (PEEVA et al., 2012). A polarização por concentração se refere ao acúmulo de solutos próximo à superfície da membrana, devido à sua rejeição pela barreira semipermeável, ocorrendo imediatamente após a UF ser iniciada. Esse fenômeno pode ser minimizado conforme o modo de operação da célula de UF. As incrustações podem ocorrer tanto pela adsorção sobre e no interior dos poros, como pela formação de depósitos e/ou obstrução dos mesmos, causando alterações irreversíveis nas propriedades da membranas (REIS; ZYDNEY, 2007; SAXENA et al., 2009).

Existem dois modos de operação da UF, a saber: escoamento convencional ou tangencial (Figura 4). Na UF convencional, quando uma solução ou suspensão é pressionada contra a membrana, ocorre a passagem do solvente por esta, enquanto que o soluto ou materiais em suspensão são retidos, acumulando-se próximo à superfície da membrana, no fenômeno de polarização por concentração. Na UF tangencial, a solução de alimentação escoia em paralelo à superfície da membrana, enquanto o permeado é transportado transversalmente a esta. A polarização por concentração continua presente, porém seu efeito é minimizado (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005).

A UF opera em condições de temperatura e pressão relativamente baixas, não envolve mudança de fase ou adição de aditivos químicos, podendo ser aplicada na concentração de moléculas biológicas sem que ocorra a sua desnaturação ou degradação em demasia. Trata-se de uma técnica menos dispendiosa quando comparado a outros métodos de

separação e purificação, de fácil operação e ampliação de escala. No entanto, a maior vantagem do processo de separação por ultrafiltração é o alto rendimento do produto (CUI, 2005).

Figura 4 – Modos de operação da UF (a) escoamento convencional (b) escoamento tangencial.



Fonte: Adaptado de Charcosset (2006).

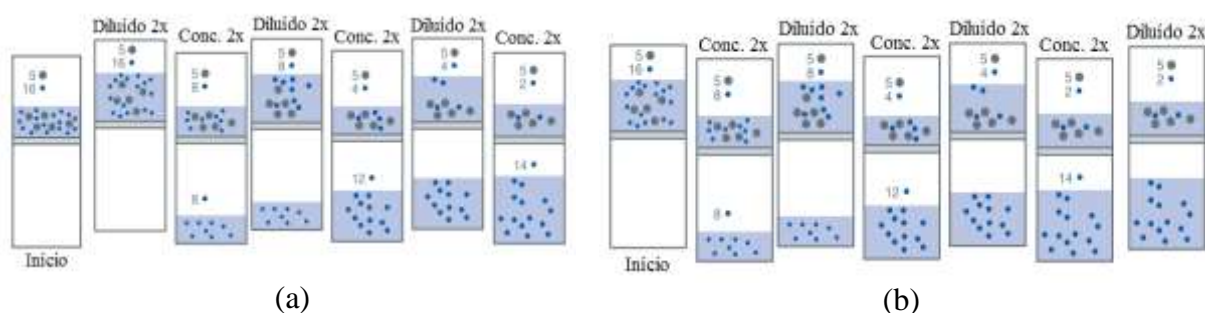
3.3.2.2 Diafiltração

A diafiltração (DF) é considerada um modo alternativo de operar os PSM que utilizam o gradiente de pressão como força motriz. É um processo com resultados idênticos aos alcançados na diálise, porém operado sob fluxo convectivo ao invés da difusão. Consiste basicamente em operar a célula do PSM com alimentação contínua de solvente em vazão igual a vazão de permeado. O objetivo dessa operação é remover os contaminantes associados ao composto de interesse, substituindo-os por outras espécies de baixa massa molecular. Dessa forma, os contaminantes são eliminados no permeado, enquanto que a membrana retém o composto-alvo (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; WHEELWRIGHT, 1989). A DF é utilizada no ramo biotecnológico para separar açúcares, sais e ácidos de soluções contendo proteínas, pectinas e outras macromoléculas, aumentando o rendimento do produto (YAZDANSHENAS et al., 2005)

A DF pode ser operada em modo contínuo e descontínuo. No modo contínuo, o diluente (normalmente solução tamponante ou água) é adicionado ao sistema à mesma vazão do permeado, enquanto que no modo descontínuo a adição do diluente é feita em etapas e a vazões iguais ao do permeado. O modo descontínuo de DF pode ser operado de duas formas,

conforme mostra a Figura 5: diluição sequencial, a qual envolve a diluição da amostra com o diluente a um volume pré-determinado, e concentração desta ao seu volume original; e redução do volume, a qual compreende a concentração da amostra a um volume fixo e sua posterior diluição com diluente. Em ambas as formas de operação descontínua da DF, o processo é repetido até que os contaminantes presentes na amostra inicial sejam removidos (SCHWARTZ, 2003; WHEELWRIGHT, 1989).

Figura 5 - Operação descontínua da DF (a) diluição sequencial (b) redução de volume.



Fonte: Adaptado de Schwartz (2003).

Uma das vantagens da DF em relação à diálise é o menor tempo de processo. Além disso, a DF é mais eficiente em termos de quantidade de diluente requerida, realiza a concomitante remoção dos contaminantes e concentração do composto de interesse, aumenta a pureza do material filtrado e proporciona menor risco de perdas e contaminações, uma vez que todo o processo é realizado na mesma célula de separação por membrana (SCHWARTZ, 2003; WANG; ZHANG; OUYANG, 2002).

3.3.3 Purificação de peroxidases

Nos últimos anos, a literatura científica têm apresentado trabalhos que abordam a purificação de peroxidases de origem vegetal, desde o uso de procedimentos simples até o emprego de uma sequência de técnicas sofisticadas. A maioria destes estudos visam a posterior caracterização enzimática, onde a prioridade é a obtenção de peroxidase altamente purificada, mesmo que em baixo rendimento; outros têm por objetivo obter a peroxidase pura para posterior imobilização e aplicação industrial, onde o nível de pureza e o rendimento dependem fortemente do uso final da enzima. Nesse segundo caso, a purificação se torna ainda mais necessária quando propriedades da enzima são aprimoradas, tais como estabilidade

térmica (BOUCHERIT et al., 2013; NADAROGLU et al., 2013; RUDRAPPA et al., 2007) e capacidade de degradação de alguns substratos (ZENG et al., 2013).

Inúmeras técnicas têm sido empregadas na purificação de peroxidases, tais como precipitação por sais (KHARATMOL; PANDIT, 2012), solventes orgânicos (SINGH; PRAKASH; SHAH, 2012) ou polieletrólitos (VALETTI; PICÓ, 2013), propano comprimido (FRICKS et al., 2012), UF (GOTTSCHALK; BON; NOBREGA, 2008), sistema aquoso bifásico (SRINIVAS; BARHATE; RAGHAVARAO, 2002), partição trifásica (VETAL; RATHOD, 2014) e processos cromatográficos em geral (GONG et al., 2015). Recentemente, o uso da CTI em coluna de leito expandido se mostrou como alternativa na purificação de peroxidases através de um único processo, proporcionando a purificação da peroxidase em 2,4 vezes e recuperação dessas enzimas em até 41% (GAUTÉRIO et al., 2015).

A CTI é uma das técnicas mais aplicadas na purificação de peroxidases, sendo utilizada em conjunto a outras técnicas cromatográficas e/ou posteriormente às técnicas preliminares de purificação, tais como precipitação por sais (JAOUADI et al. 2014) e solventes orgânicos (ARNALDOS et al. 2001). A Tabela 3 apresenta a compilação de técnicas associadas à CTI para purificação de peroxidases de vegetais.

A UF é frequentemente aplicada na concentração de peroxidases antes ou após o uso de técnicas cromatográficas (CHEN; CHUNG; CHANG, 2012; DAS; SHARMA; MISHRA, 2011; MÁRQUEZ et al., 2008; MOHAMED; DARWISH; EL-SHISHTAWY, 2013; SRINIVAS; BARHATE; RAGHAVARAO 2002). Quando usada nas primeiras etapas de purificação, a técnica pode fornecer elevado rendimento da enzima para os estágios seguintes. Na purificação de folhas de tamareira (*Phoenix dactylifera*), Al-Senaïdy e Ismael (2011) fizeram o uso da UF como etapa prévia à cromatografia de troca iônica e exclusão molecular. A técnica promoveu a recuperação da enzima em 96% e fator de purificação de 1,4 vezes. Dentre as três técnicas utilizadas na purificação de manganês peroxidase, Boer et al. (2006) obtiveram somente na UF o fator de purificação de 1,38 vezes e 95,4% de recuperação enzimática. Elevados rendimentos da enzima também foram observados nos trabalhos de Ikehata et al. (2005) (72%) e Zeng et al. (2013) (90%).

Não foi encontrado até o momento relatos na literatura a respeito da purificação de peroxidases utilizando CTI em leito expandido integrado à UF.

Tabela 3 – Purificação de peroxidases de origem vegetal por associação de técnicas.

Fonte	Sequência de técnicas utilizada	FP (vezes)	REC (%)	Referência
Morango (<i>Fragaria ananassa</i>)	Precipitação com acetona; cromatografia de troca aniônica, afinidade e exclusão molecular	128,6	1,9	Arnaldos et al. (2001)
Água de coco (<i>Cocos nucifera</i>)	Precipitação com sulfato de amônio; cromatografia de troca catiônica, interação hidrofóbica e exclusão molecular	9,8	12,8	Balasubramanian e Boopathy (2013)
Folhas de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i>)	Precipitação com sulfato de amônio; cromatografia de exclusão molecular e troca aniônica	226	37,6	Cai et al. (2012)
Folha de palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	Cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular	429	54	Deepa e Arumughan (2002)
Sementes de milheto (<i>Pennisetum glaucum</i>)	Precipitação com sulfato de amônio; cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular	12,5	4,7	Devaiah e Shetty (2009)
Flores de <i>Cytisus multiflorus</i>	Sistema aquoso bifásico; cromatografia de interação hidrofóbica, troca catiônica e exclusão molecular	1167,8	37,8	Galende et al. (2015)
Manga (<i>Mangifera indica</i>)	Precipitação com sulfato de amônio; cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular	48	1,7	Khan e Robimson (1993)
Folhas de espinafre (<i>Spinacia oleracea</i>)	Precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca catiônica	22,6	4,2	Köksal (2011)
Batata doce (<i>Ipomoea batatas</i>)	Cromatografia de interação hidrofóbica e troca aniônica	117	15	Leon et al. (2002)
Flores de alcachofra (<i>Cynara cardunculus</i>)	Precipitação com sulfato de amônio; cromatografia de interação hidrofóbica, exclusão molecular e troca catiônica	54	2,3	López-Molina et al. (2003)
Raízes de rabanete (<i>Armoracia rusticana</i>)	Precipitação com sulfato de amônio; cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular	29,3	15,7	Motamed et al. (2009)
Folhas de rúcula (<i>Eruca vesicaria</i>)	Precipitação com sulfato de amônio; cromatografia de troca catiônica e exclusão molecular	220,3	80,8	Nadaroglu et al. (2013)
Folhas de <i>Leucaena leucocephala</i>	Precipitação com acetona; cromatografia de troca aniônica, exclusão molecular e afinidade	89,3	26,1	Pandey e Dwivedi (2011)

FP = Fator de purificação; REC = Recuperação enzimática

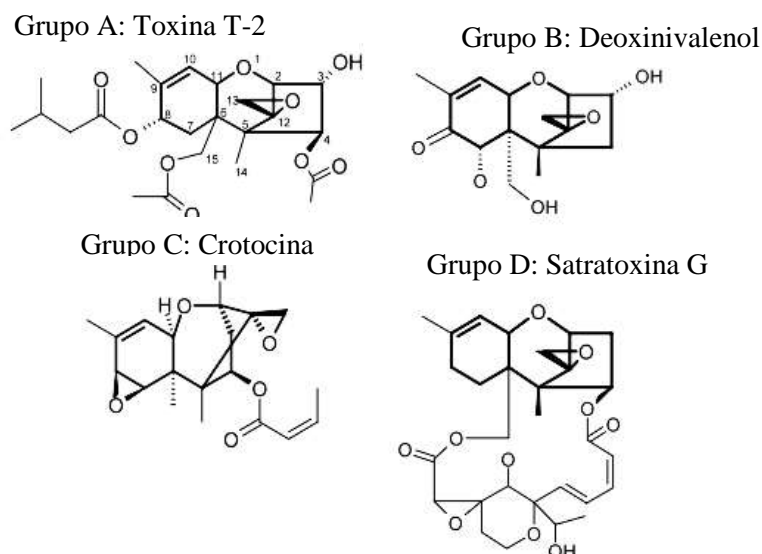
4.5 MICOTOXINAS: CONCEITOS E MÉTODOS DE DEGRADAÇÃO

As micotoxinas correspondem a diversos grupos de compostos produzidos por fungos, normalmente após a fase de crescimento equilibrado. No entanto, a produção de uma micotoxina em particular é geralmente limitada a um pequeno número espécies de fungos ou mesmo cepas específicas. Os fungos das espécies *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria* são considerados os maiores produtores destes metabólitos, estando presentes em grande número de hospedeiros como, por exemplo, os cereais. O acúmulo de micotoxinas pode ocorrer no campo, durante o armazenamento, processamento ou produção final de alimentos e rações. Dentre as micotoxinas comumente encontrada em alimentos estão as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearelona e fumosinas (KUMAR; BASU; RAJENDRAN, 2008; MELLO; MACDONALD, 1997; SIEGEL; BABUSCIO, 2011).

Os tricotecenos são compostos sesquiterpenoides tetracíclicos caracterizados pela presença de uma dupla ligação entre C-9 e C-10 e de um grupo epóxido entre C-12 e C-13, o qual é responsável pela sua atividade biológica (ARUNACHALAM; DOOHAN, 2013; TÜRKER; GÜMÜS, 2009). Dividem-se em quatro grupos, A, B, C, e D, de acordo com os grupos funcionais presentes na posição C-8 da estrutura básica dos tricotecenos, conforme mostra a Figura 6. O grupo A (toxina T-2 e toxina HT-2) e grupo B (deoxinivalenol e nivalenol) se distinguem pela ausência ou presença de um grupamento carbonila na posição C-8, respectivamente. O grupo C (crotocina) apresenta um anel epóxido adicional em sua estrutura entre as posições C-7 e C-8. O grupo D (satratoxina e roridina) contém um anel macrocíclico entre as posições C-4 e C-5 (SUDAKIN, 2003).

Deoxinivalenol (DON, vomitoxina) é uma micotoxina pertencente ao grupo B dos tricotecenos e produzida principalmente pelos fungos das espécies *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*. Sua ocorrência está predominantemente relacionada aos cereais como trigo, cevada e milho, e com menos frequência à aveia, arroz, centeio, sorgo e triticale. A molécula do DON é caracterizada como um sesquiterpeno tetracíclico com sete centros estéreis, cuja fórmula molecular é $C_{15}H_{20}O_6$ nomeada tricotec-9-en-8-ona,12,13-epoxi-3,7,15-tri-hidroxi-(3 α ,7 α)-(9CI). Além de duas hidroxilas secundárias e uma primária, a molécula também dispõe de um grupamento cetônico conjugado e um éter etílico. DON é estável a temperatura de 120°C e parcialmente estável à 210°C, tolera condições fracamente ácidas e é instável em meio alcalino (LARSEN et al., 2004; NAGY et al., 2005; TÜRKER; GÜMÜS, 2009).

Figura 6 - Estrutura química dos tricotecenos (exemplos dos grupos A-D).



Fonte: Adaptado de SUDAKIN (2003).

Assim como os demais tricotecenos, o efeito tóxico do DON está relacionado à presença do anel epóxido em sua estrutura. A ingestão de DON pode causar reações crônicas ou agudas dependendo de fatores como a forma de exposição, estado imunológico e dose. Segundo Pestka (2007), a toxicidade do DON é menor quando comparada a outras micotoxinas como, por exemplo, a toxina T-2, enquanto que a presença desta última em elevadas doses em alimentos é pouco provável. Por outro lado, Larsen et al. (2004) ressaltaram que o efeito acumulativo do DON é preocupante, uma vez que pode levar à anorexia nervosa, redução do ganho de peso, má absorção de nutrientes, alterações neuroendócrinas e imunossupressão.

A busca por métodos de degradação ou redução dos níveis de micotoxinas têm se tornado cada vez mais intensa, porém, independente da estratégia escolhida, alguns requisitos devem ser considerados, a saber: a micotoxina deve ser destruída, removida ou inativada; o processo não deve produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos; os esporos dos fungos e micélio devem ser destruídos, evitando que novas toxinas sejam formadas; as propriedades físicas e químicas do material não devem ser alteradas de forma significativa; e o material deve reter seu valor nutritivo e permanecer palatável (BEAVER, 1991).

A degradação ou redução dos níveis de micotoxinas pode ser alcançada através de métodos físicos, químicos e biológicos. Alguns dos processos físicos que contribuem para a eliminação e/ou redução da contaminação de DON incluem a moagem (ZHANG; WANG, 2014), cozimento (FARAHANY; JINAP, 2011), micro-ondas por plasma (PARK et al., 2007), fritura (SAMAR et al., 2007), extrusão (CAZZANIGA et al., 2001) e uso de

adsorventes (KONG; SHIN; KIM, 2014). Os processos químicos seguem as reações de transformação de tricotecenos, tais como alcalinização, oxidação, redução, hidrólise, hidratação e conjugação (HE et al., 2010).

O processo de degradação biológica, também conhecido como biorremediação, envolve a exploração da atividade biológica de micro-organismos ou enzimas por migração ou eliminação de efeitos nocivos causados por poluentes ambientais (LORENZO, 2008). Este processo apresenta vantagens como especificidade do produto, levando à diminuição da toxicidade ou a produtos não tóxicos; atuação em condições moderadas de reação, tais como pH próximo ao neutro e temperaturas brandas; e viabilidade de aplicação na indústria de alimentos e rações. Além disso, o uso de agentes biológicos causa menor efeito nas propriedades finais nas matrizes onde se encontra o contaminante, em comparação aos de processos químicos e físicos (HE et al., 2010).

A habilidade de bactérias ácido-láticas e propiônicas em remover DON e outras toxinas produzidas por *Fusarium* de meio de cultura contaminado foi investigada por Niderkorn, Boudra e Morgavi (2006). O estudo revelou que as bactérias ácido-láticas se mostraram mais eficientes na remoção de DON, sendo esta superior a 55%. He et al. (2008) estudaram a capacidade de biotransformação do DON por *Aspergillus tubinigenis*, e obtiveram como resposta a taxa de 94,4% de transformação após duas semanas de cultivo. Garda-Buffon e Furlong (2010) avaliaram a cinética de degradação do DON por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* em fermentação submersa. Os autores constataram que a espécie *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus oryzae* foram responsáveis pela diminuição de 90% e 74% da concentração da micotoxina em 240 h e 96 h, respectivamente. Garda et al. (2005) verificaram a redução dos níveis de tricotecenos empregando malte contaminado artificialmente com DON e toxina T-2. Após 120 h de fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, 47% da contaminação inicial de DON e 46% para toxina T-2 foram detectadas na porção líquida e sólida.

Conforme Karlovsky (1999), os métodos biológicos envolvendo o uso de enzimas oferecem especificidade e eficiência, além de não ser prejudicial ao meio ambiente. O emprego de enzimas, de origem vegetal ou microbiana, na degradação ou redução dos níveis de micotoxinas, se mostra como alternativa aos métodos tradicionalmente utilizados para este fim. Enzimas como lacase de *Trametes versicolor* e carboxipeptidase de *Rhizopus oryza* foram empregadas na redução dos níveis das micotoxinas ocratoxina A e zearalenona, respectivamente (KUPSKI et al., 2013; BANU; LUPU; APRODU, 2013). Das e Mishra (2000) estudaram a degradação *in vitro* de aflatoxina B1 pela ação de peroxidase extraída de

raízes de rabanete. Os percentuais de degradação obtidos foram comparados com os da peroxidase comercial, sendo estes valores de 33,7% e 54,7%, respectivamente. Nora (2015) avaliou o efeito de peroxidase comercial e da peroxidase extraída de farelo de arroz na redução dos níveis de ocratoxina A. O autor obteve redução de ocratoxina A de 59% para a peroxidase comercial e de 41% para a peroxidase de farelo de arroz, utilizando atividade enzimática de 0,063 U/mL no meio reacional.

Garda-Buffon, Kupski e Furlong (2011) correlacionaram a degradação de DON e o aumento da atividade enzimática da peroxidase produzida por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae*. A degradação de DON foi atribuída à ação oxidativa da peroxidase sobre o grupamento epóxido presente na estrutura da micotoxina, resultando na perda da sua toxicidade. Feltrin (2013) obteve 55% de redução nos níveis de DON pela ação de peroxidase comercial em sistema modelo, após 1h de reação. No entanto, o autor verificou que a concentração inicial de DON aumentou em 3 h de reação, evidenciando que a redução pode ocorrer por adsorção ou formação de um composto de degradação de mesma massa molecular do DON.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

**PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA
EM LEITO EXPANDIDO: ESTUDO DO PROCESSO**

PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO: ESTUDO DO PROCESSO

RESUMO

As peroxidases são enzimas capazes de catalisar reações de óxido-redução de substratos orgânicos. Estas enzimas possuem diversas aplicações e, dependendo da sua finalidade, é necessário que as mesmas sejam submetidas ao processo de purificação. Dentre as técnicas existentes destaca-se a cromatografia de troca iônica (CTI) em coluna de leito expandido, a qual oferece vantagens como maior produtividade de processo, maior interação entre a matriz adsorvente e a molécula de interesse, e possibilidade de aumento de escala. Este trabalho teve como objetivo avaliar os principais parâmetros das etapas de adsorção, lavagem e eluição para a purificação de peroxidase por CTI em leito expandido. Como resultados, o uso do tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5 e grau de expansão de 2,5 se mostraram as condições mais adequadas para a adsorção de peroxidase em trocador catiônico, apresentando capacidade de adsorção no equilíbrio (q^*) de 2,68 U/mL de resina e capacidade dinâmica de adsorção ($Q_{10\%}$) de 0,19 U/mL de resina. O uso do pH 5,5 na lavagem e a combinação da eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino de 0,15 a 1 mol/L de NaCl acrescido de 0,001 mol/L de CaCl_2 em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5, proporcionaram a purificação da peroxidase em 14,6 vezes com recuperação enzimática de 51,5%.

Palavras-chave: Farelo de arroz. Streamline™ SP. Oxidorredutases. Recuperação enzimática.

1 INTRODUÇÃO

As peroxidases (CE 1.11.1.X) são enzimas que catalisam a oxidação de diversos substratos orgânicos graças a vários peróxidos que atuam como receptores de elétrons (FAWAL et al., 2013). Essas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser obtidas a partir de vegetais (GALENDE et al., 2014), secreções de mamíferos (ATASEVER et al., 2013) e micro-organismos (ZENG et al., 2013). Em sua maioria, as peroxidases são consideradas heme proteínas que contêm em sua estrutura a protoporfirina IX de ferro III como grupo prostético, sendo as peroxidases de vegetais e micro-organismos divididas em três subclasses com base nas suas estruturas e propriedades catalíticas (CONESA et al., 2002; HIGARA et al., 2001; WELINDER et al., 2002).

A atividade das peroxidases está relacionada à presença de isoenzimas catiônicas e/ou aniônicas termolábeis e termorresistentes. As isoenzimas presentes em raiz forte, como o rabanete, são estudadas de forma mais intensa por apresentarem maior atividade. No entanto, estudos visando à obtenção de peroxidases a partir de resíduos ou subprodutos de vegetais tem se tornado cada vez mais frequente devido ao elevado custo das peroxidases comerciais. Alguns exemplos incluem o farelo de trigo (MANU; RAO, 2009), cascas de soja (STEEVENSZ et al., 2013), de laranja (VETAL; RATHOD, 2014), de tangerina (NOUREN et al., 2012) e de batata doce (MALONEY et al., 2012), e sementes de laranja e maçã (ZIA et al., 2011). O farelo de arroz, um coproduto do beneficiamento do arroz, contém inúmeras enzimas, dentre as quais se destacam as peroxidases, o que o torna uma fonte potencial para a obtenção dessas (LUH et al., 1991).

Inúmeras aplicações são atribuídas às peroxidases em áreas como biomédica, clínica, biotecnológica e industrial (SOMTÜRK; RAMAZAN; ÖZDEMIR, 2014), porém, dependendo do seu uso final, é necessário que as mesmas sejam submetidas a um processo de purificação. Técnicas de purificação têm sido empregadas obtenção de peroxidases mais puras, tais como precipitação por sais (KHARATMOL; PANDIT, 2012), solventes orgânicos (SINGH; PRAKASH; SHAH, 2012) ou polieletrólitos (VALETTI; PICÓ, 2013), ultrafiltração (LIU; YANG; CHEN, 2013), sistema aquoso bifásico (SRINIVAS; BARHATE; RAGHAVARAO, 2002), partição trifásica (VETAL; RATHOD, 2014) e processos cromatográficos em geral (GONG et al., 2015). No entanto, o emprego de técnicas de purificação, em sua maioria, visa a posterior caracterização enzimática, onde a prioridade é obter a enzima altamente purificada sem interesse no seu rendimento.

Recentemente, o uso da CTI em coluna de leito expandido se mostrou como alternativa na purificação de peroxidases através de um único processo, proporcionando a purificação da peroxidase em 2,4 vezes e recuperação dessas enzimas em até 41% (GAUTÉRIO et al., 2015). A CTI baseia-se na competição entre os íons de interesse, contaminantes e os contra íons de uma solução tampão pelos grupos carregados presentes em um trocador iônico, o qual pode ser catiônico ou aniônico. A CTI é uma das técnicas mais utilizadas na indústria biotecnológica para a separação de peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e biopolímeros relacionados, podendo ser operada em modo fixo ou em leito expandido (CUTLER, 2004; LEVISON, 2003; ROE, 2001).

A CTI em leito expandido é uma técnica em que proteínas de interesse podem ser purificadas a partir do extrato bruto ou previamente clarificado. Quando comparado com a cromatografia clássica em leito fixo, o processo em leito expandido utiliza adsorvente particulado com diferentes seletividades para expandir na coluna com a fase móvel fluindo no sentido ascendente, formando assim o leito expandido (XIA; LIN; YAO, 2007). A técnica permite integrar a separação sólido-líquido, a redução de volume pela ligação da proteína e a purificação parcial em um único processo, sem comprometer sua eficiência, porém economizando considerável tempo de operação e custos iniciais de investimento. Outras vantagens da técnica incluem o aumento da produtividade do processo e maior interação entre o adsorvente e a molécula alvo devido à expansão do leito (TOLEDO et al., 2007; TONG; DONG; SUN, 2002).

Técnicas cromatográficas são utilizadas com frequência na purificação de peroxidases extraídas de vegetais, entretanto, poucos são os relatos que abordam o estudo das melhores condições para execução destas. Considerando a ampla aplicabilidade da enzima e a necessidade de sua purificação para certos fins industriais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os principais parâmetros das etapas de adsorção, lavagem e eluição para a purificação de peroxidase por CTI em leito expandido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO CLARIFICADO DE PEROXIDASE

A matéria-prima utilizada para a extração da enzima peroxidase foi o farelo de arroz integral, obtido do beneficiamento do arroz branco, cedido gentilmente por uma

arrozeira da região sul do Rio Grande do Sul. O farelo foi acondicionado à temperatura de -18°C até a sua utilização.

A extração de peroxidase foi realizada a partir de farelo de arroz integral (granulometria inferior a 0,425 mm) e solução tamponante fosfato de sódio 0,040 mol/L em pH 5,0, na proporção 1:10, respectivamente. O extrato permaneceu sob agitação orbital a 100 rpm e 25°C , durante 60 min. Após, o extrato foi centrifugado ($3300\times g$) a 4°C por 10 min, e filtrado em sistema a vácuo, tendo-se assim o extrato clarificado de peroxidase (FELTRIN, 2013). Após sua obtenção, o extrato foi submetido à análise de atividade enzimática (U/mL) e proteína solúvel (mg/mL), e armazenado a temperatura de congelamento (-18°C) até sua utilização.

2.2 PURIFICAÇÃO DA PEROXIDASE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO

2.2.1 Sistema de purificação

O sistema de purificação por CTI em leito expandido consistiu na coluna Streamline™ 25 (2,5 cm de diâmetro interno x 100 cm de altura) e na resina de troca catiônica Streamline™ SP, ambos da marca GE Healthcare Life Science (Uppsala, Suécia). A resina Streamline™ SP possui o sulfopropil ($\text{O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{SO}_3$) como grupo funcional, sendo constituída de uma matriz macroporosa de agarose e núcleo de quartzo. Esta resina é constituída por partículas com densidade de 1,2 g/mL e tamanho entre 100 μm e 300 μm .

2.2.2 Efeito do pH e da solução tamponante na adsorção de peroxidase em resina de troca iônica

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer sob agitação orbital a 150 rpm e 25°C por 30 min. Nesse sistema, a resina de troca iônica, a solução tamponante e o extrato clarificado de peroxidase foram adicionados aos frascos na proporção 1:1:10, respectivamente. No início de cada experimento, a resina foi equilibrada com as seguintes soluções tamponantes: fosfato de sódio 0,025 mol/L em pH de 5,0 a 7,0; acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 3,5 a 5,5; e citrato-fosfato de sódio 0,025 mol/L em pH 3,5 a 7,0. O pH do extrato clarificado de peroxidase foi ajustado com solução 3 mol/L de NaOH ou HCl aos

valores a serem estudados. Ao término do ensaio, alíquotas foram coletadas e suas respectivas atividades enzimáticas (U/mL) foram determinadas [adaptado de GAUTÉRIO et al. (2014) e SALA et al. (2014)].

A capacidade de adsorção de peroxidase no equilíbrio (q^*) foi calculada conforme a Equação 1:

$$q^* = \frac{(A_0 \cdot V_{ex}) - (A_1 \cdot V_t)}{V_r} \quad (1)$$

Onde A_0 (U/mL) é a atividade enzimática inicial, A_1 (U/mL) é a atividade enzimática da peroxidase livre na fase líquida, V_{ex} (mL) é o volume de extrato enzimático, V_r (mL) é o volume de resina e V_t (mL) é o volume total de líquido adicionado ao Erlenmeyer.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Além disso, foi conduzido um ensaio controle, o qual consistiu na adição do extrato enzimático (previamente ajustado no pH de estudo) ao sistema em presença de solução tampão, porém sem a resina de troca iônica.

2.2.3 Determinação das curvas de ruptura em diferentes graus de expansão

A coluna contendo 10 cm de leito de resina (50 mL) foi equilibrada com solução tamponante acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5, de modo a obter os graus de expansão 2,0 (20 cm), 2,5 (25 cm) e 3,0 (30 cm). Logo após, o extrato clarificado de peroxidase ajustado em pH 4,5 e diluído 1:1 foi alimentado na velocidade estabelecida pelo comportamento hidrodinâmico para obtenção de cada grau de expansão, conforme Gautério et al. (2015). Em todos os experimentos, a atividade da peroxidase (U/mL) foi determinada na fração de alimentação e de saída da coluna (adaptado de KALIL; MAUGERI-FILHO; RODRIGUES, 2005).

Após o procedimento experimental, foi construído o gráfico da razão entre a atividade enzimática em determinado ponto (A) e a atividade enzimática inicial da amostra de entrada (A_0) *versus* o volume coletado. Posteriormente, a capacidade dinâmica de adsorção (Q) para $A/A_0 = 0,1$ foi determinada, a qual é dada pela Equação 2.

$$Q_{10\%} = \frac{A_0 \cdot (V_i - V_m) - \int_{V_m}^{V_i} A dV_{10\%}}{V_r} \quad (2)$$

Onde A_0 (U/mg) é a atividade enzimática inicial, A (U/mg) é a atividade enzimática na saída da coluna, V_i (mL) é o volume de extrato enzimático injetado na coluna, V_m (mL) é o volume morto do sistema e V_r (mL) é o volume de resina adicionado à coluna.

2.2.4 Determinação dos parâmetros para purificação de peroxidase

A purificação da peroxidase por CTI em leito expandido foi realizada conforme Gautério et al. (2015). A coluna Streamline™ 25 foi preenchida com 50 mL de resina, resultando em uma altura total de leito de 10 cm. A resina foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5 a uma velocidade de 270 cm/h em fluxo ascendente, proporcionando grau de expansão (GE) de 2,5 vezes (25 cm de leito). Em seguida, a alimentação do extrato clarificado de peroxidase diluído 1:1 e ajustado em pH 4,5 foi realizada em fluxo ascendente, mantendo-se o GE de 2,5.

A etapa de lavagem em modo expandido consistiu na passagem de tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pelo sistema até que a absorvância a 280 nm fosse menor que 0,05 e permanecesse constante. Na eluição, o adaptador foi movido até a posição 10 cm e essa foi feita em modo fixo e fluxo descendente a 100 cm/h. Sete ensaios de purificação foram realizados variando as condições de lavagem e eluição, conforme mostra a Tabela 3 no item 3.3, tendo como ensaio padrão a purificação realizada por Gautério et al. (2015). Tanto a eluição em modo degrau quanto linear foi realizada com quatro volumes de leito (200 mL).

Em todos os ensaios de purificação, frações foram coletadas na saída da coluna e submetidas à medição do volume (mL), atividade enzimática (U/mL), concentração de proteínas solúveis (mg/mL), leitura da absorvância à 280 nm e pH. A eficiência do processo foi determinada pelo cálculo do fator de purificação (FP) e recuperação enzimática (REC), conforme as Equações 3 e 4, respectivamente:

$$FP = \frac{A_{ep}}{A_{ei}} \quad (3)$$

Onde A_{ep} é a atividade específica (U/mg) do extrato enzimático purificado e A_{ei} é a atividade específica do extrato enzimático clarificado inicial.

$$REC (\%) = \frac{A_{tp}}{A_{ti}} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde A_{ip} é a atividade total (U) do extrato enzimático purificado e A_{ti} é a atividade total do extrato enzimático clarificado inicial.

2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.3.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada conforme Devaiah e Shetty (2009) com modificações. A 1 mL de extrato enzimático, foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,005 mol/L em pH 5,5, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de solução de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%. Logo após, a mistura reacional foi levada a um banho termostático, onde permaneceu por 20 min a 25°C. Ao término da reação, a transmitância foi lida em espectrofotômetro a 470 nm.

Para o cálculo da atividade enzimática, a equação de Schüttmann et al. (2014) foi utilizada. Esta equação (5) considera a absorvância a 470 nm, o volume total de reação (mL), o fator de diluição, o comprimento ótico da cubeta (cm), o volume de amostra adicionado (mL), o tempo total de reação (min) e a absorvidade molar do tetraguaicol (L/mol.cm). A absorvidade molar do tetraguaicol (ϵ) utilizada foi de 26600 L/mol.cm (NADAROGLU et al., 2013; VETAL; RATHOD, 2014).

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = \frac{\text{Abs. } V_{\text{reação}} \cdot \text{FD}}{\epsilon \cdot L \cdot V_{\text{amostra}} \cdot t_{\text{reação}}} \cdot 10^3 \quad (5)$$

Uma unidade da atividade da peroxidase (U) representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de guaiacol em 1 min, nas condições de ensaio. A atividade específica (U/mg) foi calculada pela razão entre a atividade da enzima (U/mL) e o teor de proteína solúveis (mg/mL). Todas as determinações foram realizadas em quadruplicada.

2.3.2 Concentração de proteínas

A concentração de proteína solúveis foi determinada segundo metodologia de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) como padrão. Todas as determinações de proteínas foram realizadas em quadruplicada.

2.4 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os ensaios realizados em triplicatas foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey através do software Statistica (Statsoft, EUA). A análise estatística foi realizada considerando um nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DO pH E DA SOLUÇÃO TAMPONANTE NA ADSORÇÃO DE PEROXIDASE

A fim de verificar a melhor condição de pH e solução tamponante na adsorção de peroxidase em resina de troca iônica, ensaios de adsorção foram realizados na faixa de pH de 3,0 a 7,5. A Tabela 1 apresenta os valores da capacidade de adsorção de peroxidase no equilíbrio (q^*), nas três condições de solução tamponante estudadas.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 1, é possível observar que, independente da solução tamponante utilizada, as capacidades de adsorção no equilíbrio tendem a ser maiores conforme a diminuição do pH. Apesar de não haver estudos sobre o ponto isoelétrico da peroxidase de farelo de arroz, a literatura relata que as peroxidases catiônicas de vegetais apresentam ponto isoelétrico acima do pH 8,0 (BOEUF et al., 2000; CARDINALI et al., 2007; DAS; SHARMA; MISHRA, 2011; MELO et al., 1997). Logo, valores de pH próximos ao do ponto isoelétrico (intervalo de 6,0 a 7,0) parecem não favorecer a adsorção da enzima em trocadores catiônicos, ao passo que valores de pH mais baixos possibilitam o processo de adsorção, uma vez que nestas condições a enzima apresenta carga líquida positiva.

Dentre todos os ensaios realizados, foi verificado maior valor de q^* em pH 4,5 para tampão citrato-fosfato de sódio 0,025 mol/L. No entanto, este resultado não se diferiu estatisticamente dos seguintes ensaios: pH 4,0 e 5,0 para tampão citrato-fosfato de sódio 0,025 mol/L; e pH 4,0 e 4,5 para tampão acetato de sódio 0,025 mol/L. Diversos trabalhos da área científica utilizam a cromatografia de troca iônica na purificação de peroxidases catiônicas; esses, por sua vez, mencionam o uso de tampão acetato de baixa molaridade e em valores de pH entre 4,0 e 5,0, tanto no processo de equilíbrio da resina como nas etapas de lavagem e eluição (BALASUBRAMANIAN; BOOPATHY, 2013; BOEUF et al., 2000; CIVELLO et al., 1995; DAS; SHARMA; MISHRA, 2011; LÓPEZ-MOLINA et al., 2003;

ONSA et al., 2004; SESTO; HUUSTEE, 1989). Por outro lado, Gautério et al. (2015) verificaram que o uso de tampão acetato em pH 4,0 não favoreceu a purificação da peroxidase de farelo de arroz por CTI em leito expandido, uma vez que a enzima desnaturou ao percorrer o leito em condições ácidas.

Tabela 1 - Valores de capacidade de adsorção de peroxidase no equilíbrio (q^*).

	pH	q^* (U/mL de resina)
Tampão fosfato de sódio	7,0	$0,57^i \pm 0,18$
	6,5	$1,33^{gh} \pm 0,05$
	6,0	$2,16^{def} \pm 0,06$
	5,5	$2,37^{cde} \pm 0,05$
	5,0	$2,63^{bc} \pm 0,04$
Tampão acetato de sódio	5,5	$2,24^{def} \pm 0,06$
	5,0	$2,63^{bc} \pm 0,02$
	4,5	$2,68^{abc} \pm 0,08$
	4,0	$2,68^{abc} \pm 0,16$
	3,5	$2,46^{cd} \pm 0,03$
Tampão citrato-fosfato de sódio	7,0	$1,12^h \pm 0,07$
	6,5	$1,64^g \pm 0,12$
	6,0	$2,07^{ef} \pm 0,16$
	5,5	$1,99^f \pm 0,15$
	5,0	$2,68^{abc} \pm 0,08$
	4,5	$3,00^a \pm 0,20$
	4,0	$2,87^{ab} \pm 0,06$
3,5	$2,44^{cd} \pm 0,03$	

*Média de três valores \pm desvio padrão. Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A condição mais ácida testada (pH 3,5) também contribuiu para a adsorção da peroxidase em resina de troca iônica. No entanto, foi verificada a diminuição da atividade enzimática em 22,8% durante o ajuste de pH do extrato bruto (o qual possuía pH acima de 6,0) para o pH 3,5. Considerando a própria queda inerente de pH durante a passagem do extrato enzimático pela coluna cromatográfica de leito expandido, o uso de solução tamponante com pH ácido pode colaborar ainda mais para a diminuição da atividade enzimática. Logo, a utilização tanto do tampão acetato de sódio quanto do citrato-fosfato de

sódio em pH 3,5 pode ser desfavorável na purificação de peroxidase por CTI em leito expandido. Assim, conforme os valores de q^* obtidos nos ensaios de adsorção, bem como os relatos da literatura acima mencionados, as condições de pH 4,5 para tampão acetato de sódio ou citrato-fosfato de sódio, e pH 5,0 para tampão citrato-fosfato de sódio, se mostram as mais favoráveis para adsorção de peroxidase em coluna de leito expandido.

Além do pH, outros fatores como força iônica, capacidade tamponante e íons presentes na solução tampão, são de extrema importância na escolha da fase móvel a ser utilizada em cromatografia de troca iônica. No caso da força iônica, recomenda-se a aplicação de solução tampão de baixa molaridade, de modo que esta não entre em competição com a solução proteica pelas cargas presentes no trocador iônico. A capacidade tamponante está relacionada com o valor de pK_a (logaritmo da constante de dissociação, K_a) que cada solução tampão possui, e recomenda-se que seu valor seja $\pm 0,5$ unidades em relação ao pH de trabalho, evitando oscilações de pH durante o processo de purificação. O pK_a da solução tampão fosfato é mais elevado ($pK_a = 7,0$) em comparação ao pK_a das soluções tampão de acetato e citrato-fosfato ($pK_a = 4,7$ para ambas) (JANSON, 2011; SCOPES, 1994). Assim, em processos que adotam pH de trabalho na faixa de 4,0 a 5,0, o uso de tampão fosfato como fase móvel é o menos indicado. Gautério et al. (2015), ao purificarem peroxidase de farelo de arroz por CTI em leito expandido, utilizaram tampão fosfato de sódio 0,025 mol/L em pH 5,0 ao longo de todo o processo. Os autores constataram a diminuição do pH em até 1,0 unidade durante a eluição da enzima adsorvida, bem como a oscilação do mesmo em até 0,5 unidades nas demais etapas. Logo, embora os valores de q^* em pH 5,0 tenham se mostrado estatisticamente iguais para as três soluções tamponantes estudadas, a utilização de tampão fosfato de sódio neste pH como fase móvel poderia conduzir a resultados desfavoráveis na etapa de eluição devido à grande variação de pH.

Os íons que compõem a solução tamponante também podem influenciar a purificação por cromatografia de troca iônica, principalmente no tempo de retenção da proteína alvo na coluna. De acordo com Kopaciewicz e Regnier (1983), a composição dos íons no tampão é tão importante quanto o pH na retenção e recuperação da proteína de interesse. Os autores verificaram que, para as três proteínas (quimiotripsinogênio, citocromo c e lisozima) aplicadas em coluna cromatográfica de troca catiônica, os ânions citrato provocaram maior retenção destas em relação aos ânions acetato e fosfato, durante o processo de eluição. Gooding e Schumuck (1984) verificaram que os ânions acetato proporcionaram menor tempo de retenção em coluna cromatográfica de troca catiônica das mesmas proteínas, quando comparado aos ânions fosfato. Com base nestas observações, a escolha do tampão

acetato como fase móvel na purificação de peroxidase por cromatografia de troca iônica pode facilitar o processo de eluição, contribuindo para maior recuperação da peroxidase no final do processo.

Diante de todas as discussões dispostas acima, ficou estabelecido que o processo de equilíbrio da resina de troca catiônica fosse realizado com tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5, e que este valor de pH fosse mantido durante a etapa de alimentação do extrato enzimático à coluna cromatográfica.

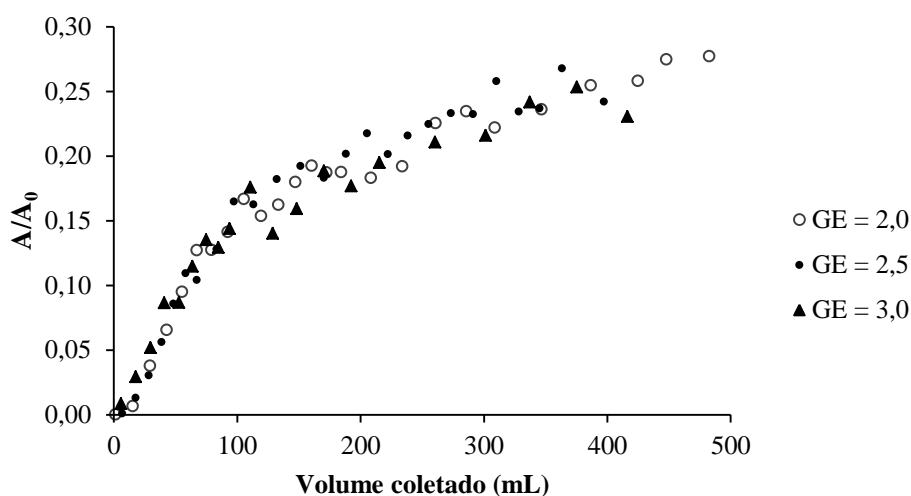
3.2 CURVAS DE RUPTURAS EM DIFERENTES GRAUS DE EXPANSÃO

De acordo com Jungbauer (2005), as curvas de rupturas servem como avaliação dinâmica do processo de adsorção. Estas curvas fornecem informações sobre as concentrações de ruptura e de exaustão, que são sugeridas como sendo 10 e 90% da concentração de entrada, respectivamente. De forma prática, a curva de ruptura serve como indicativo do volume que deve ser alimentado na coluna cromatográfica, de modo que não haja grande perda do composto durante a alimentação. Em colunas cromatográficas de leito expandido, o grau de expansão do leito influencia no formato da curva de ruptura e, por consequência, na capacidade de adsorção e no volume que deve ser alimentado à coluna.

No presente estudo, foram construídas três curvas de ruptura em diferentes graus de expansão, a fim de verificar o quanto estes influenciam na adsorção de peroxidase em resina de troca iônica. A Figura 1 dispõe das curvas de ruptura obtida em cada grau de expansão estudado, já considerando o volume morto do sistema, enquanto que os valores de $Q_{10\%}$ para as três condições estudadas estão dispostos na Tabela 2.

Conforme mostra a Tabela 2, o uso dos graus de expansão 2,5 e 3,0 proporcionaram maiores capacidades dinâmicas de adsorção da peroxidase em coluna de leito expandido. Este resultado indica que, para o caso específico da peroxidase, o maior tempo de interação entre enzima-adsorvente pode desfavorecer a posterior purificação da enzima devido à desnaturação da mesma durante sua passagem pela coluna. Apesar do grau de expansão 3,0 ter proporcionado $Q_{10\%}$ semelhante à obtida em grau de expansão 2,5, a operação da purificação nesta condição se torna difícil, visto que o leito apresenta certa instabilidade quando aplicada vazões mais elevadas.

Figura 1 - Curvas de ruptura para adsorção de peroxidase em resina de troca iônica nos graus de expansão de 2,0, 2,5 e 3,0, considerando o volume morto do sistema. Altura inicial do leito de 10 cm.



A = Atividade enzimática de peroxidase na saída da coluna;
 A_0 = Atividade enzimática inicial de peroxidase.

Tabela 2 – Valores de $Q_{10\%}$ obtidos a partir das curvas de ruptura nos graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0.

	GE = 2,0	GE = 2,5	GE = 3,0
Atividade inicial de peroxidase (U/mL)	0,14	0,15	0,16
$Q_{10\%}$ (U/mL de resina)	0,15	0,19	0,18

GE = Grau de expansão. $Q_{10\%}$ = Capacidade de adsorção para $A/A_0 = 0,10$.

Os valores de $Q_{10\%}$ para os graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0 representam 5,7%, 6,9% e 6,6%, respectivamente, da capacidade de adsorção no equilíbrio (q^* , 2,68 U/mL de resina) obtida nos ensaios de adsorção em resina de troca iônica (item 3.1), nas mesmas condições de tampão e pH. Os baixos valores obtidos para $Q_{10\%}$ podem estar relacionados à adsorção de contaminantes de carga oposta aos grupamentos carregados da resina de troca iônica, levando à dessorção da peroxidase. Du et al. (2013) obtiveram curvas de ruptura em três graus de expansão (2,0, 2,2 e 2,4) através da alimentação da coluna com solução de 1 mg/mL de lactoferrina. Os autores verificaram que a capacidade dinâmica de adsorção para $A/A_0 = 0,10$ foi cerca de 13,9% a 56,2% do correspondente valor de q^* , na mesma concentração de proteína. No estudo de Du et al. (2014), curvas de ruptura foram construídas em três diferentes graus de expansão (1,8, 2,0 e 2,2), a partir da alimentação da coluna com imunoglobulina G na concentração de 0,025 mg/mL. Os autores relataram que o valor de $Q_{10\%}$ foi cerca de 14,3% a 18,7% do correspondente q^* para a mesma concentração de

imunoglobulina G. Moraes et al. (2013) obtiveram curvas de ruptura nos graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0 através da alimentação da coluna com 1,5 mg/L de extrato bruto de C-ficocianina. O estudo revelou que, para os graus de expansão 2,0 e 2,5, os valores de $Q_{10\%}$ corresponderam a 29,3% e 20%, respectivamente, dos valores de $Q_{80\%}$ (saturação de 80%).

Com base nestas discussões, os valores de $Q_{10\%}$ obtidos neste trabalho apresentaram comportamento semelhante ao observado em outros trabalhos presentes na literatura científica, ficando estabelecido o uso do GE igual a 2,5 nos ensaios de purificação.

3.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

A purificação de peroxidase por CTI em leite expandido foi realizada por meio da variação dos principais parâmetros de lavagem e eluição, e o processo foi avaliado através do fator de purificação e da recuperação enzimática, conforme mostra a Tabela 3. Os ensaios foram realizados tendo a purificação de Gautério et al. (2015) como padrão, e utilizando o mesmo extrato enzimático. Os parâmetros estudados foram responsáveis por uma ampla variação na purificação da peroxidase, sendo que o fator de purificação variou de 1,2 a 14,6 vezes e a recuperação enzimática de 34,1 a 82,2%, demonstrando assim a importância da avaliação das etapas de lavagem e de eluição para maximização do processo.

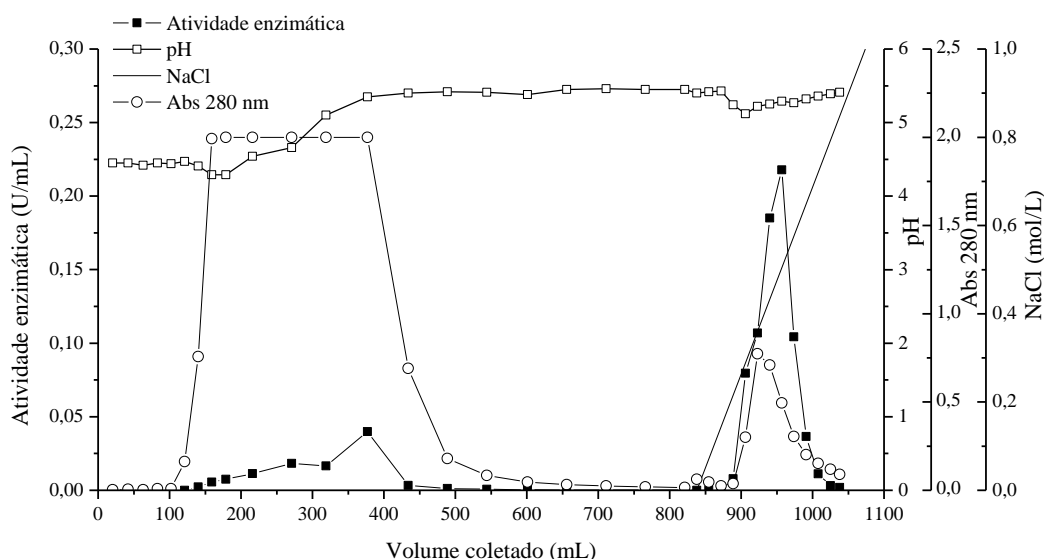
Conforme mostra a Tabela 3, o uso do pH 5,5 na lavagem proporcionou ambiente favorável para posterior recuperação da enzima, evitando a redução brusca do pH durante a eluição e refletindo em maiores valores de FP e REC. Os intervalos de pH durante a eluição se mantiveram entre 4,6 a 4,9 e 5,1 a 5,4 nos Ensaios 1 e 2, respectivamente, indicando que condições menos ácidas contribuem para maiores valores de FP e REC. Valores de pH acima de 5,5 não foram testados devido ao emprego da solução tamponante acetato de sódio, o qual não permite o alcance de pH superior a este.

Para a purificação de peroxidase por CTI em leite expandido, Gautério et al. (2015) utilizaram pH de 4,7 durante a eluição em modo gradiente, e obtiveram FP de 2,4 vezes e REC de 41%. Em ambos os Ensaios 1 e 2, foi possível obter maiores valores de FP e REC através do mesmo processo de purificação. A Figura 2 apresenta o cromatograma obtido no Ensaio 2.

Tabela 3 – Valores de FP e REC obtidos nos ensaios de purificação.

Ensaio	Modo de eluição	pH lavagem	Sal de eluição	pH eluição	FP (vezes)	REC (%)
1	Gradiente (0 a 1 mol/L)	5,0	NaCl	5,0	3,4	46,7
2	Gradiente (0 a 1 mol/L)	5,5	NaCl	5,5	4,8	50,6
3	Degrau (0,1 mol/L) e Gradiente (0,1 a 1 mol/L)	5,5	NaCl	5,5	9,4	45,1
4	Degrau (0,15 mol/L) e Gradiente (0,15 a 1 mol/L)	5,5	NaCl	5,5	13,7	43,4
5	Degrau (0,15 mol/L) e Gradiente (0,15 a 1 mol/L)	5,5	KCl	5,5	9,8	34,1
6	Degrau (0,15 mol/L) e Gradiente (0,15 a 1 mol/L)	5,5	CaCl ₂	5,5	1,2*	82,2
7	Degrau (0,15 mol/L) e Gradiente (0,15 a 1 mol/L)	5,5	NaCl acrescido de CaCl ₂ 0,001 mol/L	5,5	14,6	51,5

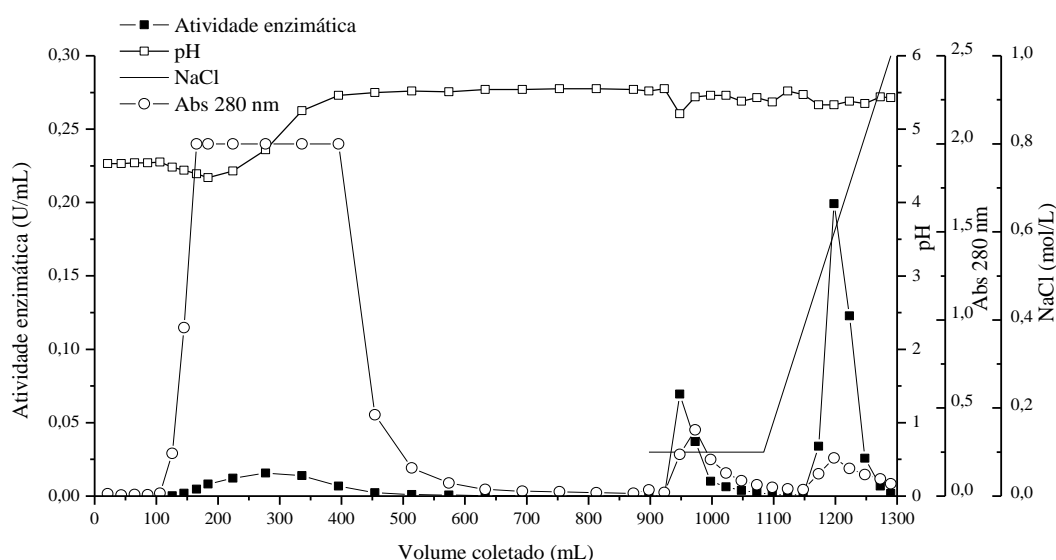
FP = Fator de purificação; REC = Recuperação enzimática. *As proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

Figura 2 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição gradiente linear salino 0-1mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 2).

De acordo com a Figura 2, o início da eluição tanto da peroxidase quanto de outras proteínas presentes no extrato enzimático ocorreu em baixas concentrações salinas (menores que 0,2 mol/L, no volume coletado próximo a 900 mL). A Figura 2 também mostra

que a eluição das proteínas contaminantes provoca a diminuição do pH do meio (volume coletado entre 850 e 950 mL), o que leva à desnaturação da peroxidase e, conseqüentemente, menor recuperação da mesma. Visando a separação dos picos de eluição das proteínas contaminantes e de interesse, bem como o aumento da eficiência do processo de purificação por CTI, ensaios de purificação utilizando a combinação da eluição dos tipos degrau e linear foram realizados, e os resultados são apresentados nas Figuras 3 e 4.

Figura 3 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,1 mol/L de NaCl e gradiente linear salino 0,1-1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 3).

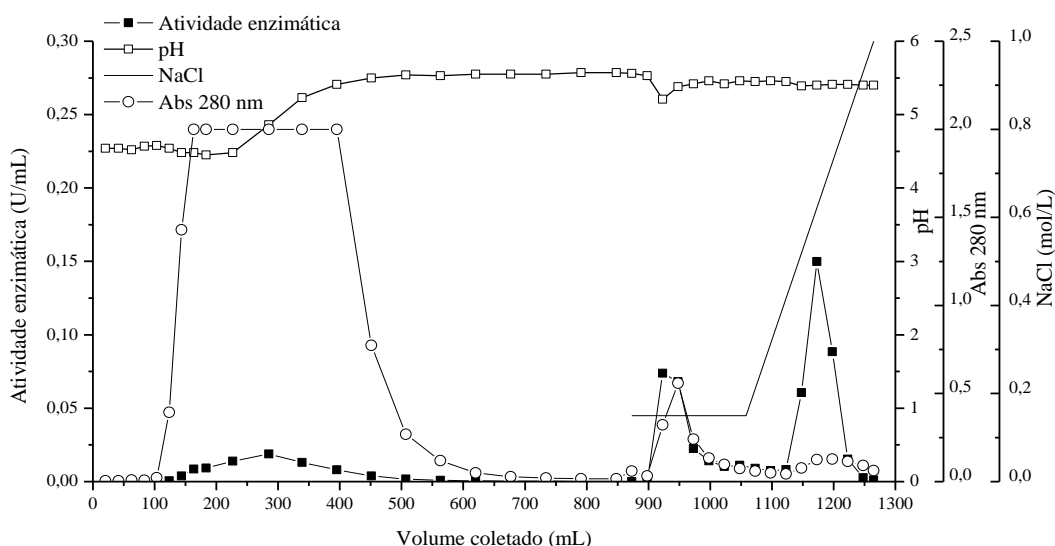


Segundo Moraes e Kalil (2009), a combinação da eluição dos tipos degrau e linear pode proporcionar a remoção de algumas proteínas contaminantes ligadas fracamente ao trocador iônico, levando à maior purificação da biomolécula de interesse. Braga, Lemes e Kalil (2014) também constataram que o uso desta combinação proporcionou maior FP na purificação da enzima β -galactosidase. De acordo com as Figuras 3 e 4, o uso da eluição do tipo degrau (volume coletado de 900 mL) proporcionou a separação dos picos das proteínas contaminantes e de interesse, o que não ocorria quando utilizado somente a eluição em modo linear. Os cromatogramas também mostram que a separação dos picos também evita possíveis desnaturações da enzima de interesse causada pela acidez do meio, já que não foi observada a queda de pH durante a eluição de grande parte das isoenzimas de peroxidases.

Os ensaios adicionados da eluição em modo degrau proporcionaram maior purificação da peroxidase, porém menor recuperação da mesma. Valores de FP e REC foram de 9,4 vezes e 45,1% para o Ensaio 3, enquanto que no Ensaio 4 estes valores corresponderam 13,7 vezes e 43,4%. A diminuição do percentual de REC nos Ensaio 3 e 4 em relação ao

Ensaio 2 pode estar associada com a eluição de algumas isoenzimas de peroxidase juntamente às demais proteínas presentes no extrato enzimático, já que ambas são capazes de eluir em baixas concentrações salinas. No entanto, o uso combinado da eluição dos tipos degrau e linear ainda se mostra vantajoso, pois proporcionou a eluição das proteínas contaminantes e posterior eluição de grande parte das isoenzimas de peroxidase, obtendo-se assim maiores valores de FP.

Figura 4 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino 0,15-1 mol/L de NaCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 4).



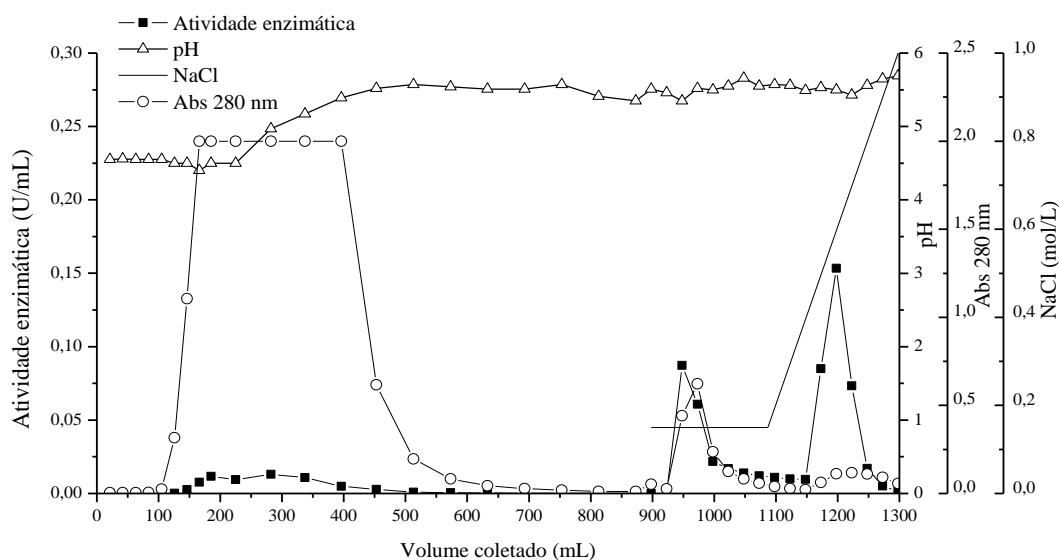
Em ambos os ensaios acrescidos da eluição em modo degrau, a eluição das isoenzimas de peroxidase na fase linear iniciou em concentrações salinas próximas a 0,4 mol/L (volume coletado de 1090 mL). Apesar da perda das isoenzimas de peroxidase durante a eluição do tipo degrau (volume coletado próximo a 880 mL) ter sido maior no Ensaio 4 (20,7%) do que no Ensaio 3 (14,3%), esta é compensada pelo aumento nos valores de FP sem afetar consideravelmente os percentuais de REC. Portanto, as condições de eluição utilizadas no Ensaio 4 se mostraram mais favoráveis à purificação de peroxidases, sendo esta adotada nos demais ensaios realizados.

No estudo prévio de purificação de peroxidases por CTI em leite expandido, Gautério et al. (2015) avaliaram alguns parâmetros relacionados à etapa de adsorção, porém mantiveram a eluição em modo gradiente. Valores de FP e REC inferiores aos demonstrados nos Ensaio 3 e 4, o que mostra a importância do uso combinado da eluição dos tipos degrau e linear sob a eficiência do processo de purificação de peroxidases.

Visando aumentar ainda mais a eficiência do processo de purificação, diferentes sais de eluição foram testados em substituição ao NaCl, o qual é comumente utilizado como eluente na cromatografia de troca iônica. Trabalhos na literatura científica (ALIJA; RAO, 2009; DEVAIAH; SHETTY, 2011; MANU; RAO, 2009) reportam que o cálcio desempenha efeito protetor às peroxidases da classe III, o que justifica a escolha do CaCl_2 como sal eluente. A escolha do KCl se deve tanto à sua posição na série de Hofmeister (1888) (efeito cosmotrópico) quanto ao seu uso como sal eluente na purificação de peroxidase em trabalhos anteriores (IKEHATA et al., 2005).

Conforme mostra a Tabela 3, a adição de íons cálcio em baixas concentrações (Ensaio 7) colaborou para a eficiência do processo de purificação, principalmente pelo aumento de 8% no valor da recuperação em relação ao Ensaio 4. No entanto, o uso do CaCl_2 em altas concentrações não surtiu o mesmo efeito protetor, provocando a eluição da peroxidase juntamente às demais proteínas contaminantes durante o modo degrau (volume coletado entre 880 e 1080 mL), afetando assim a purificação da enzima. As Figuras 5 e 6 apresentam os cromatogramas referentes aos Ensaio 6 e 7, respectivamente.

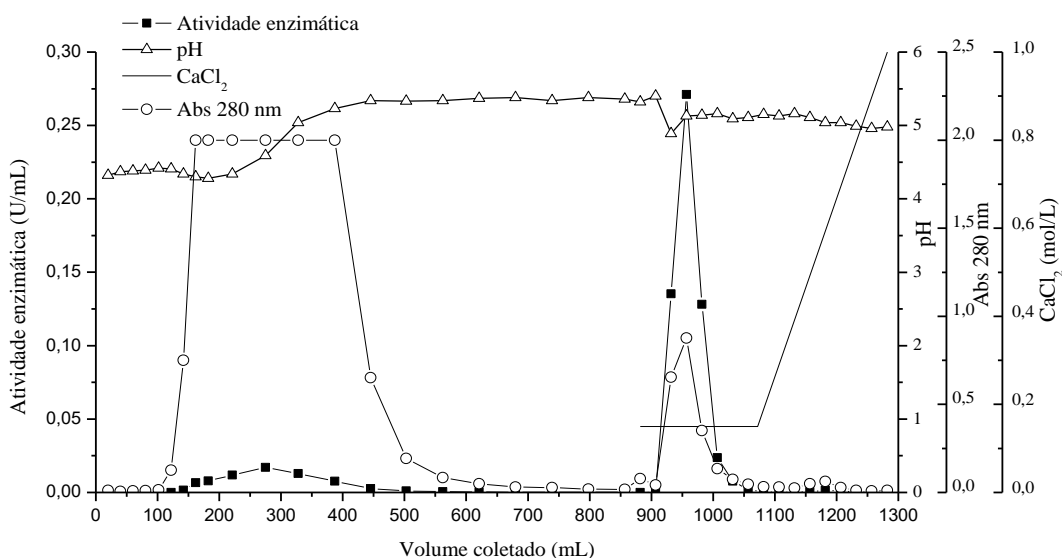
Figura 5 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino 0,15-1 mol/L de NaCl acrescido de 0,001 mol/L de CaCl_2 em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 7).



Segundo Devaiah e Shetty (2009), os níveis de cálcio em torno da peroxidase são importantes tanto para atividade da enzima quanto para manutenção da conformação do seu sítio ativo. Caso a concentração de íons cálcio seja baixa, a estrutura da peroxidase se desconfigura de modo que a porção heme pode ser perdida. Em termos de purificação, Manu

e Rao (2009) relataram que presença de íons cálcio em soluções tamponantes é capaz de aumentar a atividade específica e a recuperação enzimática, devido ao efeito estabilizante que estes íons desempenham sobre a estrutura da peroxidase. O trabalho desses autores foi tomado como base para a realização do Ensaio 7, uma vez que os mesmos utilizaram CaCl_2 em baixas concentrações na solução de eluição.

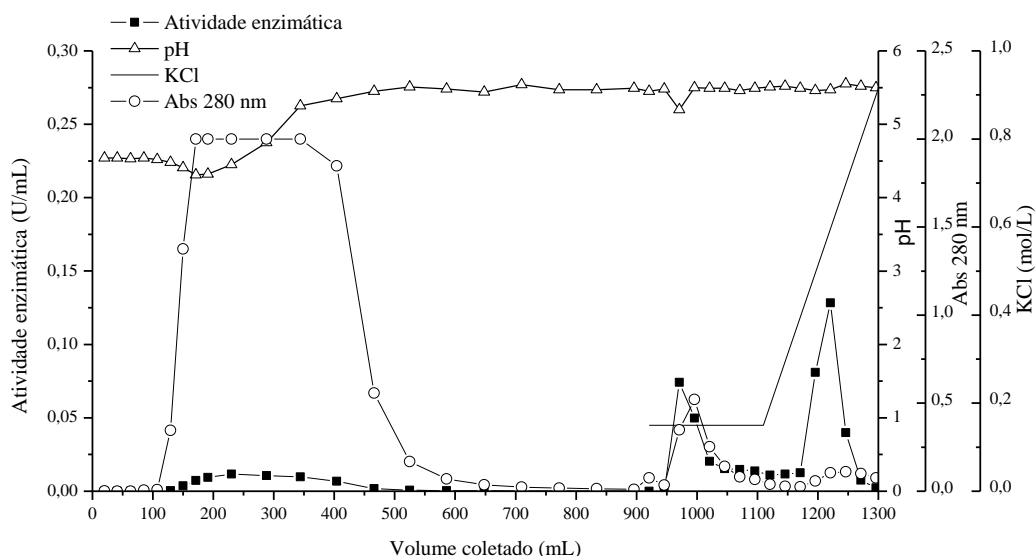
Figura 6 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de CaCl_2 e gradiente linear salino 0,15-1 mol/L de CaCl_2 em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 6).



De acordo com a série de Hofmeister (1888), cátions como o potássio e sódio estabilizam as interações intramoleculares das proteínas, o que pode elevar os parâmetros de eficiência do processo de purificação. Embora os íons potássio apresentem maior efeito cosmotrópico em relação aos íons sódio, esse não proporcionou a purificação e a recuperação da peroxidase em maior grau quando comparado ao ensaio utilizando NaCl como sal eluente. A Figura 7 apresenta o cromatograma obtido no Ensaio 5.

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, a CTI em leite expandido se mostrou uma técnica viável e promissora à purificação de peroxidases. A repetibilidade do processo de purificação foi avaliada através da realização do Ensaio 7 (melhor condição) em triplicata e com novo extrato clarificado de peroxidase. O processo resultou no FP médio de 14,1 ($\pm 1,3$) vezes e REC média de 49,8% ($\pm 2,5$), o que mostra pequena variabilidade nos resultados, indicando que o método de purificação nas condições avaliadas é repetível. Em termos de obtenção, o processo de purificação da peroxidase resultou, para cada g de farelo de arroz integral, 0,6 U de enzima purificada, valor este três vezes menor quando comparado ao extrato enzimático clarificado (2 U/g de farelo de arroz integral).

Figura 7 - Cromatograma da purificação de peroxidase: eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de KCl e gradiente linear salino 0,15-1mol/L de KCl em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5 (Ensaio 5).



São poucos os trabalhos relatados na literatura que utilizam uma única etapa cromatográfica para a purificação de biocompostos. No entanto, os resultados apresentados neste trabalho mostram que, através do estudo dos parâmetros que influenciam a CTI em leiteo expandido, é possível obter biocompostos mais puros sem o uso de procedimentos preliminares ou posteriores de purificação, o que pode reduzir custos e o tempo de processo, e simplificar a operacionalidade.

Balasubramanian e Boopathy (2013) purificaram peroxidase de água de coco através da associação de quatro técnicas, a saber: precipitação com sulfato de amônio (60% de saturação), cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Celulose, interação hidrofóbica e exclusão molecular em coluna. Considerando os resultados obtidos com a etapa de cromatografia de troca iônica, os autores obtiveram FP de 1,54 vezes e REC de 5,71%. López-Molina et al. (2003) utilizaram a mesma sequência de purificação dos autores citados anteriormente na purificação de peroxidases oriundas de flores de alcachofra. A purificação por cromatografia de troca catiônica em coluna Resource-S resultou em FP e REC de 54 vezes e 2,3%, respectivamente. Na purificação de peroxidases de folhas de espinafre, Köksal (2011) utilizou as técnicas de precipitação com sulfato de amônio (50-90% de saturação) e cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sephadex. O processo cromatográfico resultou na purificação a enzima em 22,6 vezes e recuperação de 4,2%. Com base no exposto acima, o presente estudo proporcionou a obtenção de peroxidases mais puras através de uma

única etapa cromatográfica, com FP ou REC superiores aos processos envolvendo múltiplos estágios de purificação.

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foram avaliados os principais parâmetros das etapas de adsorção, lavagem e eluição para a purificação de peroxidase por CTI em leito expandido. O uso do tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5 e grau de expansão de 2,5 se mostraram as condições mais adequadas para a adsorção de peroxidase em trocador catiônico, apresentando capacidade de adsorção no equilíbrio (q^*) de 2,68 U/mL de resina e capacidade dinâmica de adsorção ($Q_{10\%}$) de 0,19 U/mL de resina. O uso do pH 5,5 na lavagem e a combinação da eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino de 0,15 a 1 mol/L de NaCl acrescido de CaCl_2 em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5, proporcionaram a purificação da peroxidase em 14,6 vezes com recuperação enzimática de 51,5%.

A purificação de peroxidase obtida a partir de um coproduto da agroindústria através de uma única etapa cromatográfica se torna promissora frente à associação de técnicas normalmente utilizada para este fim. Adicionalmente, a determinação das condições mais favoráveis para cada etapa do processo de purificação facilita a posterior ampliação de escala, colaborando para a obtenção de peroxidases mais puras e com maior recuperação das mesmas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIJA, C. M.; RAO, U. J. S.P. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 36-44, 2009.

ATASEVER, A.; OZDEMIR, H.; GULCIN, I.; KUFREVIOGLU, I. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. **Food Chemistry**, v. 136, p. 864-870, 2013.

BALASUBRAMANIAN, M.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of *Cocos mucifera* (L.): biotransformation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 33-42, 2013.

BOEUF, G.; BAUW, G.; LEGRAND, B.; RAMBOUR, S. Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 217-224, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BRAGA, A. R. C.; LEMES, C. A.; KALIL, S. J. Single chromatographic step for β -galactosidase purification: influence of salt and elution parameters. **Separation Science and Technology**, v. 29, p. 1817-1834, 2014.

CARDINALI, A.; TURSI, N.; LIGORIO, A.; GIUFFRIDA, M.G.; NAPOLITANO, L.; CALIANDRO, R.; SERGIO, L.; DI VENERE, D.; LATTANZIO, V.; SONNANTE, G. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 395-403, 2011.

CIVELLO, P.M.; MARTINEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; ANON, M.C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2596-2601, 1995.

CONESA, A.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p.143-158, 2002.

CUTLER, P. **Protein purification protocols**. New Jersey: Humana Press, 2004.

DAS, M. K.; SHARMA, R. S.; MISHRA, V. A novel cationic peroxidase (VanPrx) from a hemi-parasitic plant (*Viscum angulatum*) of western ghats (India): purification, characterization and kinetic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 63-70, 2011.

DEVAIAH, S.P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.

DU, Q.; LIN, D.; ZHANG, Q.; YAO, S. An integrated expanded bed adsorption process for lactoferrin and immunoglobulin G purification from crude sweet whey. **Journal of Chromatography B**, v. 947-948, p. 201-207, 2014.

DU, Q.; LIN, D.; XIONG, Z.; YAO, S. One-step purification of lactoferrin from crude sweet whey using cation-exchange expanded bed adsorption. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 2693-2699, 2013.

FAWAL, N.; LI, Q.; SAVELLI, B.; BRETTE, M.; PASSAIA, G.; FABRE, M.; MATHÉ, C.; DUNAND, C. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 441-444, 2013.

FELTRIN, A. C. P. **Aplicação da peroxidase para a degradação de deoxinivalenol**. 2013.120 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

- GALENDE, P. P.; CUADRADO, N.H.; ARELLANO, J.B.; GAVILANES, F.; KOSTETSKY, E.Y.; ZHADAN, G. G.; VILLAR, E.; ROIG, M. G.; KENNEDY, J. F.; SHNYROY, V. L. Purification and structural stability of White Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 718-723, 2015.
- GAUTÉRIO, G. V.; FERNANDES, S. S.; MOLON, F. O.; FIGUEIRA, F. S.; BUFFON, J. G.; KALIL, S. J. Purification of peroxidase from rice bran using expanded-bed ion-exchange chromatography. **Adsorption Science and Technology**, v. 33, p. 153-164, 2015.
- GAUTÉRIO, G. V.; FERNANDES, S. S.; MOLON, F. O.; FIGUEIRA, F. S.; BUFFON, J. G.; KALIL, S. J. Adsorção da enzima peroxidase de farelo de arroz em resinas de troca iônica. In: Encontro Brasileiro sobre Adsorção, 10., Guarujá. **Anais...**Guarujá: Universidade Federal de São Paulo, 2014.
- GONG, Z.; LI, D.; LIU, C.; CHENG, A.; WANG, W. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chesnut kernel. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 1095-1099, 2015.
- GOODING, K. M.; SCHMUCK, M. N. Ion selectivity in the high-performance cation-exchange chromatography of proteins. **Journal of Chromatography**, v. 296, p. 321-328, 1984.
- HIGARA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 462-468, 2001.
- HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 24, p. 247-260, 1888.
- IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; PICKARD, M. A.; SMITH, D.W. Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenil treatment. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1758-1770, 2005.
- JANSON, J. **Protein purification : principles, high resolution methods, and application**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2011.
- JUNGBAUER, A. Chromatographic media for bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 3-12, 2005.
- KALIL, S. J.; MAUGERI-FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an intracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 581-586, 2005.
- KHARATMOL, P. P.; PANDIT, A. B. Extraction, partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves (*Brassica oleracea var. capitata*). **Journal of Biochemical Technology**, v. 4, p. 531-540, 2012.
- KÖKSAL, E. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): partial purification and some biochemical properties. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 135-139, 2011.

KOPACIENWICZ, W.; RJZGNIE, F.E. Mobile phase selection for the high-performance ion-exchange chromatography of proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 133, p. 251-259, 1983.

LEVISON, P. R. Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 17-33, 2003.

LIU, J.; YANG, B.; CHEN, C. A novel membrane-based process to isolate peroxidase from horseradish roots: optimization of operating parameters. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p.251-257, 2013.

LÓPEZ-MOLINA, D.; HEERING, H.A.; SMULEVICH, G.; TUDELA, J.; THORNELEY, R. N. F.; CANOVAS, F. G.; RODRIGUEZ-LOPEZ, N. Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cybara scolymus* L. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 94, p. 243-254, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUH, B.; BARBERS, S.; BARBER, C. B. Rice bran: chemistry and technology. In: LUH, B.S. **Rice: utilization**. 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. cap. 14.

MALONEY, K. P.; TRUONG, V.; ALLEN, J.C. Susceptibility of sweet potato (*Ipomoea batatas*) peel proteins to digestive enzymes. **Food Science and Nutrition**, v. 2, p. 351-360, 2012.

MANU, B. T.; RAO, U. J. S. P. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 114, p. 66-71, 2009.

MELO, N.S.; LANSERV, E.; WELINDER, K.G.; FEVEREIRO, P.S. Characterization of two major cationic peroxidases suspension cultures of *Vaccinium myrtillus* from cell. **Plant Science**, v. 122, p. 1-10, 1997.

MORAES, C.C.; MAZUTTI, M.A.; MAUGERI, F.; KALIL, S.J. Modeling of ion exchange expanded-bed chromatography for the purification of C-phycoyanin. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 73-78, 2013.

MORAES, C.C.; KALIL, S.J. Strategy for a protein purification design using C-phycoyanin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5312-5317, 2009.

NADAROGLU, H.; CELEBI, N.; DEMIR, N.; DEMIR, Y. Purification and characterization of a plant peroxidase from rocket (*Eruca vesicaria* sbsp. *Sativa*) (Mill.) (syn. *E. sativa*) and effects of some chemicals on peroxidase activity *in vitro*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 2520-2528, 2013.

NOUREN, S.; BHATTI, H. N.; BHATTI, I. A.; ASGHER, M. Kinetic and thermal characterization of peroxidase from peels of *citrus reticulata* var. kinnow. **Journal of Animal and Plant Science**, v. 23, p. 430-435, 2013.

ONSA, G. H.; SAARI, N.; SELAMAT, J.; BAKAR, J. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. **Food Chemistry**, v. 85, p. 365-376, 2004.

ROE, S. **Protein Purification Techniques**. New York: Oxford University Press, 2001.

SALA, L.; FIGUEIRA, F. S.; CERVEIRA, G. P.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Kinetics and adsorption isotherm of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* on ion-exchange resins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 1013-1022, 2014.

SCHÜTTMANN, I.; BOUWS, H.; SZWEDA, R.T.; SZWEDA, M.; CZERMAK, P.; ZORN, H. Induction, characterization, and heterologous expression of a carotenoid degrading versatile peroxidase from *Pleurotus sapidus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 103, p. 79-84, 2014.

SCOPES, R.K. **Protein purification: principles and practice**. Bundoora: Springer, 1994.

SESTO, P. A.; HUYSTEE, R. B. Purification and yield of a cationic peroxidase from a peanut suspension cell culture. **Plant Science**, v. 61, p. 163-168, 1989.

SINGH, P.; PRAKASH, R.; SHAH, K. Effect of organic solvents on peroxidases from rice and horseradish: prospects for enzyme based applications. **Talanta**, v. 97, p. 204-210, 2012.

SOMTÜRK, B.; KALIL, R.; ÖZDEMİR, N. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by affinity chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 1815-1828, 2014.

SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of *Ipomoea* peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 1-6, 2002.

STEEVENSZ, A.; MADUR, S.; AL-ANSARI, M. M.; TAYLOR, K. E.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N. A simple lab-scale extraction of soybean hull peroxidase shows wide variation among cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 13-18, 2013.

TOLEDO, A. L.; SEVERO-JR, J. B.; SOUZA, R. R.; CAMPOS, E. S.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of α -amylases FORILASE NTL from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 51-56, 2007.

TONG, X.; DONG, X.; SUN, Y. Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 117-124, 2002.

VALETTI, N.W.; PICÓ, G. A friendly method for *Raphanus sativus* L (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 119, p. 1-6, 2013.

VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 284-289, 2014.

WELINDER, K. G.; JUSTESEN, A. F.; KJAERGA, I. V. H.; JENSEN, R. B.; RASMUSSEN, S. K.; JESPERSEN, H. M.; DOROUX, L. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 6063-6081, 2002.

XIA, H. F.; LIN, D. G.; YAO, S. J. Evaluation of new high-density ion exchange adsorbents for expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1145, p. 58-66, 2007.

ZENG, G.; ZHAO, M.; HUANG, D.; LAI, C.; HUANG, C.; WEI, Z.; XU, P.; LI, N.; ZHANG, C.; LI, F.; CHENG, M. Purification and biochemical characterization of two extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for lignin biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 166-172, 2013.

ZIA, M.A.; KOUSAR, M.; AHMED, I.; IQBAL, H.M.N.; ABBAS, R.Z. Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 33, p. 6300-6303, 2011.

ARTIGO 2
PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE E SUA APLICAÇÃO NA REDUÇÃO DOS
NÍVEIS DE DEOXINIVALENOL EM SISTEMA MODELO

PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE E SUA APLICAÇÃO NA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE DEOXINIVALENOL EM SISTEMA MODELO

RESUMO

Peroxidases são enzimas que catalisam a oxidação de vários substratos orgânicos. Dentre as aplicações atribuídas às peroxidases ressalta-se o uso na redução dos níveis de deoxinivalenol (DON), uma micotoxina produzida principalmente por alguns fungos do gênero *Fusarium*. A purificação de peroxidases pode aumentar a capacidade destas enzimas em degradar certos substratos, o que torna interessante o estudo de técnicas que permitam obtê-las mais puras e com o maior rendimento possível. A cromatografia de troca iônica (CTI) em leito expandido se mostra como alternativa frente às técnicas cromatográficas existentes, e pode ser integrada à ultrafiltração (UF), de modo a purificar e concentrar a enzima de interesse. Este trabalho teve como objetivo integrar a CTI em leito expandido à UF para purificação de peroxidases, e aplicá-las na redução dos níveis de DON em sistema modelo. O uso de membrana de 10 kDa, temperatura de 10°C, seis ciclos de diafiltração, adição de CaCl₂ 0,004 mol/L à solução dialfiltrante e concentração da enzima ao final do processo, proporcionou os valores globais de fator de purificação e recuperação enzimática de 75,1 vezes e 22,8%, respectivamente. O perfil eletroforético da peroxidase purificada revelou a presença de duas possíveis isoenzimas de 35,6 kDa e 65,4 kDa. A aplicação da peroxidase purificada por CTI em leito expandido integrado à UF resultou na redução em 81,7% nos níveis de DON em sistema modelo.

Palavras-chave: Bioremediação. Diafiltração. Farelo de arroz. Streamline™ SP. Oxidorredutases. Micotoxinas.

1 INTRODUÇÃO

As peroxidases (CE 1.11.1.X) são enzimas que catalisam a oxidação de vários substratos orgânicos tendo o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora (MATHÉ et al., 2010). Em sua maioria, as peroxidases são consideradas heme proteínas de massa molecular entre 30 a 150 kDa, e que contêm em sua estrutura a protoporfirina IX de ferro III, a qual é responsável pela atividade catalítica (HAMID; REHMAN, 2009; WELINDER et al., 2002). Estas enzimas estão distribuídas em duas superfamílias - origem animal, e origem vegetal e microbiana -, onde as peroxidases de vegetais e micro-organismos são divididas em três subclasses de acordo com suas estruturas e propriedades catalíticas (HIGARA et al., 2001).

Embora as peroxidases estejam amplamente presentes na natureza, a principal fonte disponível comercialmente destas enzimas é a raiz forte (rabanete) (VALETTI; PICÓ, 2013). Devido ao elevado custo das peroxidases comerciais, estudos envolvendo a obtenção destas enzimas a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais, tais como folhas (JONGMEVASNA; YAIYEN; PRONOUSOONTORN, 2013) e cascas (STEEVENSZ et al., 2013) de alimentos, têm se tornado cada vez mais frequentes. O farelo de arroz, um coproduto do beneficiamento do arroz, contém inúmeras enzimas, dentre as quais se destacam as peroxidases, o que o torna uma fonte potencial para a obtenção destas (LUH et al., 1991).

Diversas aplicações são atribuídas às peroxidases nas áreas biomédica, clínica, biotecnológica e industrial (SOMTÜRK; RAMAZAN; ÖZDEMİR, 2014), sendo utilizadas principalmente na elaboração de ensaios imunoenzimáticos (MONTSERRAT et al., 2015), em *kits* de diagnóstico rápido (MUNIR; KHAN; PARK, 2015) e na remoção de corantes e compostos fenólicos de efluentes industriais (JIANG et al., 2014). Em razão da sua natureza oxidativa, as peroxidases podem ser aplicadas na degradação ou redução dos níveis de micotoxinas (GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011), as quais correspondem a diversos grupos de compostos produzidos por fungos em condição de estresse (MELLO; MACDONALD, 1997). O deoxinivalenol (DON) é uma micotoxina pertencente ao grupo dos tricotecenos produzida pelos fungos das espécies *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*, sendo sua ocorrência predominantemente relacionada aos cereais como trigo, cevada e milho (TÜRKER; GÜMÜS, 2009).

A necessidade de purificação prévia das peroxidases está fortemente relacionada com o seu uso final. Em geral, aplicações terapêuticas requerem alto grau de pureza da peroxidase, enquanto que certas aplicações industriais em larga escala permitem o uso do extrato enzimático bruto ou parcialmente purificado. As peroxidases têm sido purificadas a

partir de uma série de organismos incluindo bactérias (JAOUADI et al., 2014), fungos (KRAINER et al., 2014; ZENG et al., 2013) e plantas (GALENDE et al., 2015; SONKAR et al., 2015).

Dentre as técnicas aplicáveis à purificação de peroxidases se destaca a CTI, a qual se baseia na interação entre os íons presentes na fase móvel (molécula de interesse, contaminantes e solução tampão) e os grupos carregados presentes em um trocador iônico, o qual pode ser catiônico ou aniônico (CUTLER, 2004). A CTI pode ser operada em modo fixo ou expandido, onde este último consiste no uso de adsorventes particulados com diferentes seletividades, os quais residem em coluna cromatográfica. A operação em modo expandido permite a integração da separação sólido-líquido, o aumento da produtividade do processo, maior interação entre a matriz adsorvente e o composto de interesse, e a obtenção do produto purificado em grandes volumes (BUYEL; TWYMAN; FISCHER, 2015; LIN et al., 2013; TOLEDO et al., 2007; TONG; DONG; SUN, 2002).

Outra técnica utilizada tanto para concentrar como purificar peroxidases é a UF, a qual se baseia no princípio da permeação seletiva de solutos em membranas semipermeáveis, poliméricas ou inorgânicas, utilizando a pressão mecânica como força motriz para a transferência de massa através da membrana (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). No caso das peroxidases, a UF é frequentemente aplicada na concentração destas antes ou após o uso de técnicas cromatográficas (CHEN; CHUNG; CHANG, 2012; DAS; SHARMA; MISHRA, 2011; SRINIVAS; BARHATE; RAGHAVARAO 2002).

Um modo de operação da UF é a diafiltração (DF), a qual proporciona melhor separação e maior pureza do composto de interesse. Na DF, a alimentação é diluída com adição de solvente (água ou tampão) para reduzir a concentração de componentes permeáveis (sais e polímeros) e para removê-los, fazendo estes permearem através da membrana (WANG; ZHANG; OUYANG, 2002). Os processos de DF proporcionam vantagens como baixo consumo energético, seletividade, sistemas compactos e facilidade no aumento de escala (ZEMAN; ZYDNEY, 1996).

Apesar das técnicas cromatográficas serem utilizadas com frequência na obtenção de peroxidases puras, não há relatos na literatura que reportem a purificação destas enzimas por processos que integrem a CTI em leito expandido à UF, tampouco à aplicação de peroxidase em diferentes graus de purificação na redução dos níveis de micotoxinas. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo integrar a CTI em leito expandido à UF para purificação de peroxidases, e aplicá-las na redução dos níveis de DON em sistema modelo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO CLARIFICADO DE PEROXIDASE

A extração de peroxidase foi realizada a partir de farelo de arroz integral (granulometria inferior a 0,425 mm) e tampão fosfato de sódio 0,040 mol/L em pH 5,0, na proporção 1:10, respectivamente. O extrato permaneceu sob agitação orbital a 100 rpm e 25°C, durante 60 min. Após, o extrato foi centrifugado (3300xg) a 4°C por 10 min, e filtrado em sistema a vácuo, tendo-se assim o extrato clarificado de peroxidase (FELTRIN, 2013). O extrato foi submetido à análise de atividade enzimática (U/mL) e proteína solúvel (mg/mL), e armazenado à temperatura de congelamento (-18°C) até sua utilização.

2.2 PURIFICAÇÃO DA PEROXIDASE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO

A purificação da peroxidase por CTI em leito expandido foi realizada conforme Gautério et al. (2015) com modificações. A coluna Streamline™ 25 (2,5 cm de diâmetro interno x 100 cm de altura) foi preenchida com 50 mL de resina Streamline™ SP, resultando na altura total de leito de 10 cm (Figura 1). A resina foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5 a uma velocidade de 270 cm/h em fluxo ascendente, proporcionando grau de expansão de 2,5 vezes (25 cm de leito). Em seguida, a alimentação do extrato clarificado de peroxidase diluído 1:1 e ajustado em pH 4,5 foi realizada em fluxo ascendente, mantendo-se o GE de 2,5.

Figura 1 - Coluna cromatográfica utilizada na CTI em leito expandido.



A etapa de lavagem em modo expandido consistiu na passagem de tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 5,5 pelo sistema até que a absorvância a 280 nm fosse menor que 0,05 e permanecesse constante. Após a lavagem, o adaptador foi movido até a posição de 10 cm para a operação da eluição em modo fixo. A eluição foi realizada em fluxo descendente a 100 cm/h e em modo degrau 0,15 mol/L e gradiente linear de 0,15 a 1 mol/L de NaCl acrescido de 0,001 mol/L de CaCl_2 em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 5,5. Ao final do processo, as frações purificadas foram submetidas à medição do volume (mL), atividade enzimática (U/mL) e concentração de proteínas solúveis (mg/mL).

2.3 CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE POR ULTRAFILTRAÇÃO

2.3.1 Sistema de ultrafiltração

Para a purificação e concentração da peroxidase por UF, o módulo de membrana com configuração do tipo convencional (*dead-end*) foi utilizado, o qual possui volume útil de 160 mL e agitação promovida por barra magnética, sendo operado em modo descontínuo (Figura 2). O sistema foi operado com agitação constante e pressão de 1,5 kgf/cm² (manométrica). O gás utilizado para a operação foi o nitrogênio.

Figura 2 - Módulo de UF utilizado na purificação e concentração da enzima peroxidase.



2.3.2 Seleção da membrana

O uso de membranas de celulose regenerada (Milipore, Massachusetts, Estados Unidos) de 10 kDa e 30 kDa foi avaliado através de ensaios com adição de 40 mL de extrato

enzimático clarificado de peroxidase ao módulo de UF, sendo estes realizados à temperatura de 25°C e pressão de 1,5 kgf/cm². Os ensaios foram realizados para a escolha da membrana mais adequada ao processo, a qual permite a passagem de menor quantidade de enzima para o permeado. A atividade enzimática de peroxidase (U/mL) e a concentração de proteínas solúveis (mg/mL) foram determinados na fração de entrada, no retido sob a membrana e no permeado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A eficiência do processo de purificação e concentração da ultrafiltração foi determinada pelo cálculo do fator de purificação e recuperação enzimática (item 2.5). Além disso, a retenção e o fator de concentração do composto de interesse (atividade enzimática ou proteínas) foram determinados, conforme as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$\text{Retenção} = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) \quad (1)$$

Onde C_a e C_p correspondem a atividade enzimática total (U) ou proteína solúvel total (mg), nas frações de alimentação e permeada, respectivamente.

$$\text{Fator de concentração} = \left(\frac{X_r}{X_a}\right) \quad (2)$$

Onde X_a e X_r correspondem a atividade enzimática (U/mL) ou concentração de proteínas solúveis (mg/mL), nas frações de alimentação e retida, respectivamente.

O fator de concentração de volume foi calculado conforme mostra a Equação 3.

$$\text{Fator de concentração do volume} = \left(\frac{V_a}{V_r}\right) \quad (3)$$

Onde V_a e V_r correspondem ao volume alimentado (mL) e o volume da fração retida membrana (mL), respectivamente.

O percentual de rejeição da enzima pela membrana foi calculado conforme a Equação 4 (GOTTSCALK; BON; NOBREGA, 2008).

$$\text{Rejeição (\%)} = \left(1 - \frac{X_p}{X_r}\right) \cdot 100 \quad (4)$$

Onde X_p e X_r correspondem à atividade enzimática (U/mL) na fração permeada e retida, respectivamente.

2.4 INTEGRAÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO À ULTRAFILTRAÇÃO

2.4.1 Determinação do número de ciclos de diafiltração

Para determinar o número de ciclos necessários para a remoção completa e/ou parcial do NaCl foram realizados ensaios com solução salina 1 mol/L. O processo de UF foi operado no modo DF em unidade de bancada conforme descrito no item 2.3.1, utilizando membrana com massa molar limite de 10 kDa (Millipore™, celulose regenerada), pressão de 1,5 kgf/cm² e temperatura de 25°C. Ao módulo da membrana foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 1 mol/L e 20 mL de tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 5,5, representando dois diavolumes.

A cada ciclo foram permeados aproximadamente 20 mL, o processo foi interrompido e alimentado com tampão em volume igual ao volume permeado, e assim sucessivamente, até a completa/parcial remoção de NaCl. A remoção de NaCl foi acompanhada através da condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}$) na fração inicial e na fração permeada em cada ciclo, medida esta realizada em condutivímetro da marca Oakton. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4.2 Influência da temperatura no processo de diafiltração

A influência da temperatura na etapa de UF em modo DF foi avaliada através de ensaios realizados nas temperaturas de 10°C e 25°C. O processo foi operado em unidade de bancada conforme descrito no item 2.3.1 com membrana de massa molar limite de 10 kDa (Millipore™, celulose regenerada) e pressão de 1,5 kgf/cm². Ao módulo da membrana foram adicionados 10 mL de extrato purificado de peroxidase (fração oriunda da CTI em leito expandido) e 20 mL tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 5,5.

A cada ciclo foram permeados aproximadamente 20 mL, o processo foi interrompido e alimentado com tampão em volume igual ao volume permeado, e assim sucessivamente, até completar seis ciclos. A atividade enzimática (U/mL) e a concentração de proteínas solúveis (mg/mL) foram determinadas nas frações de entrada, permeado de cada

ciclo e retido. A eficiência do processo integrando as duas técnicas de purificação foi determinada pelo cálculo do fator de purificação e recuperação enzimática (item 2.5).

2.4.3 Influência da concentração de CaCl_2 no processo de diafiltração

A influência da CaCl_2 foi avaliada através da adição do sal em diferentes concentrações ao tampão de DF, conforme mostra a Tabela 1. Ao todo foram realizados seis ensaios associando a CTI em leito expandido à UF em modo DF, os quais foram realizados conforme citado no item 2.4.2 à 10°C . A atividade enzimática (U/mL) e a concentração de proteínas solúveis (mg/mL) foram determinadas nas frações de entrada, permeado de cada ciclo e retido. A eficiência do processo integrando as duas técnicas de purificação foi determinada pelo cálculo do fator de purificação e recuperação enzimática (item 2.5).

Tabela 1 – Integração da CTI em leito expandido à UF na purificação de peroxidase: uso de CaCl_2 ao tampão de DF.

Ensaio	Concentração de CaCl_2 (mol/L)
1	0,001
2	0,002
3	0,004
4	0,006
5	0,008
6	0,010

2.5 EFICIÊNCIA DO PROCESSO PURIFICAÇÃO

A eficiência do processo de purificação foi avaliada através do fator de purificação (FP) e da recuperação enzimática (REC), conforme mostra as Equações 5 e 6, respectivamente.

$$FP = \frac{A_e EP}{A_e EI} \quad (5)$$

Onde $A_e EP$ é a atividade específica (U/mg) do extrato enzimático purificado e $A_e EI$ é a atividade específica (U/mg) do extrato enzimático clarificado inicial.

$$\text{REC (\%)} = \frac{A_t \text{EP}}{A_t \text{EI}} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde $A_t \text{EP}$ é a atividade total (U) do extrato enzimático purificado e $A_t \text{EI}$ é a atividade total (U) do extrato enzimático clarificado inicial.

2.6 ELETROFORESE

A massa molecular e a confirmação da pureza dos extratos purificados por diferentes estratégias foram verificadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a qual foi realizada conforme o método de Laemmli (1970). Para análise das amostras com diferentes graus de purificação por eletroforese, soluções contendo 1 mg/mL de proteína foram preparadas, onde 75 μL destas soluções foram adicionados de 25 μL de tampão de desnaturação (tris HCl 0,15 mol/L pH 6,8, SDS 10%, 2- Mercaptoetanol 20%, bromofenol 0,02% e glicerol). Após, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100°C por 7 min.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas com miliamperagem fixada em 25 mA, 150 V por 2 h e 30 min. As concentrações do gel de separação e do gel de concentração foram de 12,5% e 3,8%, respectivamente. A quantidade de proteína aplicada em cada poço do gel foi a mesma tanto para o extrato bruto quanto para os extratos purificados. No gel também foi aplicado o marcador de baixa massa molar da GE Healthcare Life Science, que apresenta proteínas na faixa de 97 a 14,4 kDa (fosforilase b 97 kDa, albumina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 30 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa e α -Lactoalbumina 14,4 kDa). Ao final da eletroforese, as proteínas foram reveladas com nitrato de prata.

Para estimar a massa molecular da peroxidase, medidas manuais da migração total de proteínas e da distância percorrida pela enzima no gel foram realizadas, para posterior determinação do fator de retenção (R_f), conforme mostra a Equação 7.

$$R_f = \frac{D_e}{D_t} \quad (7)$$

Onde D_e e D_t representam a distância percorrida pela enzima (cm) e distância total de corrida (cm), respectivamente. A massa molecular da peroxidase foi estimada através

da equação da curva de correlação do logaritmo da massa molecular *versus* o fator de retenção.

2.7 APLICAÇÃO DE PEROXIDASE NA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE DEOXINIVALENOL

2.7.1 Determinação da concentração de deoxinivalenol

As condições cromatográficas utilizadas para a separação e quantificação de DON foram conforme as determinadas no trabalho de Feltrin (2015) para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção em 219 nm, utilizando a coluna cromatográfica Gemini™ C18 (250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno). Para tal, foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu™ (Quioto, Japão) constituído por sistema de bombas (modelo LC-AT), desgaseificador da fase móvel (modelo DGU), controlador (modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (modelo 7725i) e com sistema de detecção espectrofotométrico (modelo SPD-20A). O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution.

2.7.2 Redução dos níveis de deoxinivalenol em sistema modelo

Os ensaios de redução dos níveis de DON pela ação da enzima peroxidase foi realizada conforme Feltrin (2015), sendo conduzida segundo as condições ótimas de atividade da enzima peroxidase. O meio reacional foi constituído pelo padrão da micotoxina, tampão fosfato de sódio 0,005 mol/L em pH 5,5, peróxido de hidrogênio 0,08% e a peroxidase na sua forma bruta e purificada por diferentes estratégias. Testes preliminares foram realizados com a peroxidase purificada por CTI em leite expandido a fim de estabelecer a atividade enzimática que propiciasse maior redução dos níveis de DON, sendo testadas 0,001 U/mL, 0,005 U/mL e 0,01 U/mL, mantendo a concentração de DON em 1 µg/mL. Para os testes utilizando a peroxidase bruta e purificada por diferentes estratégias, a atividade enzimática utilizada no meio reacional foi de 0,01 U/mL. Todos os extratos enzimáticos utilizados nos ensaios foram previamente liofilizados, e o padrão de DON foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich™ (Missouri, Estados Unidos).

O ensaio de redução dos níveis de DON consistiu na adição de 75 µL de DON (equivalente a 1,08 µg) em frascos de vidro e posterior evaporação do solvente (benzeno). Em seguida, 750 µL tampão foram adicionados aos frascos e os mesmos foram submetidos à agitação em vórtex por 30 s e banho ultrassônico de 25 kHz por 3 min. Ao término da solubilização, 25 µL de peróxido de hidrogênio e 1 mL de extrato enzimático foram adicionados aos frascos, os quais permaneceram sob agitação orbital a 100 rpm e 25°C por 90 min.

Para a extração de DON do meio reacional, a técnica de extração por partição líquido-líquido foi realizada, a qual consistiu na adição de acetonitrila, seguido de agitação em vórtex por 30 s e banho ultrassônico de 25 kHz por 3 min. A fase orgânica foi retirada e o processo foi repetido três vezes. O volume final obtido foi seco em banho termostático a 75°C, e ressuspendido em acetonitrila para quantificação do DON por CLAE com detecção UV a 219 nm (FELTRIN, 2013). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O percentual de redução de DON foi determinado utilizando-se a Equação 8:

$$\text{Redução de DON (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{DON}_f}{\text{DON}_i} \cdot 100 \right) \quad (8)$$

Onde DON_f e DON_i representam a concentração final e inicial (µg/mL) de DON, respectivamente, calculadas de acordo com a curva analítica da micotoxina.

2.7.3 Avaliação do mecanismo de redução do deoxinivalenol em sistema modelo

De modo a avaliar a possibilidade de adsorção do DON pela peroxidase, ensaios adicionando a enzima previamente desnaturada ao meio reacional foram realizados. A desnaturação da peroxidase consistiu na submissão de uma solução enzimática (0,01 U/mL) à temperatura de 120°C por 1 h. Após, a solução foi transferida para banho de gelo e submetida à determinação da atividade enzimática. Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 2.7.2 e o percentual de adsorção foi calculado conforme a Equação 8.

2.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.8.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada conforme Devaiah e Shetty (2009) com modificações. A 1 mL de extrato enzimático, foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,005 mol/L em pH 5,5, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de solução de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%. Logo após, a mistura reacional foi levada a um banho termostático, onde permaneceu por 20 min a 25°C. Ao término da reação, a transmitância foi lida em espectrofotômetro a 470 nm.

Para o cálculo da atividade enzimática de peroxidase, a equação de Schüttmann et al. (2014) foi utilizada considerando o coeficiente de absorvidade do tetraguaiacol (ϵ) de 26600 L/mol.cm. Uma unidade da atividade da peroxidase (U) representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μ mol de guaiacol em 1 min, nas condições de ensaio. A atividade específica (U/mg de proteína) foi calculada pela razão da atividade da enzima (U/mL) e o teor de proteína solúveis (mg/mL). Todas as determinações foram realizadas em quadruplicada.

2.8.2 Concentração de proteínas

A concentração de proteína solúveis foi determinada segundo metodologia de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todas as determinações de proteínas foram realizadas em quadruplicada.

2.9 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ou teste t-Student, através do software Statistica™ (Statsoft, Tulsa, Estados Unidos). A análise estatística foi realizada considerando um nível de 95% ($p < 0,05$) ou 90% ($p < 0,10$) de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DA MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO

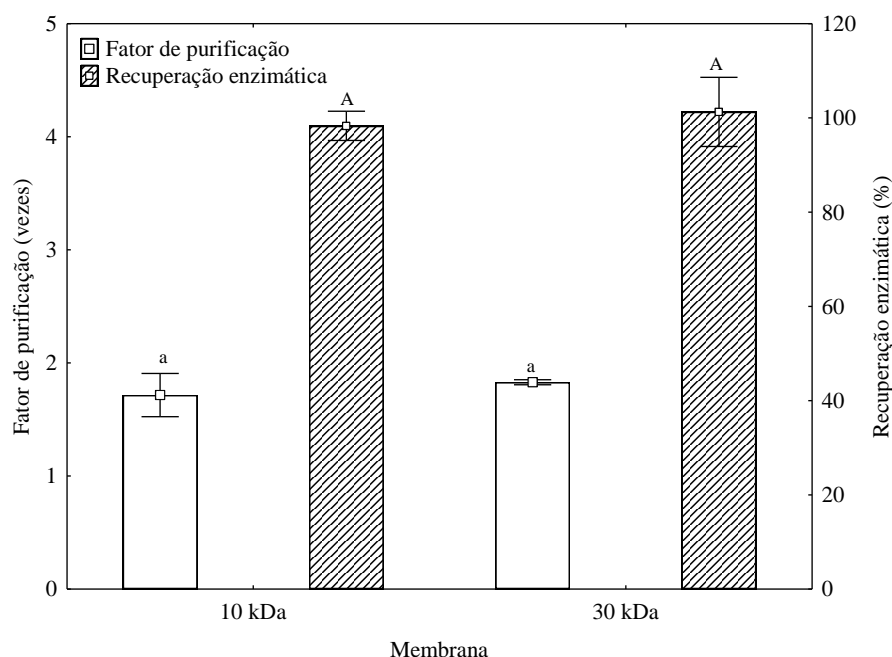
A fim de determinar a massa molar limite necessária à purificação de peroxidase por UF, ensaios com membranas de celulose regenerada de 10 kDa e 30 kDa foram realizados. Segundo Higara et al. (2001), as peroxidases extraídas de vegetais possuem massa molecular entre 28 kDa e 60 kDa. Além disso, estudos prévios realizados por Feltrin (2013) e Gautério et al. (2015) verificaram que a peroxidase extraída de farelo de arroz apresentou massa molecular próxima a 35 kDa, o que justifica a escolha das membranas no presente trabalho.

Parâmetros da UF como pH, pressão de operação e temperatura foram pré-estabelecidos levando em consideração as condições ótimas da peroxidase e estudos prévios de concentração de outras biomoléculas. O uso da pressão de 1,5 kgf/cm² tem como base os bons resultados apresentados na concentração de β -galactosidase (MOLON et al., 2011), queratinase (MACHADO et al., 2012) e C-ficocianina (MOLON et al., 2013) por UF. O uso da temperatura de 25°C e pH 5,5 têm como base as condições ótimas de peroxidase (FELTRIN, 2013).

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos para o fator de purificação (FP) e recuperação enzimática (REC) para ambas as membranas avaliadas. Não houve diferença significativa entre os parâmetros de eficiência de processo para as membranas em estudo. Os baixos valores de FP obtidos para as membranas de 10 kDa (1,7 vezes) e 30 kDa (1,8 vezes) podem estar relacionados ao fato das proteínas contaminantes do extrato clarificado possuírem massa molar semelhante à da enzima de interesse, ou ainda possuírem massa molar menor, mas serem retidas pela membrana dinâmica formada pela camada de proteínas retidas na superfície da membrana.

A Tabela 2 mostra os fatores de retenção e concentração para as membranas de 10 kDa e 30 kDa, os quais não diferem significativamente do ponto de vista estatístico. Para ambos os ensaios, o fator de retenção da atividade enzimática e o percentual de rejeição da enzima pela membrana foram próximos a 1 e a 100%, nesta ordem, indicando que a peroxidase foi retida sob ambas as membranas estudadas. Em relação aos valores obtidos para fator de concentração de atividade enzimática, proteína e volume, os ensaios realizados com ambas as membrana demonstram a eficiência do processo de UF, principalmente quando o intuito é concentrar o biocomposto de interesse após outras técnicas de purificação.

Figura 3 - Fator de purificação e recuperação de peroxidase expressos como valores médios com desvio padrão para as membranas de celulose regenerada de 10 kDa e 30 kDa.



Média de três valores \pm desvio padrão. Letras minúsculas iguais para o fator de purificação e letras maiúsculas iguais para a recuperação não diferem ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) pelo teste t-Student.

Tabela 2 – Fatores de retenção e concentração (atividade enzimática, proteínas e volume) e percentual de rejeição para as membranas de celulose regenerada de 10 kDa e 30 kDa.

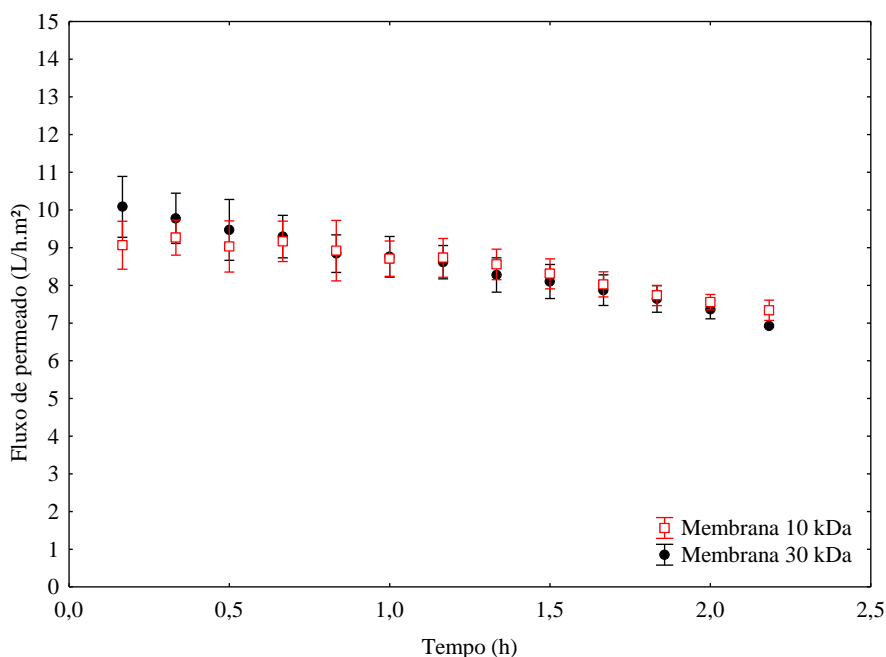
Membrana	Fator de retenção		Fator de concentração			Rejeição (%)
	Atividade enzimática	Proteínas	Atividade enzimática	Proteínas	Volume	
10 kDa	0,99 ^a \pm 0,01	0,61 ^a \pm 0,05	7,82 ^a \pm 1,08	4,60 ^a \pm 0,79	7,98 ^a \pm 1,35	99,9 \pm 0,08
30 kDa	0,99 ^a \pm 0,01	0,65 ^a \pm 0,04	6,92 ^a \pm 0,26	3,77 ^a \pm 0,19	6,83 ^a \pm 0,27	99,9 \pm 0,10

*Média de três valores \pm desvio padrão. Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

A Figura 4 apresenta o fluxo médio de permeado durante o processo de UF utilizando as membranas de 10 kDa e 30 kDa. Nas duas condições estudadas foi observada a queda do fluxo de permeado com o tempo de permeação, comportamento este típico dos fenômenos de polarização de concentração e de incrustação da membrana. Segundo Ghosh e Cui (2000), conforme a solução é concentrada, a concentração de proteínas na superfície da membrana se eleva, aumentando a camada polarizada. Dependendo da situação, pode ocorrer a formação de uma camada gel, a qual leva a uma maior queda do fluxo de permeado. Em membrana de 10 kDa, o fluxo médio variou entre 9,1 a 7,2 L/h.m², enquanto que em membrana de 30 kDa esta variação foi de 10,1 a 6,9 L/h.m². A redução do fluxo de permeado

para as membranas de 10 kDa e 30 kDa foi de 20,7% (desvio padrão de $\pm 3,9$) e 28,9% (desvio padrão de $\pm 1,6$), nesta ordem, os quais se diferiram estatisticamente pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

Figura 4 - Fluxo médio de permeado durante o processo de UF usando membranas de celulose regenerada de 10 kDa e 30 kDa.



Os trabalhos que mencionam o uso da UF na concentração de peroxidases de vegetais, em sua maioria, utilizam membranas de massa molar limite de 10 kDa, seja para concentrar o extrato bruto (ZENG et al., 2013) ou purificado por processos cromatográficos (CHEN; CHUNG; CHANG, 2012; DAS; SHARMA; MISHRA, 2011). No estudo de Gottschalk, Bon e Nobrega (2008), o uso da membrana de 10 kDa colaborou na concentração de lignina peroxidase, a qual proporcionou 90% de retenção da atividade enzimática, 99% de rejeição da enzima pela membrana e 74% de recuperação enzimática. Apesar das membranas não apresentarem diferença significativa na maioria dos seus parâmetros de avaliação, optou-se por utilizar a membrana de 10 kDa do decorrer do presente trabalho, em virtude da menor queda de fluxo apresentada por esta massa molar limite.

Al-Senaidy e Ismael (2011) utilizaram membrana de 10 kDa na concentração de extrato bruto de peroxidases de folhas de palma (*Phoenix dactylifera*), e obtiveram FP de 1,4 vezes e REC de 96%. Boer et al. (2006) utilizaram membrana de 10 kDa para concentrar manganês peroxidase por UF, e alcançaram valores de FP e REC de 1,4 vezes e 95,4%, respectivamente. Márquez et al. (2008) concentraram peroxidase de baunilha (*Vanilla*

planifolia) através do uso de membranas de 10 kDa em UF, e obtiveram como FP de 1,9 vezes e REC de 72,7%. Os resultados apresentados no presente trabalho se mostram coerentes com o observado na literatura em termos de FP e REC, o que torna a UF um processo possível de purificação parcial e concentração de peroxidases.

3.2 INTEGRAÇÃO DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO

3.2.1 Número de ciclos de diafiltração

Para estabelecer o número de ciclos de DF necessários à remoção do sal da fração purificada de peroxidase, ensaios com solução de NaCl 1 mol/L e tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 5,5 foram realizados. A escolha de uma solução de NaCl 1 mol/L se deve ao fato de que esta é a concentração salina máxima utilizada na etapa de eluição da CTI em leite expandido. O acompanhamento da remoção de sal foi realizado através da medição da condutividade elétrica, conforme mostra a Figura 5, visto que eletrólitos inorgânicos como NaCl apresentam esta propriedade. Trabalhos como de Wang, Zhang e Ouyang (2002) e de Baldasso, Barros e Tessaro (2011) também utilizaram a condutividade elétrica como indicativo da remoção de sais durante a DF.

A remoção de NaCl ocorreu durante os seis primeiros ciclos de DF e, logo após, a quantidade de sal no permeado permaneceu constante e na ordem de 1800 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Assim, ficou estabelecido que o processo de DF fosse operado ao longo de seis ciclos e cada ciclo com adição de dois diavolumes de tampão acetato de sódio 0,025 mol/L.

Para avaliar o comportamento da fração purificada de peroxidase durante o processo de separação por membrana, um ensaio acoplando os processos de CTI em leite expandido à DF foi realizado. A fração purificada foi diafiltrada com solução de acetato de sódio 0,025 mol/L por seis ciclos de DF. A Figura 6 apresenta o fluxo de permeado e os fatores de retenção da atividade enzimática e de proteína. Os fatores de retenção da atividade em todos os ciclos foram iguais a 1,0, indicando que não houve partição da enzima para o permeado. Os fatores de retenção de proteínas decresceram ao longo da DF e alcançaram valores na ordem de 0,36 nos dois últimos ciclos, evidenciando que o processo promoveu a purificação do biocomposto de interesse.

O fluxo de permeado aumentou ao longo do processo de DF, onde este aumento correspondeu a 25% no sexto ciclo em relação ao fluxo inicial. O aumento do fluxo pode estar relacionado ao seguinte fato: à medida que o NaCl permeia pela membrana, a concentração

deste na fração retida próximo à superfície da membrana diminui, levando ao aumento do fluxo. A condutividade elétrica também foi monitorada durante a DF, e alcançou valores constantes na ordem de 1800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ nos dois últimos ciclos, indicando que o uso de seis ciclos de DF foi suficiente para a remoção do NaCl.

Figura 5 - Acompanhamento da remoção de NaCl em cada ciclo de DF através da condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

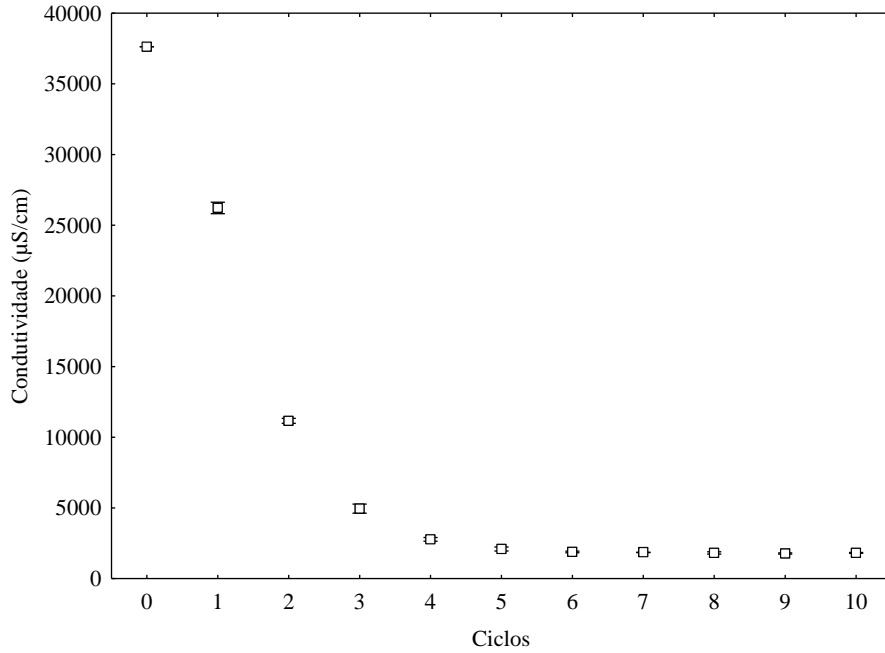
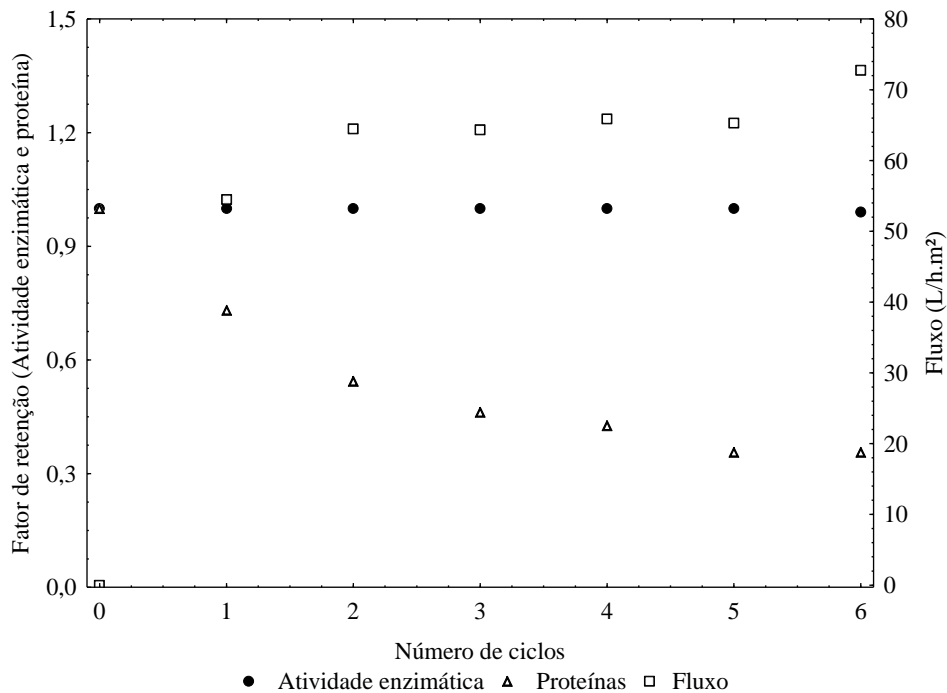


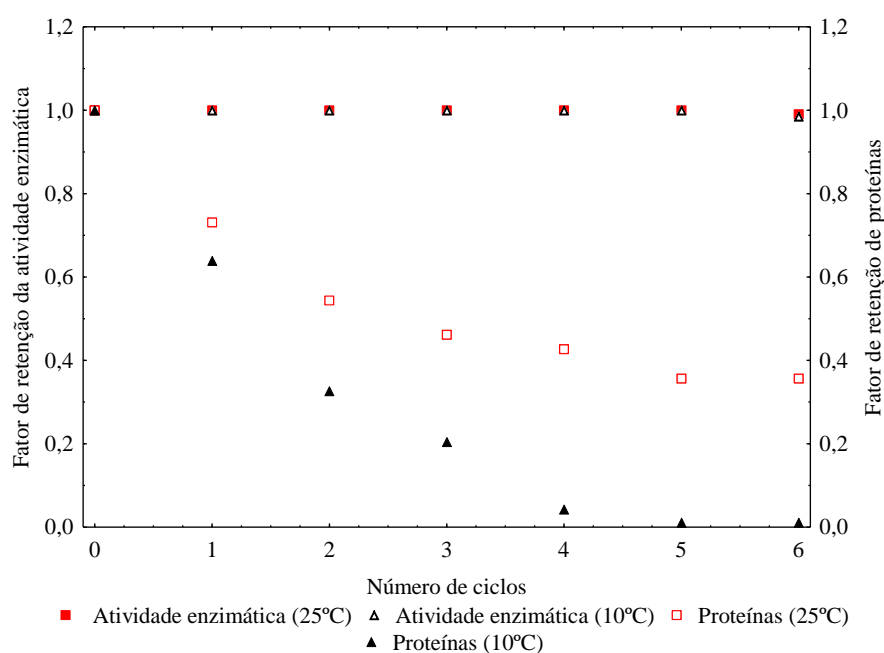
Figura 6 - Fluxo de permeado e fatores de retenção da atividade enzimática e de proteína.



3.2.2 Influência da temperatura e da concentração de CaCl_2 na diafiltração

A influência da temperatura foi avaliada através de ensaios associando a técnica de CTI em leito expandido à DF, os quais foram realizados a 10°C e 25°C. A Figura 7 apresenta os fatores de retenção de atividade enzimática e proteína para os ensaios realizados a diferentes temperaturas. O fator de retenção de proteínas diminuiu ao longo dos ciclos de DF em ambas as condições de temperatura, porém a queda foi mais abrupta no ensaio a 10°C, indicando que nesta temperatura a remoção das proteínas contaminantes foi mais eficiente. Os resultados de FP refletem a maior eficiência na purificação em temperaturas menores, visto que a 10°C a peroxidase foi purificada 3,4 vezes (etapa), enquanto que a 25°C o FP alcançou valores de 2,5 vezes (etapa). A integração das técnicas de CTI em leito expandido e DF resultaram nos valores de FP globais de 29,8 e 28,2 para as temperaturas de 10°C e 25°C, respectivamente.

Figura 7 - Fatores de retenção de atividade enzimática e proteína durante a DF realizada em diferentes temperaturas.

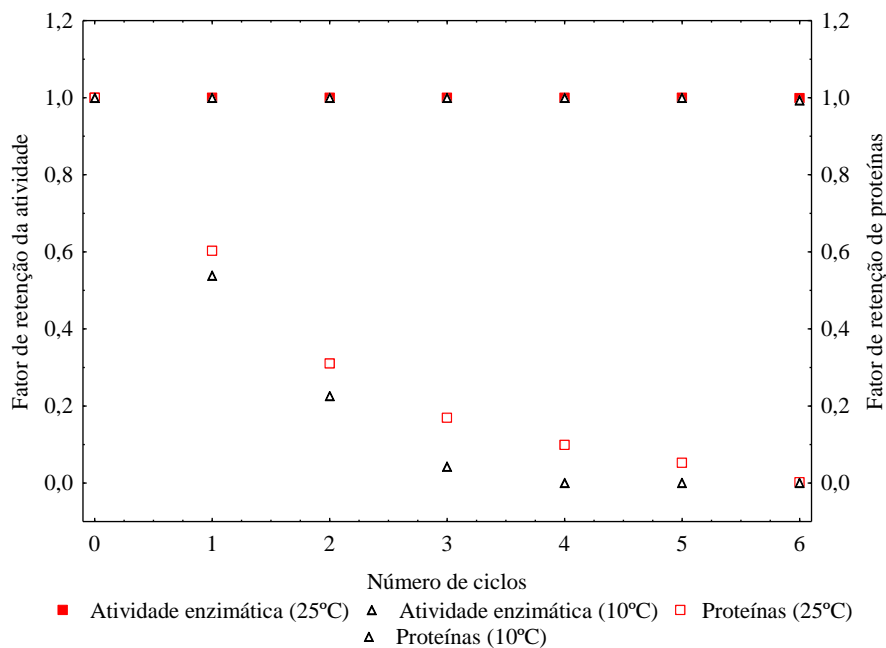


Para ambas as condições de temperatura, o fator de retenção da atividade enzimática foi igual a 1,0, o que mostra que não ocorreu perda da peroxidase para a fração permeada. No entanto, a REC na etapa de DF para dois ensaios foi baixa, compreendendo os valores de 42,7% (10°C) e 49,7% (25°C), enquanto que as REC globais do processo de purificação foram de 14,7% (10°C) e 23,2% (25°C). Apesar do menor percentual de REC

obtido no ensaio a 10°C, este pode não estar relacionado com temperatura na qual a DF é realizada, mas sim com outro fator que leve à desnaturação da peroxidase.

Uma vez que a DF promove a remoção dos sais presente na fração purificada de peroxidase, parte do CaCl₂ adicionado na etapa de eluição da CTI em leito expandido também é removido, o que pode levar à desestabilização da enzima e, conseqüentemente, menor percentual de REC da mesma. Estudos prévios afirmam que as peroxidases pertencentes à classe III, por serem dependente de cálcio, perdem sua atividade enzimática na ausência deste íon (VEITCH, 2004). A fim de verificar se a concentração de CaCl₂ poderia influenciar na REC da etapa de DF, ensaios a temperatura de 10°C e 25°C adicionando CaCl₂ 0,001 mol/L na solução de DF foram realizados, e os resultados obtidos para os fatores de retenção da atividade enzimática e proteína são apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Fatores de retenção de atividade enzimática e proteína durante a DF acrescida de CaCl₂ 0,001 mol/L em diferentes temperaturas.



Assim como observado na Figura 7, o uso da temperatura de 10°C proporcionou maior partição das proteínas contaminantes para a fração permeada, o que reflete em maiores FP tanto na etapa de DF – 5,7 vezes (10°C) e 3,1 vezes (25°C) –, como no processo global de purificação – 62,5 vezes (10°C) e 35,0 vezes (25°C). O fator de retenção da atividade enzimática se manteve igual a 1,0 em ambos os ensaios, já que não houve partição da peroxidase para as frações permeadas em cada ciclo. Os percentuais de REC na etapa de DF

corresponderam a 57,3% (10°C) e 60,8% (25°C), valores estes superiores aos ensaios realizados sem a adição de CaCl₂ na solução de DF.

Uma vez que a REC na etapa de DF não foi praticamente afetada pela temperatura, os ensaios subsequentes foram realizados na temperatura de 10°C, já que a mesma proporcionou maior remoção das proteínas contaminantes e, por consequência, maior FP nos ensaios com ou sem adição de CaCl₂ na solução diafiltrante. Os resultados aqui apresentados mostram que a REC da etapa de DF é aumentada pela alimentação de CaCl₂ em cada ciclo, visto que íons cálcio desempenham efeito protetor à peroxidase. Com o intuito de elevar a REC da DF, ensaios variando a concentração de CaCl₂ na solução diafiltrante foram realizados, e os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Eficiência do processo e fatores de retenção da atividade enzimática e proteína na etapa de DF acrescida de CaCl₂ em diferentes concentrações. Ensaio realizado à 10°C.

Etapa	CaCl ₂ (mol/L)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação (vezes)	Recuperação enzimática (%)	Retenção atividade enzimática	Retenção proteínas
DF	Sem adição	1,3	3,4	42,7	0,99	0,01
	0,001	2,4	5,7	57,3	1,00	< 0,01
	0,002	3,0	4,7	73,7	0,99	< 0,01
	0,004	2,8	4,4	79,4	0,99	0,34
	0,006	2,3	3,5	80,2	1,00	0,17
	0,008	2,0	2,9	68,6	0,98	< 0,01
	0,010	1,6	2,5	74,0	0,97	< 0,01

*Atividade específica do extrato bruto: 0,05 U/mg;

*Atividade específica do extrato purificado por CTI: 0,55 U/mg.

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que o aumento da concentração de CaCl₂ na solução diafiltrante até 0,006 mol/L proporcionou maior recuperação da enzima de interesse, enquanto que nas concentrações máximas testadas o efeito foi contrário. O FP diminuiu conforme o aumento de CaCl₂, chegando a valores de 2,5 na máxima concentração utilizada (0,010 mol/L). Liu, Yang e Chen (2013) observaram que a adição de íons cálcio apresentou efeito positivo sobre a atividade específica de peroxidase de rabanete, no entanto, em concentrações de CaCl₂ superiores a 0,010 mol/L, houve o decréscimo da mesma.

Dentre os ensaios realizados, a concentração de CaCl₂ de 0,004 mol/L se mostrou a mais favorável a ser utilizada na DF, proporcionando elevados valores de FP e REC. A

integração dos processos de CTI em leite expandido e DF resultou em FP e REC globais de 51,6 vezes e 33,4%, respectivamente. O mesmo ensaio foi realizado em duplicata e concentrando a enzima após os seis ciclos de DF, e os resultados são apresentados na Tabela 4. A concentração da enzima após a realização dos seis ciclos causou a diminuição em 27% da REC na etapa, em relação ao ensaio realizado sem concentrar a enzima ao final da DF (REC = 79,4%). Esta diminuição na REC da etapa, provavelmente associada à saída de CaCl_2 durante a concentração da peroxidase, mostra o quão importante é a adição de íons cálcio para manter a estabilidade da enzima durante a purificação. O FP na etapa de UF em modo DF foi de 7,6 vezes (desvio médio de $\pm 0,1$), quase duas vezes maior em relação ao ensaio em que a peroxidase não foi concentrada (FP = 4,4).

Tabela 4 – Eficiência do processo de purificação de peroxidase por CTI em leite expandido integrado à UF/DF.

Fração	Atividade específica (U/mg)	FP (vezes)		REC (%)	
		Etapa	Global	Etapa	Global
Extrato bruto	0,05	1	-	100	-
CTI em leite expandido	0,55	10,4	-	44,2	-
UF/DF	4,05* \pm 0,04	7,6* \pm 0,1	75,1* \pm 0,7	52,2* \pm 1,3	22,8* \pm 0,6

*Média de dois valores \pm desvio médio.

O processo de UF em modo DF também apresentou os fatores de retenção da atividade enzimática e proteína de 0,97 e menor que 0,01, respectivamente, e percentual médio de rejeição da membrana de 94,4%, indicando que não houve perda da enzima para a fração permeada. Estes resultados reforçam a hipótese de que a diminuição da REC no processo de UF em modo DF está relacionada com a diminuição da concentração de íons cálcio, causando a desestabilização da peroxidase.

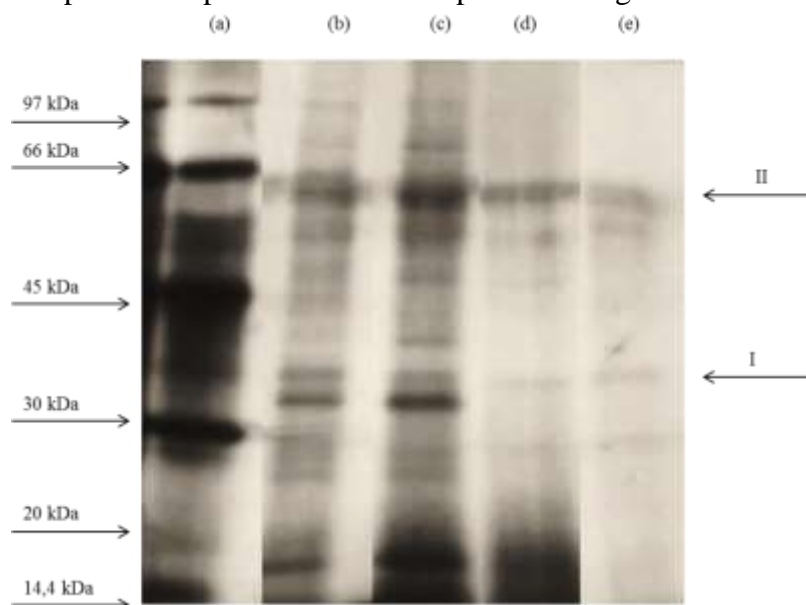
Apesar do baixo percentual de REC global (22,8%), o uso da CTI em leite expandido associado à UF se mostrou um processo aplicável para obtenção de peroxidases mais puras, proporcionando FP global de 75 vezes utilizando somente duas técnicas de purificação. Em termos de obtenção, o processo integrado de purificação da peroxidase resultou, para cada g de farelo de arroz integral, 0,3 U de enzima purificada. Cabe salientar

que não foram encontrados relatos na literatura que associem à CTI em leite expandido à UF na purificação de peroxidase.

3.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PEROXIDASE PURIFICADA

A Figura 9 apresenta o perfil eletroforético dos diferentes extratos enzimáticos de peroxidase de farelo de arroz. O uso da CTI em leite expandido tanto isolada quanto integrada à UF em modo DF permitiu a retirada de proteínas contaminantes de massa molecular superior e inferior a 66 kDa e 30 kDa, respectivamente. Os extratos bruto e purificado apresentaram duas bandas em comum (I e II), as quais podem indicar a existência de possíveis isoenzimas de peroxidase. Uma terceira banda com massa molecular menor que 30 kDa também foi observada nos extratos purificados, no entanto, esta não foi considerada como possível isoenzima de peroxidase. Isto se deve ao fato de que os ensaios com membrana de 30 kDa apresentaram fator de retenção da enzima próximo a 1, indicando que se houvessem isoenzimas de peroxidase menores que este tamanho, as mesmas apresentariam atividade na fração permeada, o que não foi observado.

Figura 9 - Eletroforese de peroxidase de farelo de arroz: (a) marcador molecular (b) extrato bruto (c) extrato ultrafiltrado (d) extrato purificado por CTI em leite expandido (e) extrato purificado por CTI em leite expandido integrado à UF.

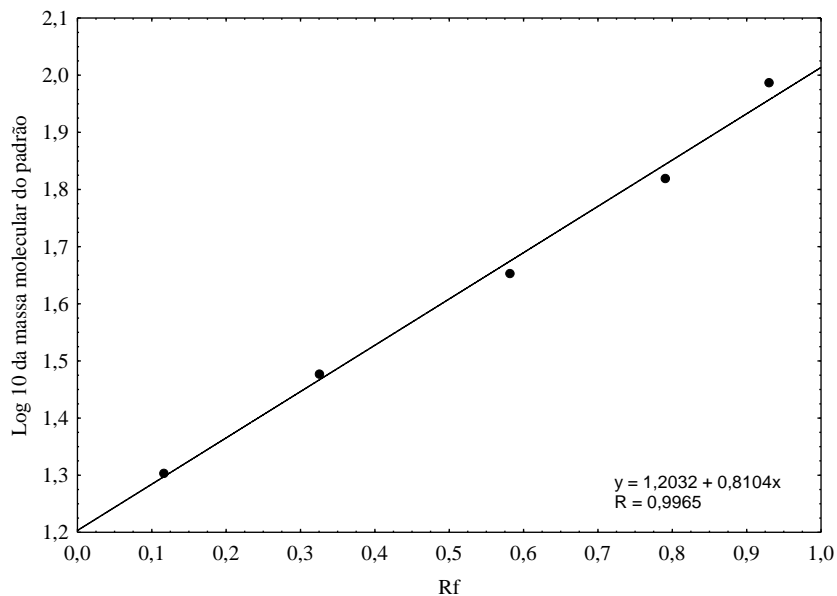


As massas moleculares das possíveis isoenzimas de peroxidase foram estimadas através da equação da curva de correlação apresentada na Figura 10, a qual apresentou linearidade dentro da faixa proposta pela ANVISA e INMETRO (RIBANI et al., 2004). As

massas moleculares encontradas para as isoenzimas de peroxidase foram de 35,6 kDa e 65,4 kDa.

Em geral, as peroxidases extraídas de vegetais possuem massa molecular entre 28 kDa e 60 kDa (HIGARA et al., 2001). Estudos prévios realizados por Feltrin (2013) e Gautério et al. (2015) mostraram que a peroxidase extraída de farelo de arroz apresentou massa molecular próxima a 35 kDa. Outros trabalhos, no entanto, reportam que peroxidases de vegetais podem apresentar massa molecular acima de 60 kDa, como as extraídas de *Brassica oleracea* (KHARATMOL; PANDIT, 2012; SOMTÜRK; KALIN; ÖZDEMIR, 2014), de *Raphanus sativus* (SISECIOGLU et al., 2010) e de *Leucaena leucocephala* (PANDEY; DWIVEDI, 2011). Desta forma, as massas moleculares estimadas para duas possíveis isoenzimas de peroxidase no presente trabalho se mostram de acordo com o observado na literatura.

Figura 10 - Curva de correlação entre o logaritmo da massa molecular e o fator de retenção no gel SDS-PAGE, para padrão molecular para peroxidase de farelo de arroz.



3.4 REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE DEOXINIVALENOL EM SISTEMA MODELO PELA AÇÃO DE PEROXIDASE BRUTA E PURIFICADA

A natureza oxidativa das peroxidases permite que estas sejam utilizadas para fins de biorremediação, substituindo às técnicas convencionais de oxidação. Existem trabalhos na literatura científica que mencionam a utilização de peroxidases na oxidação de compostos fenólicos (CHAGAS et al., 2015), corantes (VUJCIC et al., 2015) e de compostos voláteis

responsáveis por causar odores indesejáveis (PARKER et al., 2012), no entanto, são extremamente escassos os relatos do uso destas enzimas na redução dos níveis de micotoxinas.

Assim como nas aplicações citadas acima, o uso da peroxidase na redução dos níveis de micotoxinas explora a sua ação oxidativa sobre grupamentos doadores de elétrons. No caso específico do DON, a perda de sua toxicidade se dá principalmente pela quebra do anel epóxido. A peroxidase pode atuar sobre o anel epóxido presente na estrutura química da micotoxina, deepoxidando-a, o que resulta na perda da sua toxidade (GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011).

Como citado no item 2.7.2, testes preliminares foram realizados com a peroxidase purificada por CTI em leite expandido, variando a atividade enzimática e mantendo a concentração de DON fixa em 1 µg/mL. Os percentuais de redução de DON utilizando 0,001 U/mL, 0,005 U/mL e 0,01 U/mL foram de 11,9% (desvio médio de 4,6), 27,2% (desvio médio de 0,8) e 53,6% (desvio médio de 2,8), respectivamente. Os resultados mostram que o aumento na atividade enzimática de peroxidase elevaram os percentuais de redução de DON, e por este motivo, a condição de 0,01 U/mL foi estabelecida para as demais aplicações da enzima. Não foram testadas atividades enzimáticas mais elevadas da enzima, uma vez que a condição estabelecida já foi suficiente para reduzir os níveis de DON.

A Tabela 5 apresenta os percentuais de redução de DON após a aplicação da peroxidase na sua forma bruta e em diferentes graus de purificação. O uso da peroxidase purificada proporcionou maior redução dos níveis de DON em relação à peroxidase na sua forma bruta, o que mostra a importância dos processos de purificação para posterior aplicação da enzima. A fração mais purificada de peroxidase, oriunda da purificação por CTI em leite expandido integrado à UF/DF, apresentou diferença significativa em relação às demais frações, e resultou na redução em mais de 80% nos níveis de DON, ainda que utilizando baixa atividade enzimática no meio reacional (0,01 U/mL). A Figura 11 apresenta os cromatogramas de eluição do DON antes e após a ação da peroxidase purificada, onde é notável a diminuição do pico no tempo de retenção próximo a 5,3 (tempo de retenção da micotoxina).

A aplicação do extrato bruto e ultrafiltrado não apresentou diferença significativa na redução dos níveis de DON, fato este que pode ser explicado pelo baixo fator de purificação (1,7 vezes) da fração ultrafiltrada, uma vez que o processo em si não foi suficiente para retirar boa parte das proteínas contaminantes. O uso da peroxidase purificada por CTI em leite expandido se diferiu estatisticamente dos extratos bruto e ultrafiltrado, mostrando que a

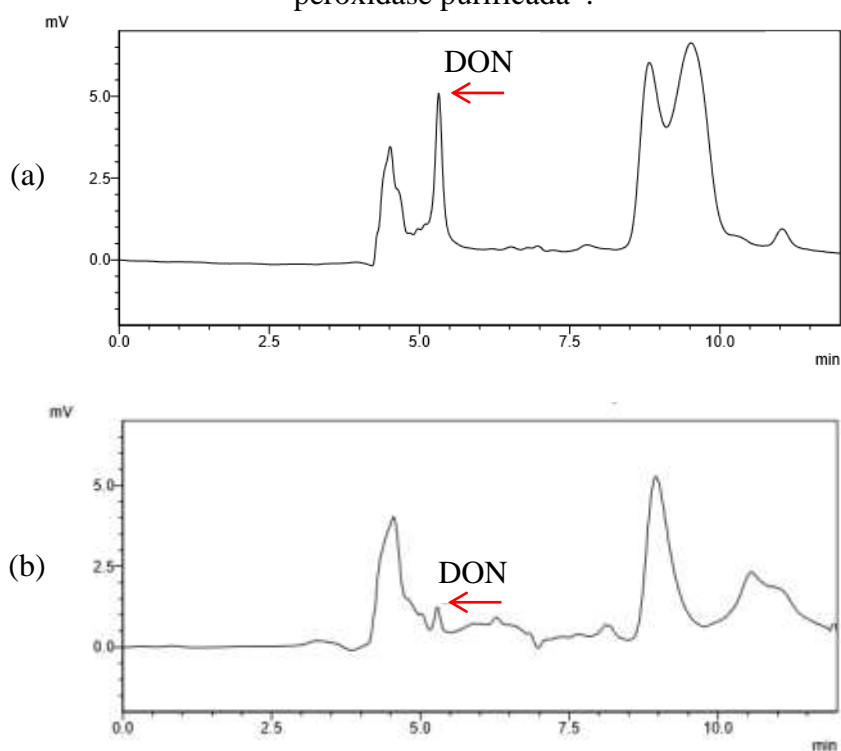
enzima purificada por uma única técnica foi capaz de reduzir os níveis de DON acima de 50%.

Tabela 5 – Percentuais de redução de DON pela ação de peroxidase bruta e purificada por diferentes estratégias.

Extrato de peroxidase	% Redução de DON
Bruto	43,1 ^c ± 0,1
Purificado por UF	40,5 ^c ± 7,6
Purificado por CTI em leite expandido	53,6 ^b ± 2,9
Purificado por CTI em leite expandido + UF	81,7 ^a ± 3,4

*Média de três valores ± desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,10$).

Figura 11 - Cromatograma de eluição do DON (a) antes e (b) após ação da enzima peroxidase purificada*.



*Peroxidase purificada por CTI em leite expandido integrado à UF/DF.

Uma vez que não foram realizados estudos que comprovem a modificação da estrutura do DON pela peroxidase, não se pode afirmar que a ação da enzima no DON se dá apenas por oxidação da sua estrutura. Além disso, as proteínas apresentam capacidade de adsorção devido à presença de grupos ativos na superfície proteica, fenômeno este que pode ocorrer em substituição à oxidação do DON. A possibilidade de adsorção do DON pela

peroxidase foi avaliada através da adição da enzima purificada previamente desnaturada ao meio reacional. O percentual de adsorção de DON apresentado para os extratos purificados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 – Percentuais de adsorção de DON pela ação de peroxidase purificada.

Extrato de peroxidase	% Adsorção de DON
Purificado por CTI em leite expandido	35,8 ^b ± 1,1
Purificado por CTI em leite expandido + UF	67,3 ^a ± 6,3

*Média de três valores com desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

O percentual de adsorção de DON foi maior para a peroxidase mais purificada, indicando a existência de uma relação entre o grau de purificação e de adsorção da enzima. Considerando os percentuais apresentados na Tabela 6, pode-se dizer que a redução dos níveis de DON se dá pela combinação dos processos de adsorção e oxidação. Contudo, não há como afirmar a parcela (percentual) correspondente à oxidação, já que estes fenômenos ocorrem simultaneamente ao se utilizar a enzima na forma ativa. Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que a purificação da peroxidase exerce papel fundamental para sua posterior aplicação na redução dos níveis de DON, independente do seu mecanismo de ação.

Como mencionado acima, são escassos os relatos na literatura científica que mencionam o uso da peroxidase na redução dos níveis de micotoxinas, tornando difícil a comparação dos resultados. Das e Mishra (2000) avaliaram a ação da peroxidase na micotoxina aflatoxina B1, utilizando enzima comercial e duas parcialmente purificadas extraídas do rabanete. Os autores verificaram que a enzima comercial apresentou 60% de redução nos níveis da aflatoxina B1, enquanto que as duas frações parcialmente purificadas demonstraram 30% e 38%, nas concentrações de 20 U/mg e 30 U/mg, respectivamente. Nora (2015) aplicou peroxidase comercial e parcialmente purificada por partição trifásica na redução dos níveis de ocratoxina A. O autor obteve 59% e 41% de redução utilizando a peroxidase comercial e parcialmente purificada, respectivamente, com baixa atividade enzimática no meio reacional (0,063 U/mL). Os trabalhos citados ressaltam a importância da purificação na posterior redução dos níveis de micotoxinas.

No caso específico do DON, estudos realizados por Garda-Buffon, Kupski e Badiale-Furlong (2011) e Feltrin (2013) mencionaram a relação existente entre a redução dos níveis da micotoxina e a atividade da peroxidase. Por outro lado, não foram encontrados até o

momento trabalhos que reportem o uso de peroxidase com diferentes graus de purificação na redução dos níveis DON, tampouco o modo de ação da enzima sobre a micotoxina. Os resultados apresentados neste trabalho, ainda que preliminares, demonstram a possibilidade de aplicar a peroxidase na redução dos níveis de DON, bem como importância dos processos de purificação frente à posterior aplicação de enzima para este fim.

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho, a CTI em leito expandido foi integrada à UF para purificação de peroxidase, sendo esta enzima aplicada na redução dos níveis de DON. O uso de membrana de massa molar limite de 10 kDa, temperatura de 10°C, seis ciclos de DF, adição de CaCl₂ 0,004 mol/L à solução dialfiltrante e concentração da enzima ao final do processo resultou nos valores globais de fator de purificação e recuperação enzimática de 75,1 vezes e 22,8%, respectivamente.

Através do perfil eletroforético, duas possíveis isoenzimas de massa molecular de 35,6 kDa e 65,4 kDa foram identificadas. A aplicação da peroxidase purificada por CTI em leito expandido integrado à UF/DF resultou na redução em 81,7% nos níveis de DON. O percentual de adsorção da peroxidase purificada sobre o DON chegou a 67,2%, indicando que o mecanismo de ação da enzima ocorre simultaneamente por adsorção e oxidação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SENAIDY, A.M.; ISMAEL, M.A. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 293-298, 2011.

ANSPACH, F. B.; CURBELO, D.; HARTMANN, R.; GARKE, G.; DECKWER, W. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 865, p. 129-144, 1999.

BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.

BOER, C.G.; OBICI, L.; SOUZE, C.G.M.; PERALTA, R. M. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. **Process Biochemistry**, v. 4, p. 1203-1207, 2006.

BUYEL, J.F.; TWYMAN, R.M. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 902-913, 2015.

CHAGAS, P.M.B.; TORRES, J.A.; SILVA, M.C.; CORRÊA, A.D. Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, 568-575, 2015.

CHEN, L.; CHUNG, Y.; CHANG, C. Characterization of an acidic peroxidase from papaya (*Carica papaya* L. cv Tainung No. 2) latex and its application in the determination of micromolar hydrogen peroxide in milk. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2529-2535, 2012.

CUTLER, P. **Protein Purification Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2004.

DAS, C.; MISHRA, H. N. *In vitro* degradation of aflatoxin B1 by horse radish peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, p. 309-313, 2000.

DAS, M.K.; SHARMA, R.S.; MISHRA, V. A novel cationic peroxidase (VanPrx) from a hemi-parasitic plant (*Viscum angulatum*) of western ghats (India): purification, characterization and kinetic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 63-70, 2011.

DEVAIAH, S.P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.

FELTRIN, A. C. P. **Aplicação da peroxidase para a degradação de deoxinivalenol**. 2013.120 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

FELTRIN, A. C. P. **Degradação de tricotecenos A e B por ação enzimática (título provisório)**. 2015. Tese (Doutorado em andamento em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

GALENDE, P. P.; CUADRADO, N.H.; ARELLANO, J.B.; GAVILANES, F.; KOSTETSKY, E.Y.; ZHADAN, G. G.; VILLAR, E.; ROIG, M. G.; KENNEDY, J. F.; SHNYROY, V. L. Purification and structural stability of White Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 718-723, 2015.

GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 198-203, 2011.

GAUTÉRIO, G.V.; FERNANDES, S.S.; MOLON, F.O.; SILVEIRA, F.S.; BUFFON, J.G.; KALIL, S.J. Purification of peroxidase from rice bran using expanded-bed ion-exchange chromatography. **Adsorption Science and Technology**, v. 33, p. 153-164, 2015.

GHOSH, R.; CUI, F.F. Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. **Journal of Membrane Science**, v.167, p.47-53, 2000.

GOTTSCHALK, L.M.F.; BON, E.P.S.; NOBREG, R. Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: enzyme concentration using ultrafiltration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 23-32, 2008.

- HABERT A. C., BORGES C. P., NOBREGA, R. **Processo de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006.
- HAMID, M.; REHMAN, K. U. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1177-1186, 2009.
- HIGARA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 462-468, 2001.
- JAOUADI, B.; REKIK, H.; BADIS, A.; JAOUADI, N.Z.; BELHOUL, M.; HMIDI, M.; KOURDALI, S.; FODIL, D.; BEJAR, S. Production, purification, and characterization of a highly thermostable and humic acid biodegrading peroxidase from a decolorizing *Streptomyces albidoflavus* strain TN644 isolated from a Tunisian off-shore oil field. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 90, p. 36-44, 2014.
- JIANG, Y.; TANG, W.; GAO, J.; ZHOU, L.; HE, Y. Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its applications in phenolic compounds and dye removal. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 1-6, 2014.
- JONGMEVASNA, W.; YAIYEN, S.; PRONOUSOONTORN, M.H. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz of cv. KU50) peroxidase and its potential for the detection of some thiol compounds based on the inhibitory effect of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine oxidation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1516-1523, 2013.
- KHARATMOL, P. P.; PANDIT, A. B. Extraction, partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves (*Brassicca olearacea var. capitata*). **Journal of Biochemical Technology**, v. 4, p. 531-540, 2012.
- KRAINER, F.W.; PLETZENAUER, R.; ROSSETTI, L.; HERWIG, C.; GLIEDER, A.; SPADIUT, O. Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzyme produced in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 104-112, 2014.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LIN, D.; TONG, H.; SANDT, E.J.A.X.; BOER, P.; GOLUBOVIC, M.; YAO, S. Evaluation and characterization of axial distribution in expanded bed. I. Bead size, bead density and local bed voidage. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 78-84, 2013.
- LIU, J.; YANG, B.; CHEN, C. A novel membrane-based process to isolate peroxidase from horseradish roots: optimization of operating parameters. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.36, p. 251-257, 2013.
- LUH, B.; BARBERS, S.; BARBER, C. B. Rice bran: chemistry and technology. In: LUH, B.S. **Rice: utilization**. 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. cap. 14.

- MACHADO, J.R.; SEVERO, M.E.; OLIVEIRA, G.J.; ORES, J.; KALIL, S.J. BRANDELLI, A. Maximização da concentração e purificação de queratinase de *Bacillus* sp. P45 utilizando ultrafiltração. In: Congresso Brasileiro de Química, 52., Recife. **Anais...Recife: Associação Brasileira de Química**, 2012.
- MÁRQUEZ, O.; WALISZEWSKI, K.N.; OLIART, R.M.; PARDIO, V.T. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, p. 1372-1379, 2008.
- MATHÉ, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. Evolution and expression of class III peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 58-65, 2010.
- MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.
- MOLON, F.O.; FAGUNDES, A.S.; LEMES, A.C.; DI-LUCCIO, M.; KALIL, S.J. Ultrafiltração de β -galactosidase: influência da pressão de operação e força iônica. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Iniciação Científica, IX., 2011, Maringá. **Anais...Maringá: Universidade Estadual de Maringá**, 2011.
- MOLON, F.O.; GETTENS, J.G.; SILVEIRA, J.; FIGUEIRA, F.S.; MORAES, C.C.; KALIL, S.J. Purificação de C-ficocianina de grau alimentar por ultrafiltração/diafiltração. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, XIX., 2013, Foz do Iguaçu. **Anais...Foz do Iguaçu: Associação Brasileira de Engenharia Química**, 2013.
- MONTSERRAT, M.; SANZ, D.; JUAN, T.; HERRERO, A.; SÁNCHEZ, L.; CALVO, M.; PÉREZ, M.D.; Detection of peanut (*Arachis hypogaea*) allergens in processed foods by immunoassay: influence of selected target protein and ELISA format applied. **Food Control**, v. 54, p. 300-307, 2015.
- MUNIR, S.; KHAN, M.; Park, S. Bienzyme liquid-crystal-based cholesterol biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 508-515, 2015.
- NORA, N.S. **Redução dos níveis de ocratoxina a por ação da enzima peroxidase**. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.
- PANDEY, V.P.; DWIVEDI, U.N. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p.168-173, 2011.
- PARKER, D.B.; CAI, L.; KIM, K.; HALES, K.E.; SPIEHS, M.J.; WOODBURY, B.L.; ATKIN, A.L.; NICKERSON, K.W.; PATEFIELD, K.D. Reducing odorous VOC emissions from swine manure using soybean peroxidase and peroxides. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 95-104, 2012.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

SCHÜTTMANN, I.; BOUWS, H.; SZWEDA, R.T.; SZWEDA, M.; CZERMAK, P.; ZORN, H. Induction, characterization, and heterologous expression of a carotenoid degrading versatile peroxidase from *Pleurotus sapidus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 103, p. 79-84, 2014.

SISECIOGLU, M.; GULCIN, I.; CANKAYA, M.; ATASEVER, A.; SEHITOGLU, M.H.; KAYA, H.B.; ÖZDEMİR, H. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 1187-1196, 2010.

SOMTÜRK, B.; KALIL, R.; ÖZDEMİR, N. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by affinity chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 1815-1828, 2014.

SONKAR, K.S.; PACHAURI, M.; KUMAR, A.; SHUKLA, A.; PATEL, M.; JAGANNADHAM, M.V. Heme-peroxidase from medicinal plant *Artocarpus lakoocha*: purification, characterization and wound healing studies. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 180-190, 2015.

SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 1-6, 2002.

STEEVENSZ, A.; MADUR, S.; AL-ANSARI, M. M.; TAYLOR, K. E.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N. A simple lab-scale extraction of soybean hull peroxidase shows wide variation among cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 13-18, 2013.

TOLEDO, A. L.; SEVERO-JR, J. B.; SOUZA, R. R.; CAMPOS, E. S.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of α -amylases FORILASE NTL from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 51-56, 2007.

TONG, X.; DONG, X.; SUN, Y. Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 117-124, 2002.

TÜRKER, L.; GÜMÜS, S. A theoretical study on vomitoxin and its tautomers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 285-294, 2009.

VALETTI, N.W.; PICÓ, G. A friendly method for *Raphanus sativus* L (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 119, p. 1-6, 2013.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, 2004.

VUJCIC, Z.; JANOVIC, B.; LONCAR, N.; MARGETIC, A.; BOZIC, N.; DOJNOV, B.; VUJCIC, M. Exploitation of neglected horseradish peroxidase isoenzymes for dye decolorization. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 97, p. 124-127, 2015.

WANG, X.L.; ZHANG, C.; OUYANG P. The possibility of separating saccharides from a NaCl solution by using nanofiltration in diafiltration mode. **Journal of Membrane Science**, v. 204, p.271-281, 2002.

WELINDER, K. G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, p. 388-393, 1992.

ZEMAN, L.J.; ZYDNEY, A.L. **Microfiltration and ultrafiltration. Principles and applications**. New York: Marcel Dekker, 1996.

ZENG, G.; ZHAO, M.; HUANG, D.; LAI, C.; HUANG, C.; WEI, Z.; XU, P.; LI, N.; ZHANG, C.; LI, F.; CHENG, M. Purification and biochemical characterization of two extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for lignin biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 166-172, 2013.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

4 CONCLUSÃO GERAL

No presente trabalho, foi possível purificar a enzima peroxidase de farelo de arroz utilizando a CTI em leito expandido integrado à UF, bem como aplicá-la na redução dos níveis de DON. A CTI em leito expandido foi aperfeiçoada através da avaliação dos principais parâmetros das etapas de adsorção, lavagem e eluição. O uso do tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5 e grau de expansão de 2,5 se mostraram as condições mais adequada para adsorção de peroxidase em trocador catiônico, apresentando capacidade de adsorção no equilíbrio (q^*) de 2,68 U/mL de resina e capacidade dinâmica de adsorção ($Q_{10\%}$) de 0,19 U/mL de resina. O uso do pH 5,5 na lavagem e a combinação da eluição do tipo degrau em 0,15 mol/L de NaCl e gradiente linear salino de 0,15 a 1 mol/L de NaCl acrescido de 0,001 mol/L de CaCl_2 em tampão acetato de sódio 0,025 mol/L pH 5,5, proporcionaram a purificação da peroxidase em 14,6 vezes com recuperação enzimática de 51,5%.

Para integrar a CTI em leito expandido à UF, as condições mais favoráveis para a purificação e concentração da peroxidase por UF foram determinadas. O uso de membrana de massa molar limite de 10 kDa, temperatura de 10°C, seis ciclos de DF e adição de CaCl_2 0,004 mol/L à solução dialfiltrante resultou nos valores de fator de purificação e recuperação enzimática na etapa de 4,4 vezes e 79,4%, respectivamente. O processo global integrando as duas técnicas resultou na purificação da peroxidase em 75,1 vezes e recuperação enzimática de 22,8%. Através do perfil eletroforético da peroxidase purificada, duas possíveis isoenzimas de massa molecular de 35,6 kDa e 65,4 kDa foram identificadas

O uso da peroxidase purificada proporcionou maior redução dos níveis de DON em relação à peroxidase na sua forma bruta, o que mostra a importância dos processos de purificação para posterior aplicação da enzima. A aplicação da peroxidase purificada por CTI em leito expandido integrado à UF resultou na redução em 81,7% nos níveis de DON, ainda que utilizando 0,01 U/mL da enzima no meio reacional. O percentual de adsorção da peroxidase purificada sobre o DON chegou a 67,2%, indicando que o mecanismo de ação da enzima ocorre simultaneamente por adsorção e oxidação.

A purificação de peroxidase obtida a partir de um coproduto da agroindústria, através de duas técnicas possíveis de ampliação de escala, se torna promissora frente à associação de técnicas cromatográficas normalmente utilizadas para este fim. Os ensaios em sistema modelo mostraram que a peroxidase pode ser aplicada na redução dos níveis de DON, sendo necessário um estudo mais aprofundado sobre o uso da enzima para este fim.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIJA, C. M.; RAO, U. J. S.P. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 36-44, 2009.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Expanded bed adsorption handbook: principles and methods**. [S.I.]: Uppsala, 2008.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Protein Purification Handbook**. [S.I.]: Uppsala, 2001.

AMISSAH, J. G. N.; ELLIS, W. O.; ODURO, J. T.; MANFUL, J. T. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. **Food Control**, v. 14, p. 21-24, 2003.

ANSPACH, F. B.; CURBELO, D.; HARTMANN, R.; GARKE, G.; DECKWER, W. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 865, p. 129-144, 1999.

ARAUJO, M.O.D. **Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons**. 1996.85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

ARAÚJO, N.K.; PAGNONCELLI, M.G.N.; PIMENTEL, V.C.; XAVIER, M.L.O.; PADILHA, C.E.A.; MACEDO, G.R.; SANTOS, E.S. Single-step purification of chitosanases from *Bacillus cereus* using expanded bed chromatography. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 291-298, 2016.

ARNALDOS, T.L.; FERRER, M.A.; MUNÕZA, R.; CALDERÓN, A.A. Purification and stability of a basic peroxidase from strawberry callus culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 479-486, 2001.

ARUNACHALAM, C.; DOOHAN, F. M. Trichothecene toxicity in eukaryotes: cellular and molecular mechanisms in plants and animals. **Toxicology Letters**, v. 217, p. 149-158, 2013.

ATASEVER, A.; OZDEMIR, H.; GULCIN, I.; KUFREVIOGLU, I. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. **Food Chemistry**, v. 136, p. 864-870, 2013.

AZEVEDO, A. M.; ROSA, P. A.; FERREIRA, I. F.; AIRES-BARROS, M. R. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 240-247, 2009.

BAKER, R.W. **Membrane technology and applications**. California: John Wiley and Sons Ltd, 2004.

- BALACHANDRAN, C.; MAYAMOL, P. N.; THOMAS, S.; SUKUMAR, D.; SUNDARESAN, A.; ARUMUGHAN, C. An ecofriendly approach to process rice bran for high quality rice bran oil using supercritical carbon dioxide for nutraceutical applications. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2905-2912, 2008.
- BALASUBRAMANIAN, M.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of *Cocos mucifera* (L.): biotransformation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 33-42, 2013.
- BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.
- BANCI, L. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 253-263, 1997.
- BANU, I.; LUPU, A.; APRODU, I. Degradation of zearalenone by laccase enzyme. **Scientific Study and Research - Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry**, v. 14, p. 79-84, 2013.
- BEAVER, R. Decontamination of mycotoxin-containing foods and feedstuffs. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p. 170-173, 1991.
- BERMEJO, R.; RAMOS, A. Pilot scale recovery of phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Chromatographia**, v. 75, p. 195- 204, 2012.
- BERMEJO, R.; RUIZ, E.; ACIEN, F.G. Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: scale-up of the process. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 927-933, 2007.
- BOER, C.G.; OBICI, L.; SOUZE, C.G.M.; PERALTA, R.M. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1203-1207, 2006.
- BOERIS, V.; BALCE, I.; VENNAPUSA, R.R.; RODRÍGUEZ, M.A.; PICÓA, G.; LAHORE, M.L. Production, recovery and purification of a recombinant galactosidase by expanded bed anion exchange adsorption. **Journal of Chromatography B**, v. 900, p. 32-37, 2012.
- BOEUF., G; BAUW, G.; LEGRAND, B.; RAMBOUR, S. Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 217-224, 2000.
- BORRESEN, E. C.; RYAN, E. P. Rice bran: a food ingredient with global public health opportunities. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R.; ZIBADI, S. **Wheat and Rice in Disease Prevention and Health**. Oxford: Academic Press, 2014. cap. 12.
- BOUCHERIT, N.; ABOUSEOUD, M.; ADOUR, L. Degradation of direct azo dye by *Cucurbita pepo* free and immobilized peroxidase. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, p. 1235-1244, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, A. R. C.; LEMES, C. A.; KALIL, S. J. Single chromatographic step for β -galactosidase purification: influence of salt and elution parameters. **Separation Science and Technology**, v. 29, p. 1817-1834, 2014.

BUYEL, J.F.; TWYMAN, R.M. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 902-913, 2015.

CAI, F.; OUYANG, C.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 59-66, 2012.

CARDINALI, A.; TURSI, N.; LIGORIO, A.; GIUFFRIDA, M.G.; NAPOLITANO, L.; CALIANDRO, R.; SERGIO, L.; DI VENERE, D.; LATTANZIO, V.; SONNANTE, G. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 395-403, 2011.

CAZZANIGA, D.; BASILICO, J. C.; GONZALEZ, R. J.; TORRES, R. L.; DE GREEF, D. M. Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 144-147, 2001.

CHAGAS, P.M.B.; TORRES, J.A.; SILVA, M.C.; CORRÊA, A.D. Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, 568-575, 2015.

CHARCOSSET, C. Membrane processes in biotechnology: an overview. **Biotechnology Advances**, v.24, p.482-492, 2006.

CHASE, H. A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 296-303, 1994.

CHEN, L.; CHUNG, Y.; CHANG, C. Characterization of an acidic peroxidase from papaya (*Carica papaya* L. cv Tainung No. 2) latex and its application in the determination of micromolar hydrogen peroxide in milk. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2529-2535, 2012.

CHIOU, C.; CHANG, P.; CHAN, E.; WU, T.; TSAO, K.; WU, J. Urinary 0-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. **Clinica Chimica**, v. 334, p. 87-94, 2003.

CIVELLO, P.M.; MARTINEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; ANON, M.C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2596-2601, 1995.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: Conab, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_02_04_09_05_00_boletim_graos_fevereiro_2016.pdf>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2016. ISSN: 2318-6852

CONESA, A.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p.143-158, 2002.

CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration – an example of multi-scale complex systems. **China Particuology**, v. 3, p. 343-348, 2005.

CUTLER, P. **Protein purification protocols**. New Jersey: Humana Press, 2004.

DAS, C.; MISHRA, H. N. In vitro degradation of aflatoxin B1 by horse radish peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, p. 309-313, 2000.

DAS, M.K.; SHARMA, R.S.; MISHRA, V. A novel cationic peroxidase (VanPrx) from a hemi-parasitic plant (*Viscum angulatum*) of western ghats (India): purification, characterization and kinetic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 63-70, 2011.

DEEPA, S.S.; ARUMUGHAN, C. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. **Phytochemistry**, v. 61, p. 503-511, 2002.

DEVA, A. N.; ARUN, C.; ARTGANAREESWARA, G.; SIVASHANMUGAM, P. Extraction of peroxidase from waste *Brassica oleracea* used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1148-1154, 2014.

DEVAIAH, S.P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.

DIMARTINO, S.; BOI, C.; SARTI, G. C. Influence of protein adsorption kinetics on breakthrough broadening in membrane affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3966-3972, 2011.

DU, Q.; LIN, D.; ZHANG, Q.; YAO, S. An integrated expanded bed adsorption process for lactoferrina and immunoglobulin G purification from crude sweet whey. **Journal of Chromatography B**, v. 947-948, p. 201-207, 2014.

DU, Q.; LIN, D.; XIONG, Z.; YAO, S. One-step purification of lactoferrina from crude sweet whey using cation-exchange expanded bed adsorption. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 2693-2699, 2013.

DUTTA, A. K.; MAJI, S. K.; BISWAS, P.; ADHIKARY, N. New peroxidase-substrate 3,5-di-tert-butylcatechol for colorimetric determination of blood glucose in presence of Prussian Blue-modified iron oxide nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 676-683, 2013.

ELIAS, M. C.; OLIVEIRA, M.; VANIER, N. L. **Qualidade do arroz da pós-colheita ao consumo**. Pelotas: Editora Universitária da UFPEL, 2012.

FACCIN, G. L.; VIEIRA, L. N.; MIOTT, L. A.; BARRETO, L. M.; AMANTE, E. R. Chemical, sensorial and rheological properties of a new organic rice bran beverage. **Rice Science**, v. 16, p. 226-234, 2009.

FARAHANY, E. M.; JINAP, S. Influence of noodle processing (industrial protocol) on deoxynivalenol. **Food Control**, v. 22, p. 1765-1769, 2011.

FAWAL, N.; LI, Q.; SAVELLI, B.; BRETTE, M.; PASSAIA, G.; FABRE, M.; MATHE, C.; DUNAND, C. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 441-444, 2013.

FELTRIN, A. C. P. **Aplicação da peroxidase para a degradação de deoxinivalenol**. 2013.120 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

FELTRIN, A. C. P. **Degradação de tricotecenos A e B por ação enzimática (título provisório)**. 2015. Tese (Doutorado em andamento em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

FRICKS, A.T.; DARIVA, C.; ALVAREZ, H.M.; SANTOS, A.F.; FORTUNY, M.; QUEIROZ, M.L.; ANTUNES, O.A.C. Compressed propane as a new and fast method of pre-purification of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 153-158, 2010.

FRITZEN-GARCIA, M. B.; MONTEIRO, F. F.; CRISTOFOLINI, T.; ACUÑA, J. J. S.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; SOLDI, V.; PASA, A. A. Characterization of horseradish peroxidase immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 182, p. 264-272, 2013.

GALENDE, P. P.; CUADRADO, N.H.; ARELLANO, J.B.; GAVILANES, F.; KOSTETSKY, E.Y.; ZHADAN, G. G.; VILLAR, E.; ROIG, M. G.; KENNEDY, J. F.; SHNYROY, V. L. Purification and structural stability of White Spanish broom (*Cytisus multiflorus*) peroxidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 718-723, 2015.

GARDA, J.; MACEDO, R.M.; FARIA, R.; BERND, L.; DORS, G.C.; BADIALE-FURLONG, E. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, v. 16, p. 423-428, 2005.

GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Kinetics deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 2, p. 710-714, 2010.

GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 198-203, 2011.

GAUTÉRIO, G.V.; FERNANDES, S.S.; MOLON, F.O.; SILVEIRA, F.S.; BUFFON, J.G.; KALIL, S.J. Purification of peroxidase from rice bran using expanded-bed ion-exchange chromatography. **Adsorption Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 153-164, 2015.

GAUTÉRIO, G. V.; FERNANDES, S. S.; MOLON, F. O.; FIGUEIRA, F. S.; BUFFON, J. G.; KALIL, S. J. Adsorção da enzima peroxidase de farelo de arroz em resinas de troca iônica. In: Encontro Brasileiro sobre Adsorção, 10., Guarujá. **Anais...**Guarujá: Universidade Federal de São Paulo, 2014.

GHOSH, R.; CUI, F.F. Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 167, p. 47-53, 2000.

GONZÁLEZ, P. S.; AGOSTINI, E.; MILRAD, S. R. Comparison of the removal of 2,4-dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from tomato hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. **Chemosphere**, v. 70, p. 982-989, 2008.

GOODING, K.M.; SCHMUCK, M.N. Ion selectivity in the high-performance cation-exchange chromatography of proteins. **Journal of Chromatography**, v. 296, p. 321-328, 1984.

GONG, Z.; LI, D.; LIU, C.; CHENG, A.; WANG, W. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chesnut kernel. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 1095-1099, 2015.

GOTTSCHALK, L.M.F.; BON, E.P.S.; NOBREGA, R. Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: enzyme concentration using ultrafiltration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 23-32, 2008.

HABERT A. C., BORGES C. P., NOBREGA, R. **Processo de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006.

HAMID, M.; REHMAN, K. U. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1177-1186, 2009.

HE, C.; FAN, Y.; LIU, G.; ZHANG, H. Isolation and identification of a strain of *Aspergillus tubingensis* with deoxynivalenol biotransformation capability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 2366-2375, 2008.

HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J.C.; BOLAND, G. J.; SCOTT, P. M. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 67-75, 2010.

HIGARA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 5, p. 462-468, 2001.

HJORTH, R. Expanded bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 230-235, 1997.

HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 24, p. 247-260, 1888.

HOSENEY, R. C. **Principios de ciencia y tecnología de los cereales**. Zaragoza: Acribia, 1991.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; PICKARD, M. A.; SMITH, D.W. Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenil treatment. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1758-1770, 2005.

JANSON, J. **Protein purification: principles, high resolution methods, and application**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2011.

JAOUADI, B.; REKIK, H.; BADIS, A.; JAOUADI, N.Z.; BELHOUL, M.; HMIDI, M.; KOURDALI, S.; FODIL, D.; BEJAR, S. Production, purification, and characterization of a highly thermostable and humic acid biodegrading peroxidase from a decolorizing *Streptomyces albidoflavus* strain TN644 isolated from a Tunisian off-shore oil field. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 90, p. 36-44, 2014.

JIANG, Y.; TANG, W.; GAO, J.; ZHOU, L.; HE, Y. Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its applications in phenolic compounds and dye removal. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 1-6, 2014.

JONGMEVASNA, W.; YAIYEN, S.; PRONOUSOONTORN, M.H. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz of cv. KU50) peroxidase and its potential for the detection of some thiol compounds based on the inhibitory effect of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine oxidation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1516-1523, 2013.

JUNGBAUER, A. Chromatographic media for bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 3-12, 2005.

KAHLON, T. S. Rice bran: production, composition, functionality and food applications, physiological benefits. In: CHO, S. S.; SAMUEL, P. **Fiber ingredients: food applications and health benefits**. Boca Raton: CRC Press, 2009. cap 14.

KALIL, S. J.; MAUGERI-FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an intracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 581-586, 2005.

KHAN, A.A.; ROBINSON, D.S. Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. *chaunsa*). **Food Chemistry**, v. 46, p. 61-64, 1993.

KHARATMOL, P. P.; PANDIT, A. B. Extraction, partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves (*Brassica olearacea* var. *capitata*). **Journal of Biochemical Technology**, v. 4, p. 531-540, 2012.

KARLOVSKY, P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. **Natural Toxins**, v. 7, p. 1-23, 1999.

KOBLITZ, M. G. **Matérias-primas alimentícias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KÖKSAL, E. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): partial purification and some biochemical properties. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 135-139, 2011.

KONG, C.; SHIN, S.Y.; KIM, B.G. Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: an *in vitro* approach. **Springerplus**, v. 3, p. 1-6, 2014.

KOPACIENWICZAND, W.; RJZGNIE, F.E. Mobile phase selection for the high-performance ion-exchange chromatography of proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 133, p. 251-259, 1983.

KRAINER, F.W.; PLETZENAUER, R.; ROSSETTI, L.; HERWIG, C.; GLIEDER, A.; SPADIUT, O. Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzyme produced in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 104-112, 2014.

KUMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, p. 891-905, 2008.

KUPSKI, L.; ALVES, C.L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Application of carboxypeptidase from *Rhizopus* on ochratoxin A degradation. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, p. 30-36, 2013.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARSEN, J. C.; HUNT, J.; PERRIN, I.; RUCKENBAUER, P. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 1-22, 2004.

LEON, J.C.; ALPEEVA, I.S.; CHUBAR, T.A.; GALAEV, I.Y.U.; CSOREG, E.; SAKHAROV, I.Y.U. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. **Plant Science**, v. 163, p. 1011-1019, 2002.

LEVISON, P.R. Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 17-33, 2003.

LI, Y.; WANG, N.; ZHANG, M.; ITO, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; GUO, X.; HU, P. Development of a method to extract and purify target compounds from medicinal plants in a single step: online hyphenation of expanded bed adsorption chromatography and countercurrent chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 3373-3379, 2014.

LIENQUEO, M.E.; ASENJO, J.A. Use of expert systems for the synthesis of downstream protein processes. **Computers and Chemical Engineering**, v. 24, p. 2339-2350, 2000.

LIN, D.; TONG, H.; SANDT, E.J.A.X.; BOER, P.; GOLUBOVIC, M.; YAO, S. Evaluation and characterization of axial distribution in expanded bed. I. Bead size, bead density and local bed voidage. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 78-84, 2013.

LIU, J.; YANG, B.; CHEN, C. A novel membrane-based process to isolate peroxidase from horseradish roots: optimization of operating parameters. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.36, p.251-257, 2013.

LÓPEZ-MOLINA, D.; HEERING, H.A.; SMULEVICH, G.; TUDELA, J.; THORNELEY, R.N.F.; CANOVAS, F.G.; RODRIGUEZ-LOPEZ, N. Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cybara scolymus* L. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 94, p. 243-254, 2003.

LORENZO, V. Systems biology approaches to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 579-589, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUH, B.; BARBERS, S.; BARBER, C. B. Rice bran: chemistry and technology. In: LUH, B.S. **Rice: utilization**. 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. cap. 14.

MACHADO, J.R.; SEVERO, M.E.; OLIVEIRA, G.J.; ORES, J.; KALIL, S.J. BRANDELLI, A. Maximização da concentração e purificação de queratinase de *Bacillus* sp. P45 utilizando ultrafiltração. In: Congresso Brasileiro de Química, 52., Recife. **Anais...Recife**: Associação Brasileira de Química, 2012.

MALONEY, K. P.; TRUONG, V.; ALLEN, J.C. Susceptibility of sweet potato (*Ipomoea batatas*) peel proteins to digestive enzymes. **Food Science and Nutrition**, v. 2, p. 351-360, 2012.

MANU, B. T.; RAO, U. J. S.P. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 114, p. 66-71, 2009.

MATHÉ, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. Evolution and expression of class III peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 58-65, 2010.

MÁRQUEZ, O.; WALISZEWSKI, K.N.; OLIART, R.M.; PARDIO, V.T. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, p. 1372-1379, 2008.

MELO, N.S.; LANSERV, E.; WELINDER, K.G.; FEVEREIRO, P.S. Characterization of two major cationic peroxidases suspension cultures of *Vaccinium myrtillus* from cell. **Plant Science**, n. 122, p. 1-10, 1997.

MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, p. 155-166, 1997.

MOHAMED, A.S.; DARWISH, A.A.; EL-SHISHTAWY, R.M. Immobilization of horseradish peroxidase on activated wool. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 649-655, 2013.

- MOLON, F.O.; FAGUNDES, A.S.; LEMES, A.C.; DI-LUCCIO, M.; KALIL, S.J. Ultrafiltração de β -galactosidase: influência da pressão de operação e força iônica. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Iniciação Científica, IX., 2011, Maringá. **Anais...Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2011.**
- MOLON, F.O.; GETTENS, J.G.; SILVEIRA, J.; FIGUEIRA, F.S.; MORAES, C.C.; KALIL, S.J. Purificação de C-ficocianina de grau alimentar por ultrafiltração/diafiltração. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, XIX., 2013, Foz do Iguaçu. **Anais...Foz do Iguaçu: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2013.**
- MONTSERRAT, M.; SANZ, D.; JUAN, T.; HERRERO, A.; SÁNCHEZ, L.; CALVO, M.; PÉREZ, M.D. Detection of peanut (*Arachis hypogaea*) allergens in processed foods by immunoassay: influence of selected target protein and ELISA format applied. **Food Control**, v. 54, p. 300-307, 2015.
- MORAES, C.C.; KALIL, S.J. Strategy for a protein purification design using C-phycoyanin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5312-5317, 2009.
- MORAES, C.C.; MAZUTTI, M.A.; MAUGERI, F.; KALIL, S.J. Modeling of ion exchange expanded-bed chromatography for the purification of C-phycoyanin. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 73-78, 2013.
- MORAES, C.C.; SALA, L.; ORES, J.C.; BRAGA, A.R.C.; COSTA, J.A.V.; KALIL, S.J. Expanded and fixed bed ion exchange chromatography for the recovery of C-phycoyanin in a single step by using lysed cells. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 1, p. 111-115, 2014.
- MOTAMED, S.; GHAEMMAGHAMI, F.; ALEMZADEH, I. Turnip (*Brassica rapa*) peroxidase: purification and characterization. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 10614-10618, 2009.
- MOYO, M.; OKONKWO, J. Horseradish peroxidase biosensor based on maize tassel-MWCNTs composite for cadmium detection. **Sensors and Actuators B**, v. 193, p. 515-521, 2014.
- MOZAMMEL, M.; SADRNEZHAAD, S. K.; BADAMI, E.; AHMADI, E. Breakthrough curves for adsorption and elution of rhenium in a column ion exchange system. **Hydrometallurgy**, v. 85, p. 17-23, 2007.
- MUNIR, S.; KHAN, M.; Park, S. Bienzyme liquid-crystal-based cholesterol biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 508-515, 2015.
- NADAROGLU, H.; CELEBI, N.; DEMIR, N.; DEMIR, Y. Purification and characterization of a plant peroxidase from rocket (*Eruca vesicaria* sbsp. *Sativa*) (Mill.) (syn. *E. sativa*) and effects of some chemicals on peroxidase activity *in vitro*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 21, p. 2520-2528, 2013.
- NAGY, C. M.; FEJER, S. N.; BEREK, L.; MOLNAR, J.; VISKOLCZ, B. Hydrogen bondings in deoxynivalenol (DON) conformations – a density functional study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 726, p. 55-59, 2005.

NFOR, B. K.; AHAMED, T.; DEMEM, G. W. K.; WIELEN, L. A. N.; SANDT, E. J. A. X., EPIKINS, M. H. M.; OTTENS, M. Design strategies for integrated protein purification processes: challenges, progress and outlook. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 124-132, 2008.

NG, Y.T.; TAN, W.S.; TEY, B.T. Purification of recombinant hepatitis B core antigen from unclarified *Escherichia coli* feedstock using phage-immobilized expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 903, p. 60-67, 2012.

NIDERKORN, V.; BOUDRA, H.; MORGAVI, D. P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 849-856, 2006.

NORA, N.S. **Redução dos níveis de ocratoxina a por ação da enzima peroxidase**. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

NOUREN, S.; BHATTI, H. N.; BHATTI, I. A.; ASGHER, M. Kinetic and thermal characterization of peroxidase from peels of *citrus reticulata* var. kinnow. **Journal of Animal and Plant Science**, v. 23, p. 430-435, 2013.

ONSA, G.H.; SAARI, N.; SELAMAT, J.; BAKAR, J. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. **Food Chemistry**, v. 85, p. 365-376, 2004.

PANDEY, V.P.; DWIVEDI, U.N. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p.168-173, 2011.

PARK, B. J.; TAKATORI, K.; SUGITA-KONISHI, Y.; KIM, I.; LEE, M.; HAN, D.; CHUNG, K.; HYUN, S.; PARK, J. Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, p. 5733-5737, 2007.

PARKER, D.B.; CAI, L.; KIM, K.; HALES, K.E.; SPIEHS, M.J.; WOODBURY, B.L.; ATKIN, A.L.; NICKERSON, K.W.; PATEFIELD, K.D. Reducing odorous VOC emissions from swine manure using soybean peroxidase and peroxides. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 95-104, 2012.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F.; TERÁN, L. C.; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v.98, p.742-748, 2006.

PEEVA, P. D.; KNOCHE, T.; PIEPER, T.; ULBRICHT, M. Cross-flow ultrafiltration of protein solutions through unmodified and surface functionalized polyethersulfone membranes - Effect of process conditions on separation performance. **Separation and Purification Technology**, v. 92, p. 83-92, 2012.

PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Editora Manole, 2005.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 283-298, 2007.

REIS, R.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology. **Journal of Membrane Science**, v. 297, p. 16-50, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROE, S. **Protein Purification Techniques**. New York: Oxford University Press, 2001.

RUDRAPPA, T.; LAKSHMANAN, V.; KAUNAIN, R.; SINGARA, N. M.; NEELWAME, B. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 105, p. 1312-1320, 2007.

SAKAI, S.; KHANMHAMMADI, M.; KHOSHFETRAT, A. B.; TAYA, M. Horseradish peroxidase-catalyzed formation of hydrogels from chitosan and poly(vinyl alcohol) derivatives both possessing phenolic hydroxyl groups. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 404-409, 2014.

SALA, L.; FIGUEIRA, F.S.; CERVEIRA, G.P.; MORAES, C.C.; KALIL, S.J. Kinetics and adsorption isotherm of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* on ion-exchange resins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 1013-1022, 2014.

SAMAR, M.; RESNIK, S. L.; GONZÁLEZ, H. H. L.; PACIN, A. M.; CASTILLO, M. D. Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. **Food Control**, v. 18, p. 1295-1299, 2007.

SANTOS, E.S. **Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido**. 2001. 152f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Campinas, Campinas, 2001.

SANTOS, E.S.; GUIRARDELLO, R.; FRANCO, T.T. Preparative chromatography of xylanase using expanded bed adsorption. **Journal of Chromatography A**, v. 944, p. 217-224, 2002.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.145, p.1-22, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. 4 v.

SCHÜTTMANN, I.; BOUWS, H.; SZWEDA, R.T.; SZWEDA, M.; CZERMAK, P.; ZORN, H. Induction, characterization, and heterologous expression of a carotenoid degrading versatile peroxidase from *Pleurotus sapidus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 103, p. 79-84, 2014.

SCHWARTZ, L. Diafiltration: a fast, efficient method for desalting, or buffer exchange of biological samples. **Scientific and Technical Report**. Ann Arbor: Pall Life Science, 2003. Disponível em: <http://www.pall.com/pdfs/Laboratory/02.0629_Buffer_Exchange_STR.pdf>. Acesso em: 18 de maio de 2015. PN 33289

SCOPES, R.K. **Protein purification: principles and practice**. Bundoora: Springer, 1994.

SCHULLER, D.J.; BAN, N.; HUYSTEE, R.B.; MCPHERSON, A.; POULOS, T. The crystal structure of peanut peroxidase. **Structure**, v. 4, n.3, p. 311-321, 1996.

SESTO, P.A.; HUYSTEE, R.B. Purification and yield of a cationic peroxidase from a peanut suspension cell culture. **Plant Science**, v. 61, p. 163-168, 1989.

SIEGEL, D.; BABUSCIO, T. Mycotoxin management in the European cereal trading sector. **Food Control**, v. 22, p. 1145-1153, 2011.

SINGH, P.; PRAKASH, R.; SHAH, K. Effect of organic solvents on peroxidases from rice and horseradish: prospects for enzyme based applications. **Talanta**, v. 97, p. 204-210, 2012.

SILVA, M. A.; SANCHES, C; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 487-491, 2006.

SMITH, A.T.; VEITCHT, N. C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, p. 269-278, 1998.

SISECIOGLU, M.; GULCIN, I.; CANKAYA, M.; ATASEVER, A.; SEHITOGLU, M.H.; KAYA, H.B.; ÖZDEMİR, H. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 1187-1196, 2010.

SOMTÜRK, B.; KALIL, R.; ÖZDEMİR, N. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by affinity chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 1815-1828, 2014.

SONKAR, K.S.; PACHAURI, M.; KUMAR, A.; SHUKLA, A.; PATEL, M.; JAGANNADHAM, M.V. Heme-peroxidase from medicinal plant *Artocarpus lakoocha*: Purification, characterization and wound healing studies. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 180-190, 2015.

SOUSA JUNIOR, F.C.; VAZ, M.R.F.; PADILHA, C.E.A.; CHIBÉRIO, A.S.; MARTINS, D.R.A.; MACEDO, G.R.; SANTOS, E.S. Recovery and purification of recombinant 503 antigen of *Leishmania infantum chagasi* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 986-987, p. 1-7, 2015.

SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 1-6, 2002.

STEEVENSZ, A.; MADUR, S.; AL-ANSARI, M. M.; TAYLOR, K. E.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N. A simple lab-scale extraction of soybean hull peroxidase shows wide variation among cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 13-18, 2013.

STRAETKVERN, K.O.; SCHWARZ, J.G. Recovery of native potato protein comparing expanded bed adsorption and ultrafiltration. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1939-1949, 2015.

SUDAKIN, D. L. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.

TOLEDO, A. L.; SEVERO-JR, J. B.; SOUZA, R. R.; CAMPOS, E. S.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of α -amylases FORILASE NTL from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 51-56, 2007.

TONG, X.; DONG, X.; SUN, Y. Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 117-124, 2002.

TÜRKER, L.; GÜMÜS, S. A theoretical study on vomitoxin and its tautomers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 285-294, 2009.

UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION. **Rice bran: an under-utilized raw material**. New York: United Nations, 1985.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World Agriculture Supply and Demand Estimates, 2016. Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016. ISSN: 1554-9089.

VALETTI, N.W.; PICÓ, G. A friendly method for *Raphanus sativus* L (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 119, p. 1-6, 2013.

VDOVENKO, M. M.; ZUBKOV, A.V.; KUZNETSOVA, G. I.; CIANA, L. D.; KUZMINA, N. S.; SAKHAROV, I. Y. Development of ultra-sensitive soybean peroxidase-based CL-ELISA for the determination of human thyroglobulin. **Journal of Immunological Methods**, v. 362, p. 127-130, 2010.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, 2004.

VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 94, p. 284-289, 2014.

VUJCIC, Z.; JANOVIC, B.; LONCAR, N.; MARGETIC, A.; BOZIC, N.; DOJNOV, B.; VUJCIC, M. Exploitation of neglected horseradish peroxidase isoenzymes for dye decolorization. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 97, p. 124-127, 2015.

WANG, X.L.; ZHANG, C.; OUYANG P. The possibility of separating saccharides from a NaCl solution by using nanofiltration in diafiltration mode. **Journal of Membrane Science**, v. 204, p.271-281, 2002.

WELINDER, K. G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, p. 388-393, 1992.

WELINDER, K. G.; JUSTESEN, A. F.; KJAERGAARD, I. V. H.; JENSEN, R. B.; RASMUSSEN, S. K.; JESPERSEN, H. M.; DOROUX, L. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 6063-6081, 2002.

WHEELWRIGHT, S. M. The design of downstream processes for large-scale protein purification. **Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 89-102, 1989.

WIBISONO, Y.; CORNELISSEN, E. R.; KEMPERMAN, A. J. B.; VAN DER MEER, W. G. J.; NIJMEIJER, K. Two-phase flow in membrane processes: a technology with a future. **Journal of Membrane Science**, v. 453, p. 566-602, 2014.

XIA, H. F.; LIN, D. G.; YAO, S. J. Evaluation of new high-density ion exchange adsorbents for expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1145, p. 58-66, 2007.

YANG, L.; HUO, D.; HOU, C.; HE, K.; LV, F.; FA, H.; LUO, X. Purification of plant-esterase in PEG1000/NaH₂PO₄ aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1664-1671, 2010.

YAZDANSHENAS, M.; TABATABAEENEZHAD, A.R.; ROOSTAAZAD, R.; KHOSHFETRAT, A.B. Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration. **Separation and Purification Technology**, v.47, p.52-57, 2005.

YE, F. X.; ZHU, R. F.; LI, Y. Deodorization of swine manure slurry using horseradish peroxidase and peroxides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 148-153, 2009.

YUHAI, H.; CHIK, S.M.S.T.; CHIN, C.F. Purification of papain from unclarified papaya juice using reversed phase expanded bed adsorption chromatography (RP-EBAC). **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, p. 4293-4297, 2014.

ZÁMOCKÝ, M.; FURTMÜLLER, P.G.; OBINGER, C. Evolution of structure and function of Class I peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 45-57, 2010.

ZEMAN, L.J.; ZYDNEY, A.L. **Microfiltration and ultrafiltration. Principles and applications**. New York: Marcel Dekker, 1996.

ZENG, G.; ZHAO, M.; HUANG, D.; LAI, C.; HUANG, C.; WEI, Z.; XU, P.; LI, N.; ZHANG, C.; LI, F.; CHENG, M. Purification and biochemical characterization of two extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for lignin biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 166-172, 2013.

ZERAIK, A.E.; SOUZA, F.S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ZHANG, H.; WANG, B. Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during wheat milling and Chinese steamed bread processing. **Food Control**, v. 44, p. 86-91, 2014.

ZHAO, J.; LIN, D.; YAO, S. Expansion and hydrodynamic properties of β -cyclodextrin polymer/tungsten carbide composite matrix in an expanded bed. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7840-7845, 2009.

ZIA, M.A.; KOUSAR, M.; AHMED, I.; IQBAL, H.M.N.; ABBAS, R.Z. Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 33, p. 6300-6303, 2011.